

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS, À
BASE DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS E ZIRCÔNIA, OBTIDOS PELO
MÉTODO SOL-GEL, PARA APLICAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Karine dos Santos Caetano

Tese de Doutorado

Porto Alegre, Maio 2021

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais

**DESENVOLVIMENTO DE SENSORES E BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS À
BASE DE MATERIAIS NANOESTRUTURADOS E ZIRCÔNIA PARA APLICAÇÃO
EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Karine dos Santos Caetano

Tese sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Tania Maria Haas Costa e
coorientação da Prof^ª. Dr^ª. Leliz Ticona Arenas, apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento
parcial dos requisitos para a
obtenção do título Doutor(a) em Ciência dos
Materiais.

Porto Alegre, Maio 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Caetano, Karine dos Santos

Desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos, à base de materiais nanoestruturados e zircônia, obtidos pelo método sol-gel, para aplicação em tecnologia de alimentos. / Karine dos Santos Caetano. -- 2021.

115 f.

Orientador: Tania Maria Haas Costa.

Coorientador: Leliz Ticona Arenas.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Sensor Eletroquímico. 2. Biossensor Eletroquímico. 3. Nanoestruturas. 4. Metil Paration. 5. Tributirina. I. Costa, Tania Maria Haas, orient. II. Arenas, Leliz Ticona, coorient. III. Título.

Dedicatória

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar.

*Dedico este trabalho
aos meus pais, à minha irmã,
ao meu esposo e aos meus sogros
por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Preciso começar agradecendo minha orientadora, a Prof.^a Tania Costa pela orientação tão gentil e humana. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, pela colaboração com meu crescimento pessoal e profissional, pelo reconhecimento do meu trabalho, e por toda contribuição em cada parte desta tese. Preciso te agradecer também por ter escolhido a prof.^a Leliz Arenas para completar nosso time.

Prof^a Leliz, minha gratidão por você. Obrigada por compartilhar seus conhecimentos, por me fazer sair da minha zona de conforto e aprender muitas coisas novas e descobrir uma nova paixão, a eletroquímica. Obrigada por me pegar pela mão e ir junto para o laboratório me ajudar, vibrar comigo quando dava certo e saber me incentivar quando não funcionava como planejado. Muito obrigada por ter aceitado trabalhar comigo, foi um prazer enorme.

Enfim, muito obrigada minhas queridas professoras Tania e Leliz, por tudo e principalmente por compreenderem o lado pessoal com tanto carinho, foi muito importante para que eu conseguisse passar por mais essa etapa.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Edilson Benvenuti pela gentil recepção no grupo LSS, pelos vários ensinamentos, pelas análises e discussões que enriqueceram esse trabalho. E à prof.^a Eliana de Menezes, pelas inúmeras contribuições, por me ceder parte do seu espaço em sala de aula e me ensinar a conduzir uma classe.

Gostaria de agradecer à prof.^a Cristiane de Oliveira pelas muitas contribuições em eletroquímica, por seu tempo e ajuda com as medições em seu laboratório. Meus sinceros agradecimentos na gentil contribuição da prof.^a Ruth Hinrichs com a análise de EDS.

Não posso deixar de agradecer aos professores do ICTA, Rafael Rodrigues pela gentileza em ceder reagentes, seu laboratório e também seu tempo me ajudando a pensar e por todas contribuições nas correções. Obrigada pelos ensinamentos e por seu tempo. E ao professor Plinho Hertz pela estrutura e reagentes cedidos em alguns experimentos.

Obrigada aos técnicos do Instituto de Química Marina, Graziela, Vicente, Brenda e Alan, sempre muito prestativos. Obrigada ao bolsista João Paulo do LAMAS pela gentileza em fazer algumas caracterizações. Gostaria de agradecer a cia e amizade da “guardinha” Fran. Na solidão que estive o vale no ano de 2020 você foi essencial.

Meu muito obrigada a todos colegas do LSS (Anike, Andressa, Antônio, Billy, Brenda, Cezar, Clara, Carolina, Danielle, Douglas, Franciele, Felix, Francine, Gabriela, Giulia, Juliana, João, Laura, Luana, Lucas, Mariana, Monique, Natália, Nortom, Oleg, Rafaela e Victor,), vocês foram essenciais nesses últimos anos, foi uma imensa satisfação trabalhar com vocês. Agradecimentos especiais à Franciele, por me iniciar na arte da eletroquímica, à Danielle por

compartilhar seu tempo, conhecimentos e ter contribuído com meu trabalho, me ajudou em um momento que estava precisando, muito obrigada! Obrigada Natália e Douglas por me ajudar com as enzimas. Obrigada Andressa e Monique por me apresentar o lab., me ensinar sobre cada equipamento e compartilhar comigo o conhecimento de vocês. Obrigada pelas várias aulas de química. Vocês foram muito importantes nessa etapa inicial. Anike, muito obrigada pela parceria de lab. e infinitas ajudas com análises, conferindo cálculos e também pela cia nas idas ao McDonald's e momentos de descontração, foram muito importantes. Gabi, você é incrível, fez meus dias mais alegres! Obrigada Juliana pelas muitas ajudas e pela cia. O somatório de tudo que aprendi com vocês, certamente fez diferença no resultado final desse trabalho.

Quero agradecer também os meus colegas de classe Cibele, Juliana, Janine, Marcelo, Carlos, Lilian, Aline. Obrigada pela ajuda com as disciplinas. Vocês foram fundamentais. E meu agradecimento especial para minha amiga, parceira Juliana, que me arrastou pra estudar e se tornou indispensável nos anos seguintes, foram vários os momentos de descontração, idas à Gramado, viagens de 12 horas, compras no Paraguai, praias, comilanças, só algumas idas ao Outback e alguns perrengues também para equilibrar. Certamente meu período de doutorado sem você não seria o mesmo. Obrigada pela amizade e parceria.

Obrigada aos meus amigos Anne, Kleber e Well, sempre na torcida por mim. Vocês moram no meu coração desde sempre, para sempre.

Meus agradecimentos à minha família. Aos meus pais, Osméria e Dofico, à minha irmã Karyene, vocês são minha base, minha fortaleza, é onde recupero as energias. Ao meu esposo Roger pelo apoio desde meu TCC, por sempre acreditar em mim e pelo incentivo em persistir na carreira acadêmica. Aos meus sogros, Dilse e César, por todo suporte.

Agradeço à UFRGS pela estrutura oferecida e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS.

Lista de trabalhos gerados a partir dos resultados descritos na Tese

Artigo publicado

Caetano, Karine dos Santos; Da Rosa, Danielle Santos; Pizzolatto, Tânia Mara; Dos Santos, Pamela Andrea Mantey; Hinrichs, Ruth; Benvenuti, Edilson Valmir; Dias, Silvio Luis Pereira; Arenas, Leliz Ticona; Costa, Tania Maria Haas. MWCNT/zirconia porous composite applied as electrochemical sensor for determination of methyl parathion. *Microporous and Mesoporous materials*, v. 309, p. 110583, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110583>.

Outros artigos gerados no período da Tese

De Matos Morawski, Franciele; Xavier, Brenda Borges; Virgili, Anike Hübner; Dos Santos Caetano, Karine; De Menezes, Eliana Weber; Benvenuti, Edilson Valmir; Costa, Tania Maria Haas; Arenas, Leliz Ticona. A Novel Electrochemical Platform Based on Mesoporous Silica/Titania and Gold Nanoparticles for Simultaneous Determination of Norepinephrine and Dopamine. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2020.111646>

Trabalhos apresentados em congressos

Caetano, K. S.; Morawski, F. M.; Arenas, L. T.; Costa, T. M. H. Preparation of sol-gel silica/zirconia films on glass conductor by dip-coating. In: XVI Brazilian MRS Meeting, 2017, Gramado. XVI MRS Brazilian Meeting, 2017.

Caetano, K. S.; Beck, F. F.; Arenas, L. T.; Costa, T. H. Lipase Immobilization in a thin film of silica by the sol-gel method on the modified surface of the FTO glass by dipcoating. In: XVIII Brazilian MRS Meeting, 2019, Balneário Camboriú. XVIII MRS Brazilian Meeting, 2019.

Caetano, K. S.; Arenas, L. T.; Costa, T. M. H. Desenvolvimento de um compósito à base de nanotubos de carbono e zircônia para aplicação como sensor eletroquímico. Em: V Mostra do Centro de Nanociência e Nanotecnologia CNANO, 2019, Porto Alegre.

Caetano, Karine dos Santos; Da Rosa, Danielle Santos; Pizzolatto, Tânia Mara; Dos Santos, Pamela Andrea Mantey; Hinrichs, Ruth; Benvenuti, Edilson Valmir; Arenas, Leliz Ticona; Costa, Tania Maria Haas. MWCNT/zirconia porous composite applied as electrochemical

sensor for determination of methyl parathion. Em: II Fronteiras em Eletroquímica e Eletroanalítica: Avanços realizados por jovens mulheres cientistas, 11 e 12 de fevereiro de 2021, Evento internacional online. <https://sites.google.com/usp.br/fronteiraseleto/ii-fee>.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 SENSORES E BIOSSENSORES.....	4
2.2 MÉTODO SOL-GEL.....	7
2.2.1 Compósito à Base de Nanotubos de Carbono e Zircônia.....	10
2.2.2 Óxidos Mistos de Sílica/Zircônia Aplicados para Formação de Filmes.....	11
2.2.3 Nanopartículas de Ouro.....	13
2.2.4 Imobilização de Enzima para Biossensores.....	15
2.3 VIDRO CONDUTOR FTO (ÓXIDO DE ESTANHO DOPADO COM FLÚOR).....	17
2.4 ANALITOS ESTUDADOS.....	18
2.4.1 Metil Paration.....	18
2.4.2 Triglicerídeos.....	20
2.5 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS.....	20
2.5.1 Voltametria Cíclica.....	22
2.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial.....	24
2.5.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	25
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1 MATERIAIS.....	27
3.2 MÉTODOS.....	28
3.2.1 Compósito NTCPM/ZrO ₂	28
3.2.2 Preparação de Eletrodos Pasta de Carbono com o Compósito NTCPM/ZrO ₂	30
3.2.3 Síntese do Silsesquioxano Iônico.....	31
3.2.4 Dispersão de AuNP em Cloreto de Dabcosil.....	31
3.2.5 Filmes de Sílica/Zircônia sobre o vidro Condutor FTO.....	31
3.2.6 Filmes de AuNP/DABCOSIL sobre Filme SiO ₂ /ZrO ₂	33
3.2.7 Imobilização da Enzima Lipase (<i>Candida Rugosa</i>).....	34

3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	36
3.3.1 Análise Termogravimétrica.....	36
3.3.2 EDS obtido por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	36
3.3.4 Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	36
3.3.5 Análise Elementar de C, H e N	37
3.3.6 Espectroscopia Raman	37
3.3.7 Difração de Raios X.....	37
3.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
3.3.9 Espectroscopia na Região do UV-Vis	37
3.3.10 Perfilometria Óptica.....	38
3.3.11 Ângulo de Contato com a Água	38
3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	38
3.4.1 Sensor para Metil Paration.....	38
3.4.1.1 Caracterização por Voltametria Cíclica.....	39
3.4.1.2 Caracterização por Voltametria de Pulso Diferencial	39
3.4.1.3 Análise de Interferentes para Metil Paration	39
3.4.1.4. Amostra Real.....	40
3.4.2 Sensor para Triglicerídeos.....	40
3.4.2.1 Caracterização por Voltametria Cíclica.....	40
3.4.2.2 Caracterização por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	40
4 RESULTADOS E DISCUSSões.....	41
4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA MP USANDO UM COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO E ZIRCÔNIA	41
4.1.1 Caracterização Estrutural e Textural Dos Compósitos NTCPM/ZrO ₂	41
4.1.2 Caracterização Eletroquímica em Solução de Ferro/Ferricianeto de Potássio (K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆]) dos Compósitos à Base de NTCPM/ZrO ₂	49

4.1.3 Aplicação do Compósito NTCPM60%/ZrO ₂ como Sensor Eletroquímico Para Metil Paration	53
4.1.4 Comportamento Eletroquímico do MP por Voltametria de Pulso Diferencial	57
4.1.5 Interferentes.....	62
4.1.6 Repetibilidade e Reprodutibilidade	63
4.1.7 Aplicação em Amostras de Extrato de Soja.....	64
4.2 DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA TRIGLICERÍDEOS USANDO O VIDRO CONDUTOR FTO COM FILMES DE SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/LIPASE.....	64
4.2.1 Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica dos Filmes SiO ₂ /ZrO ₂ e SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP	64
4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Filmes Sobre o Vidro Condutor FTO	66
4.2.3 Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância do Eletrodo FTO SiO ₂ ZrO ₂ /AuNP/Lipase.....	70
4.2.4 Reprodutibilidade	78
4.2.5 Michaelis–Menten	79
5 CONCLUSÕES.....	81
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do óxido de silício obtido por sol-gel [54].	8
Figura 2: Etapas do processo sol-gel e a versatilidade de suas aplicações [15].	9
Figura 3: Estrutura química do compósito sílica/zircônia.	12
Figura 4: Silsesquioxano contendo o grupo catiônico 1,4 diazoniabicyclo[2,2,2]octano.	15
Figura 5: Representação de uma célula eletroquímica [135].	21
Figura 6: Relação de potencial em relação ao tempo em voltametria cíclica (a) [138]. Típico voltamograma cíclico obtido pela relação entre intensidade de corrente e potencial (b).	22
Figura 7: Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial [143].	24
Figura 8: Registro digital de uma voltametria de pulso diferencial [141].	25
Figura 9: Representação do circuito de Randle [145].	26
Figura 10: Estrutura química do propóxido de zircônio (IV).	29
Figura 11: Fluxograma da síntese dos compósitos NTCPM/ZrO ₂ .	30
Figura 12: Ilustração de um eletrodo pasta de carbono.	30
Figura 13: Equipamento utilizado para a técnica <i>dip coating</i> .	33
Figura 14: Esquema de preparação e deposição do filme de SiO ₂ /ZrO ₂ no vidro FTO limpo.	33
Figura 15: Esquema de preparação e deposição dos filmes de AuNP/DABCOSIL nos vidros FTO/ SiO ₂ /ZrO ₂ .	34
Figura 16: Esquema de preparação e deposição do filme de SiO ₂ /Lipase no vidro FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP.	35
Figura 17: Análise termogravimétrica dos compósitos NTCPMZrO ₂ e dos NTCPM puros da Baytubes.	42
Figura 18: Imagem de elétrons retroespalhados obtida por MEV do compósito NTCPM60%/zircônia (a). Espectros EDS de (b) área 1 (escuro) e (c) área 2 (claro).	43
Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão do compósito NTCPM60%/ZrO ₂ em diferentes ampliações.	44
Figura 20: Análise textural dos compósitos NTCPM/ZrO ₂ : Isotermas de adsorção-dessorção de N ₂ .	45
Figura 21: Distribuição de tamanho de poros dos compósitos NTCPM/ZrO ₂ obtida pelo método BJH.	46
Figura 22: Espectro Raman do compósito NTCPM60%/ZrO ₂ . Figura inserida: Espectro Raman dos NTCPM puros da Baytubes.	47

Figura 23: Difratoograma de raios X do compósito NTCPM60%/ZrO ₂ . Figura inserida: Difratoograma de raios X dos NTCPM puros da Baytubes.....	48
Figura 24: Voltamogramas cíclicos comparativos dos EPC com os compósitos NTCPM40%/ZrO ₂ e NTCPM60%/ZrO ₂ na presença de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	49
Figura 25: VC do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ variando as velocidade de varredura de 5 a 300 mVs ⁻¹ em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ (a). Relação linear entre i _{pa} , i _{pc} e v ^{1/2} (b).	51
Figura 26: VC do EPC NTCPM40%/ZrO ₂ variando as velocidade de varredura de 5 a 300 mVs ⁻¹ em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ (a). Relação linear entre i _{pa} , i _{pc} e v (b).	51
Figura 27: Relação linear entre log i _{pa} , log i _{pc} e log v.	53
Figura 28: VC do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ (A) na ausência e (B) na presença de 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4. Velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	54
Figura 29: Representação das reações de oxirredução do MP.....	54
Figura 30: VC obtidos em diferentes velocidades de varredura (5 a 300 mV s ⁻¹) para o EPC NTCPM60%/ZrO ₂ em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4 contendo 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP. Figura inserida: Relação entre i _{pa} , i _{pc} e v.....	55
Figura 31: Relação linear entre log i _{pa} , i _{pc} e log v.	56
Figura 32: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ na presença de 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP com v=20 mV s ⁻¹ em tampão AC, BR e PBS, 0,01 mol L ⁻¹ , todos em pH 7.	57
Figura 33: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ na presença de 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP com v=20 mV s ⁻¹ em PBS, 0,1 mol L ⁻¹ , em pH de 5,8 até 8,0. Figura inserida: Efeito do pH na corrente catódica do pico (a). VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ na presença de 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP com v=20 mV s ⁻¹ em BR, 0,1 mol L ⁻¹ , em pH de 4,0 a 5,0. Figura inserida: Efeito do pH na corrente catódica do pico (b).	58
Figura 34: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ (Curva A) e EPC NTCPM (Curva B) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0 na presença de 99×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP.	59
Figura 35: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4,0 com adições de metil paration 0,01mol L ⁻¹ (a). Relação linear entre i _{pc} e a concentração de MP (19,9×10 ⁻⁶ e 176,8×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) (b).....	60

Figura 36: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4 na presença de 49,8×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP com adições dos íons de Cu ²⁺ (a), de Cl ⁻ (a, b e d), de Ni ²⁺ (b), de Mg ²⁺ (c) de SO ₄ ²⁻ (c) de Na ⁺ (d) e do <i>p</i> NPP (e).	63
Figura 37: VC do EPC NTCPM60%/ZrO ₂ em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4 na presença de 99×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP em solução tampão BR 0,1 M pH 4 em velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	63
Figura 38: Reprodutibilidade do sensor NTCPM60%/ZrO ₂ na presença de 39,810 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP com os valores de corrente catódica representadas em módulo para cada eletrodo.	64
Figura 39: VC dos eletrodos FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ com diferentes porcentagens de silício em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ e KCl 0,1 mol L ⁻¹	65
Figura 40: VC dos eletrodos FTO limpo, FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ e FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP com 3, 5 e 10 mergulhos na dispersão AuNP/DABCOSIL em solução de de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ e KCl 0,1 mol L ⁻¹	66
Figura 41: Espectros de absorção UV-Vis obtido para o os filmes SiO ₂ /ZrO ₂ e SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP sobre o vidro FTO (a). Espectros de absorção UV-Vis obtido para a dispersão AuNP/DABCOSIL (b).	67
Figura 42: Imagens de MEV dos filmes SiO ₂ /ZrO ₂ sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).	67
Figura 43: Imagens de MEV dos filmes SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).	68
Figura 44: Imagens de MEV dos filmes SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).	68
Figura 45: Ângulo de contato da água para o filme SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP (a). Ângulo de contato da água para o filme SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase (b).	69
Figura 46: Espessura dos filmes SiO ₂ /ZrO ₂ , SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP e SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase na superfície do vidro FTO.	70
Figura 47: VC do eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP com 0,54 mg mL ⁻¹ de lipase imobilizada na presença diferentes concentrações de <i>p</i> NPP (0 a 14,6×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) (a). VC do eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP com 0,27 mg mL ⁻¹ de lipase imobilizada na presença diferentes concentrações de <i>p</i> NPP (0 a 14,6×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹) (b).	71
Figura 48: Reação de hidrólise do <i>p</i> -nitrofenil palmitato em <i>p</i> -nitrofenol pela enzima lipase. 71	
Figura 49: VC obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s ⁻¹) para o eletrodo FTO/SiO ₂ ZrO ₂ /AuNP/Lipase em solução tampão PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7 contendo 14,6×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de <i>p</i> NPP (a). Relação entre <i>i</i> _{pa} , <i>i</i> _{pc} e <i>v</i> (b).	72

Figura 50: Relação linear entre $\log i_{pa}$, i_{pc} e $\log v$.	72
Figura 51: EIE do eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase na presença de $24,9 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de TB em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ com KCl 0,1 mol L ⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 6,0 (a); 7,0 (b) e 8,0 (c).	74
Figura 52: Hidrólise da tributirina pela lipase.	74
Figura 53: Comportamento do eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ com KCl 0,1 mol L ⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0 em relação às adições de ácido butírico) 0,01 mol L ⁻¹ (com a lipase ativa). Figura inserida: EIE com eixos ampliados (a). Adições de tributirina 0,01 mol L ⁻¹ (com a lipase inativa) (b).	75
Figura 54: Medidas de EIE para o eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase em solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ com KCl 0,1 mol L ⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,05 mol L ⁻¹ pH 7,0 na presença de $24,9$ a $108,8 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de tributirina 0,01 mol L ⁻¹ . Figura inserida: Circuito equivalente do ajuste de curva resultante para o eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase (a). Relação linear entre ΔR_{CT} e a concentração de tributirina (b).	75
Figura 55: Reprodutibilidade do biossensor FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /AuNP/Lipase na presença de $74,4 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ de TB.	78
Figura 56: Resposta impedimétrica do eletrodo FTO/SiO ₂ /ZrO ₂ /lipase em função da adição de ácido butírico. Figura inserida: Relação linear entre R_{CT} e concentração de ácido butírico (a). Gráfico Lineweaver-Burk (b).	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de TEOS e água utilizados na preparação do Sol- Sílica/Zircônia.	32
Tabela 2: Perda percentual de massa das amostras de NTCPM/ZrO ₂	42
Tabela 3: Análise elementar e valores de área superficial e volume de poros dos compósitos NTCPM60%/ZrO ₂ e NTCPM40%/ZrO ₂	46
Tabela 4: Parâmetros eletroquímicos determinados por VC com velocidade de varredura de 20 mV s ⁻¹	50
Tabela 5: Coeficientes angulares das relações entre log i _p e log v para EPC NTCPM60%/ZrO ₂ em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 4 contendo 291,3×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ de MP.	56
Tabela 6: Comparação de diferentes eletrodos na determinação de metil paration	60
Tabela 7: Comparação de diferentes eletrodos na determinação de triglicerídeos.	76
Tabela 8: Valores de constante de Michaelis-Menten aparente (K _M ^{app}) para diferentes biossensores de tributirina	80

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag/AgCl – Prata/Cloreto de Prata

BET – Método Brunauer, Emmet e Teller

BJH – Método de Barret, Joyner e Hallenda

DRX – Difração de Raios X

SCE – do inglês Satured Calomelan Electrode, Eletrodo de Calomelano Saturado

EIE – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

E_{pa} – potencial de pico anódico

E_{pc} – potencial de pico catódico

EPC – Eletrodo de Pasta de Carbono

FTO – do inglês Fluorine Dopped Tin Oxide, Óxido de Estanho Dopado com Flúor

i_{pa} – corrente de pico anódico

i_{pc} – corrente de pico catódico

K_M^{app} – constante de Michaelis-Menten aparente

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MP – Metil Paration

NTC – Nanotubos de Carbono

NTCPM – Nanotubos de Carbono de Parede Múltipla

*p*NPP – para-nitrofenil palmitato

pNP – para-nitrofenol

SiO₂ – Óxido de Silício ou Sílica

TCO – do inglês Transparent Conducting Oxides, Óxidos Condutores Transparentes

TEOS – do inglês Tetraethyl orthosilicate, Ortosilicato de Tetraetila

TG – Triglicerídeos

TB – Tributirina

VC – Voltametria Cíclica

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

V_{max}^{app} – velocidade máxima aparente

ZrO₂ – Óxido de Zircônio ou Zircônia

RESUMO

Neste projeto foram desenvolvidos materiais nanoestruturados, usando o método sol-gel, para aplicação como sensores e biossensores para determinação de metil paration e tributirina que são analitos de interesse da indústria de alimentos. Primeiramente foram desenvolvidos compósitos com alto teor de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM), utilizados para confeccionar eletrodos de pasta de carbono. O compósito de nanotubos de carbono de paredes múltiplas/zircônia (NTCPM/ZrO₂) foi caracterizado em relação às suas propriedades morfológicas, texturais e eletroquímicas, provando que uma grande quantidade de NTCPM foi incorporada, mantendo suas características. Esses eletrodos foram testados para determinação de metil paration, apresentando sensibilidade de 1,47 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ L}$ e baixo limite de detecção ($9,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). Na sequência, foram desenvolvidos eletrodos a partir da deposição de filmes sobre o vidro FTO (óxido de estanho dopado com flúor) por *dip coating*. Inicialmente filmes finos de sílica/zircônia (SiO₂/ZrO₂) e de silsesquioxano contendo as nanopartículas de ouro foram depositados em seguida a enzima lipase (*Candida rugosa*) foi imobilizada em um filme de sílica (FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase). Através da voltametria cíclica, usando o *p*-nitrofenil palmitato, foi evidenciada a imobilização da enzima. Esse eletrodo foi utilizado como biossensor de tributirina por espectroscopia de impedância eletroquímica apresentando um limite de detecção (LD) de $1,86 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e a sensibilidade foi de $5,37 \times 10^{-6} \Omega \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.

Palavras-chave: Sensor, Biosensor, Sol-Gel, Zircônia, Nanotubos de Carbono, Nanopartículas de ouro, Metil Paration, Tributirina.

ABSTRACT

In this project, nanostructured materials were developed by sol-gel method, for application as sensors and biosensors to determine analytes of interest to the food industry. First, composites with a high content of multi walled carbon nanotubes (MWCNT) were developed and used to make carbon paste electrodes. The composite of multi walled carbon nanotubes/zirconia (MWCNT /ZrO₂) was characterized concerning its morphological, textural and electrochemical properties, proving that a large amount of MWCNT was incorporated, maintaining their characteristics. These electrodes were tested to determine methyl parathion, with a sensitivity of 1.47 $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1} \text{ L}$ and a low detection limit ($9.0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). In sequence, electrodes were developed from the deposition of films on FTO glass (fluorine-doped tin oxide) by *dip coating*. Initially, thin films of silica/zirconia (SiO₂/ZrO₂,) and silsesquioxane containing the gold nanoparticles were deposited, and then the lipase enzyme (*Candida rugosa*) was immobilized on a silica film (FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase). The immobilization of the enzyme was evidenced with cyclic voltammetry using ρ -nitrophenyl palmitate. This electrode was used as tributyrin biosensor by electrochemical impedance spectroscopy with a detection limit (LD) of $1.86 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and the sensitivity of $5.37 \times 10^{-6} \Omega \text{ mol}^{-1} \text{ L}$.

Keywords: Electrochemical Sensor, Electrochemical Biosensor, Sol-Gel, Zirconia, Carbon Nanotubes, Gold Nanoparticles, Methyl Parathion, Tributyrin.

1 INTRODUÇÃO

Os sensores e biossensores eletroquímicos tornaram-se dispositivos importantes em várias áreas como alimentícias, medicinais, ambientais, biológicas, entre outras, por se tratar de um método simples, de baixo custo e com alta especificidade e sensibilidade [1]. Os sensores são uma ferramenta analítica que permite verificar diferenças de concentração do analito, baseando-se em um sinal elétrico fornecido por uma resposta ou reação de uma espécie química [2,3]. No caso dos biossensores eletroquímicos a resposta vem de um componente biológico que pode ser uma enzima, um peptídeo, um anticorpo, um ácido nucleico, entre outros [2,4].

Existem diferentes tipos de dispositivos eletroquímicos, como os sensores e biossensores amperométricos [5], fotoeletroquímicos [6], impedimétricos [7] e voltamétricos [8]. Estes podem ser aplicados em diversas análises da indústria de alimentos como no processamento, no monitoramento, na garantia de qualidade e segurança dos alimentos [9]. Tais dispositivos apesar de apresentarem, de modo geral, boa especificidade e sensibilidade, podem ser aprimorados com eletrocatalisadores e nanoestruturas [1], como nanotubos de carbono e as nanopartículas de ouro. Essas nanoestruturas quando aplicadas nos sensores e biossensores melhoram a transferência de elétrons, a especificidade, a relação sinal/ruído e também aumentam a área eletroativa, consequentemente melhoram o desempenho analítico, além de permitir a incorporação de biomoléculas, como as enzimas [10].

Diante do exposto, o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos aplicados na indústria de alimentos têm se tornado uma alternativa em relação às técnicas tradicionais que utilizam a espectroscopia e experimentos químicos para o monitoramento e análise de alimentos. Esses dispositivos trazem respostas seletivas, em tempo real e com baixo custo [9]. Os dispositivos eletroanalíticos são passíveis de muitas possibilidades de design e tipos, e as pesquisas nessa área estão centradas na procura de dispositivos que sejam cada vez mais seletivos e sensíveis para as diversas demandas [11–13].

Nesse sentido, esse trabalho visa desenvolver duas propostas de design de sensores e biossensores eletroquímicos utilizando o método sol-gel que permite a preparação de sensores em várias formas como pós, monolitos e filmes. Com esse método é possível sintetizar sistemas baseados em matrizes diversas com características apropriadas para construção de sensores eletroquímicos, como alta estabilidade, porosidade adequada que permite a imobilização de catalisadores para aplicações químicas, entre outros [14]. Adicionalmente devido às reações em fase líquida e em baixa temperatura que ocorrem no processo sol-gel, é possível a inclusão de polímeros, moléculas orgânicas, células, enzimas, nanoestruturas entre outros [15–18] para

obtenção de revestimentos inorgânicos ou híbridos que são de interesse na construção de biossensores [19].

A primeira proposta é a preparação de um compósito contendo alto teor de nanotubos de carbono de paredes múltiplas em uma matriz de zircônia (NTCPM/ZrO₂), que foi utilizado na confecção de um eletrodo pasta de carbono. Esse tipo de compósito ainda não foi utilizado na preparação de sensores eletroquímicos. A segunda proposta é o desenvolvimento de uma plataforma baseada na deposição de uma sequência de filmes sobre eletrodos de vidro FTO (óxido de estanho dopado com flúor) na qual é depositado um filme fino de sílica/zircônia, após um filme fino de silsesquioxano contendo nanopartículas de ouro e finalmente um filme contendo enzima lipase.

Tendo em vista que a zircônia é um óxido de metal de transição que apresenta alta seletividade e capacidade de troca iônica, torna-se um material adequado para aplicação em catálise, separação e sensores [20–24]. A seletividade do óxido de zircônio está relacionada aos sítios ácidos e básicos de Lewis que ele possui. Quando materiais contendo óxidos de metal de transição são sintetizados pelo método sol-gel, formando uma estrutura mesoporosa, eles apresentam ótimas propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas [25,26] e os NTC podem melhorar ainda mais as propriedades mecânicas e a condutividade desses óxidos [27–29]. Os nanotubos de carbono possuem características como alta condutividade elétrica, térmica, resistência mecânica, resistividade/estabilidade térmica, além de apresentar sensibilidade para detectar biomoléculas em baixas concentrações e sob condições ambientais, que favorecem sua aplicação para fabricação de sensores [30].

Neste trabalho o eletrodo do tipo pasta de carbono, confeccionado com o compósito de NTCPM/ZrO₂, foi planejado para ser utilizado na determinação de um pesticida organofosforado (OP), o metil paration. Apesar dos pesticidas OP serem classificados como pesticidas persistentes, que causam danos ambientais, ainda são amplamente utilizados em muitos países, resultando em contaminação de alimentos e da água, causando sérios riscos à saúde humana. Como os pesticidas OP são potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, levando a toxicidade colinérgica grave em caso de inalação, exposição cutânea ou ingestão [31], seu monitoramento ainda é necessário.

Outro tipo de design proposto é a utilização de vidros FTO que pertencem ao grupo de vidros condutores TCO (óxidos condutores transparentes), pois apresentam boa estabilidade térmica e química [32]. Os TCOs são materiais que conduzem eletricidade, são transparentes a luz visível e geralmente são preparados com a tecnologia de filmes [33]. Neste trabalho foi

depositado sobre o vidro FTO um filme fino de sílica/zircônia cuja solução foi obtida pelo método sol-gel. Posteriormente foram depositados filmes finos de uma dispersão de nanopartículas de ouro em um silsesquioxano iônico e então foi imobilizada nessa superfície um filme de sílica contendo a enzima lipase (*Candida rugosa*). Após essas etapas, a proposta é utilizar o vidro FTO para determinação de triglicerídeos. Essas substâncias quando em altos níveis na alimentação estão relacionadas à doença cardíaca coronária, aterosclerose e hiperlipidemia [34].

Dessa forma, o objetivo deste trabalho consiste em desenvolver materiais nanoestruturados a partir de uma matriz de zircônia obtida pelo método sol-gel para desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos. Têm-se como objetivos específicos:

- Produzir um eletrodo do tipo pasta de carbono com o compósito de NTCPM em matriz de zircônia e usá-lo como um sensor de metil paration;
- Depositar em vidros condutores FTO filmes finos de sílica/zircônia, filmes de silsesquioxano contendo nanopartículas de ouro utilizando o método sol-gel para obter os sols e o método *dip coating* para formar filmes sobre os eletrodos que irão servir de base para imobilizar um filme de enzima;
- Desenvolver um biossensor para triglicerídeos, imobilizando a enzima lipase (*Candida rugosa*) sobre o vidro condutor FTO com filmes depositados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SENSORES E BIOSSENSORES

Sensores e biossensores são dispositivos que fornecem uma resposta relacionada à quantidade de uma espécie química. Esses dispositivos possuem três elementos principais: um receptor /bioreceptor, um transdutor e um sistema de processamento de sinal. Sendo que o receptor/bioreceptor que detecta o analito específico, está imobilizado na superfície do eletrodo e o transdutor é responsável por converter o sinal da reação em um sinal elétrico. Dependendo do sinal, os sensores e biossensores podem ser considerados eletroquímicos, ópticos, termométricos e piezoelétricos e podem detectar um analito líquido, gasoso ou sólido. No entanto, os biossensores são classificados em um grupo independente de sensores. Esses dispositivos podem ser aplicados tanto para análises de matrizes biológicas, como não biológicas. Já os sensores, que não possuem uma estrutura biológica de reconhecimento, não

são considerados biossensores, ainda que utilizados em sistemas biológicos. Dentre os sensores e biossensores, os eletroquímicos se destacam por sua simplicidade, capacidade de detecção e baixo custo [4].

O interesse da indústria de alimentos, da medicina, entre outras, em sensores e biossensores eletroquímicos tem aumentado devido ao surgimento de novas opções de projeto e construção dos eletrodos, que apresentam a possibilidade de incorporação de micro eletrodos, eletrodos quimicamente modificados em vários sistemas de sensores altamente sensíveis [4]. O uso desses dispositivos tem sido útil, pois quando comparados com métodos tradicionais, eles oferecem melhor sensibilidade e estabilidade [9].

A importância do desenvolvimento de sensores para detecção de pesticidas organofosforados (metil paration, malaoxon, malation, paraoxon, entre outros) está relacionada à alta toxicidade e persistência no ambiente dessas substâncias. Estes pesticidas são responsáveis por causar contaminação de fontes de água, solo e alimentos. Eles atuam como inibidores da enzima colinesterase no corpo humano e animal, que acarreta em neuropatia periférica, trata-se de um dano que pode acometer diferentes nervos, prejudicando a função do órgão e causando problemas de saúde relacionados ao tipo de nervo afetado [35].

Na literatura são reportados sensores para metil paration (MP) desenvolvidos com materiais à base de nanotubos de carbono (NTC) [8,35–40]. Wu e colaboradores [36] construíram um sensor de carbono vítreo modificado com nanocompósitos que foi obtido baseado na tecnologia de impressão molecular e na tecnologia eletroquímica para MP. O desempenho de condução e os locais eficazes de impressão foram aprimorados por um nanocompósito de NTC decorados com nanopartículas de ouro. Em estudo realizado por Huang et al. [37] um eletrodo de carbono vítreo foi modificado com um nanocompósito de paládio e nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) para detecção de MP. Em outro trabalho, desenvolvido por Zeng et al. [8], foi obtido um sensor para detectar MP baseado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo por um filme de nanocompósito de NTCPM e poli (acrilamida), o sensor exibiu uma alta adsorção e forte afinidade para MP. Dong e coautores [40] desenvolveram um nanocompósito à base de NTCPM, óxido de cério e ouro que foi sintetizado por um método de precipitação em duas etapas para modificar um eletrodo de carbono vítreo. Eles combinaram as propriedades individuais de cada componente como a condutividade elétrica, capacidade de adsorção dos nanotubos de carbono e as propriedades catalíticas e eletrônicas das nanopartículas de ouro e por fim forte afinidade por grupos fosfato do óxido de cério.

Nesse contexto, novas propostas de desenvolvimento de sensores eletroquímicos para metil paration, mais simples, estáveis e com baixo limite de detecção ainda são necessárias. Sendo assim, os materiais cerâmicos com alto teor de NTCPM em matriz de zircônia são promissores para o uso em sensores de metil paration como proposto no presente trabalho.

No que se refere aos biossensores eletroquímicos, os pioneiros na utilização de biossensores eletroquímicos foram Clark e Lyons nos anos 60 [41]. Nos biossensores eletroquímicos, a resposta será obtida a partir da interação entre a biomolécula e o analito, que irá gerar uma corrente amperométrica, um potencial, um acúmulo de carga potenciométrica ou alterar a impedância de um meio entre os eletrodos ou as propriedades condutivas [42].

Os biossensores baseados em enzimas, DNA, tecidos, imunossensores, entre outros, têm sido os mais utilizados, sendo que o primeiro biossensor enzimático foi relatado por Updike e Hicks em 1967 [43]. As principais enzimas utilizadas são as oxiredutases, peroxidases, amino oxidases e as oxidases, que são imobilizadas no suporte por forças de van der Waals, ligação covalente ou ligação iônica e aprisionamento [9]. O desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos tem avançado na última década, e embora já existam inúmeros dispositivos com diferentes finalidades, ainda há muito espaço para estudos que visem o aperfeiçoamento desses dispositivos.

Os distúrbios clínicos causados por níveis elevados de triglicerídeos (TG) são bem conhecidos e estão aumentando, com isso os meios de diagnósticos e análise clínica da detecção de TG em urina, sangue e alimentos vem se tornando cada vez mais importantes [44]. Por essa razão existem na literatura vários biossensores reportados para detecção de triglicerídeos (TG) [44–48].

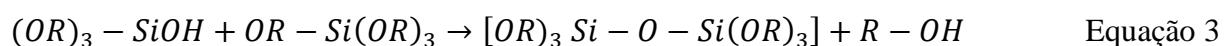
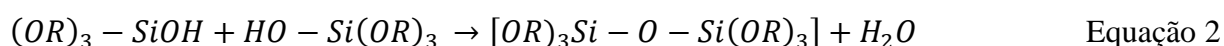
Rezvani et al. [45] construíram um biossensor para TG baseado na imobilização da lipase em carbono ativado funcionalizado com uma amina. Esse material foi então depositado no eletrodo de grafite e a estabilização da enzima imobilizada foi alcançada por meio de um filme de quitosana. Solanki e colaboradores [46] sintetizaram um nanocompósito de quitosana e óxido de zircônio, que foi depositado eletroforicamente em vidros revestidos com óxido de índio e estanho para a detecção de tributirina. As enzimas lipase e glicerol desidrogenase foram imobilizadas neste eletrodo. No trabalho desenvolvido por Kartal et al. [48], a lipase foi imobilizada em um eletrodo de vidro por meio de uma membrana de gelatina reticulada com glutaraldeído. Os autores reportam que o funcionamento do biossensor, que se baseia na variação do pH que ocorre devido à hidrólise enzimática da tributirina em ácido butírico. Yücel et al. [49] propuseram um biossensor amperométrico para detecção de triglicerídeos construído

com três enzimas, glicerol quinase (E.C.2.7.1.30), glicerol-3-fosfato oxidase (E.C.1.1.3.21) e lipase (E.C.3.1.1.3), que foram co-imobilizadas individualmente na superfície de um eletrodo de carbono vítreo utilizando uma membrana de gelatina e glutaraldeído como reticulante.

Como mencionado acima, alguns dos biossensores são obtidos a partir da imobilização de mais de uma enzima na detecção de triglicerídeos. No entanto, a proposta deste trabalho é desenvolver de um biossensor contendo somente a lipase aprisionada em um filme de sílica sobre a superfície do vidro FTO já contendo filmes de um compósito à base de sílica e zircônia e nanopartículas de ouro. A proposta do biossensor de triglicerídeos neste projeto é baseada no uso da lipase, que é uma hidrolase, ou seja, que não apresenta comportamento de oxidação e redução. O biossensor obtido somente com a lipase imobilizada, depende da detecção indireta do analito, que pode ser alcançada por meio de técnicas que não necessitem do processo de oxirredução, como por exemplo, a espectroscopia de impedância eletroquímica (a utilização da técnica será detalhada no item 2.5.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica). As enzimas possuem um alto custo, por isso é preferível construir biossensores com apenas uma enzima imobilizada [45].

2.2 MÉTODO SOL-GEL

O processo sol-gel baseia-se na conversão de um sol líquido em uma fase gel por uma série de reações de hidrólise e condensação de seus precursores [50]. Os reagentes precursores para a síntese dos géis inorgânicos são geralmente alcóxidos que podem ser de silício ou de metais, como zircônio, alumínio e titânio que se encontram inicialmente dissolvidos nesse líquido [51]. Esse método utiliza temperaturas amenas na formação de uma rede polimérica por meio de reações de policondensação [50]. As reações de hidrólise (Equação 1) e condensação (Equações 2 e 3) para precursores alcoóxidos de silício no processo sol-gel são apresentadas a seguir [52,53]:



A primeira etapa ocorre em solução, o alcóxido (-OR) é hidrolisado e há formação dos grupos silanóis (Si-OH). Na próxima etapa ocorre a formação de um sol, onde as partículas ou cadeias primárias estão dispersas na fase líquida. Os grupos silanóis se polimerizam por

condensação formando os siloxanos (Si-O-Si) e à medida que a condensação vai acontecendo, a viscosidade aumenta e há a formação de um gel coloidal ou polimérico que posteriormente se solidifica após a evaporação do solvente [50,53]. Essa reação não se completa em temperatura ambiente, formando assim um material amorfo, poroso com a superfície revestida de grupos silanóis devido às reações de condensação incompletas. Na Figura 1 é mostrada a estrutura química do óxido de silício sintetizado por sol-gel usando o precursor tetraetil ortosilicato (TEOS).

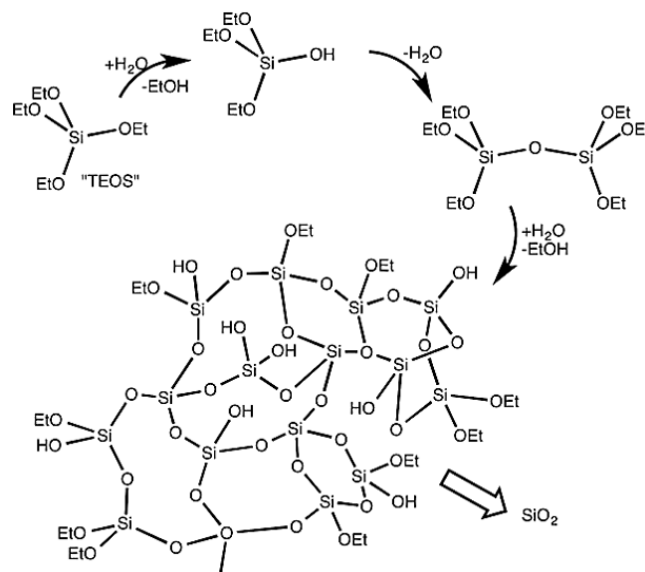


Figura 1: Estrutura química do óxido de silício obtido por sol-gel [54].

O precursor da sílica mais usado no método sol-gel tem sido o TEOS uma vez que é uma substância ecologicamente correta, tendo como único subproduto da reação o etanol. Os materiais sintetizados com TEOS apresentam boas propriedades mecânicas e por isso têm sido empregados em adesivos, revestimentos, catalisadores, materiais eletrônicos e sensores [55]. Esse precursor forma redes mais robustas com reatividade moderada e alto grau de controle, onde variações simples nas condições de síntese, como na temperatura, pH, catalisadores e aditivos permitem obter sílicas com diferentes tamanhos e formatos, como monolitos, filmes, fibras e pós, aumentando a gama de aplicações. É possível obter óxidos de diferentes metais como alumínio, zinco, zircônio ou mesmo óxidos mistos, usando-se os precursores adequados. A Figura 2 apresenta um esquema com as etapas de uma síntese sol-gel e algumas de suas aplicações.

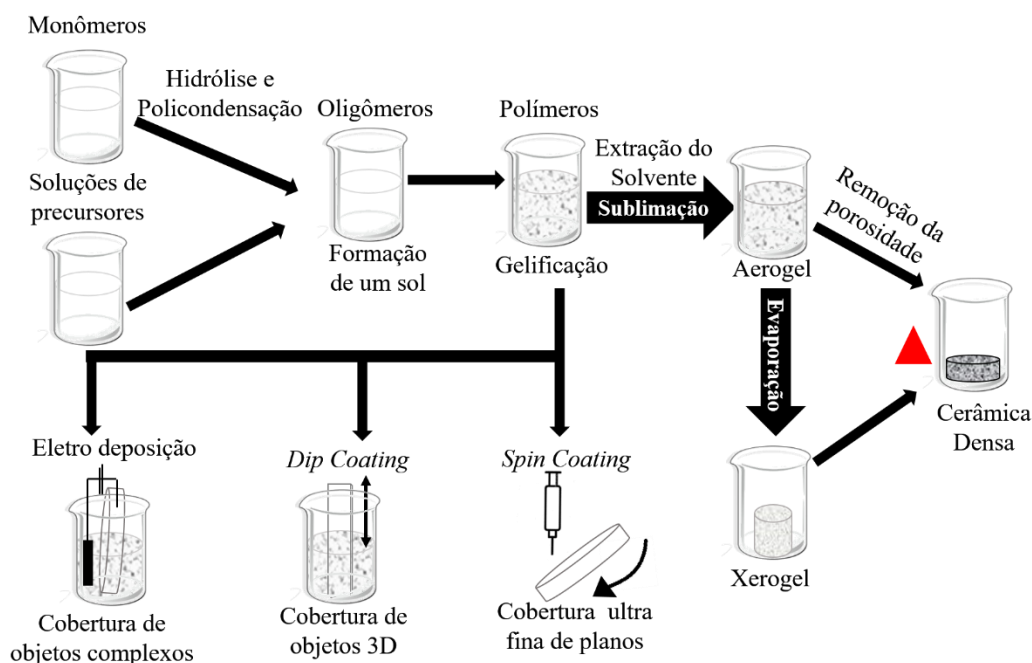


Figura 2: Etapas do processo sol-gel e a versatilidade de suas aplicações [15].

Em relação a porosidade desses materiais, os tamanhos de poros formados têm sua classificação definida segundo a IUPAC. Os materiais microporosos apresentam poros de até 2 nm, os mesoporosos de 2 a 50 nm e os macroporosos acima de 50 nm [56].

Usando o método sol-gel é possível sintetizar sistemas baseados em matrizes de sílica ou outros óxidos metálicos com características apropriadas para construção de sensores eletroquímicos. Esses materiais apresentam ótimas propriedades como alta estabilidade, rigidez física (para compactação em forma de discos ou obtenção de monólito), porosidade adequada que permite a imobilização de catalisadores para aplicações químicas [14]. Ainda devido às reações em fase líquida e em baixa temperatura que ocorrem no processo sol-gel, é possível a inclusão de polímeros, moléculas orgânicas, células, nanoestruturas entre outros [15,16] para obtenção de revestimentos inorgânicos ou híbridos que são de interesse na construção de sensores e biossensores [19].

São mencionados na literatura, vários trabalhos utilizando a técnica sol-gel para obtenção de compósitos e filmes, usados na modificação de eletrodos para construção de sensores e biossensores. Sinha et al. [57] reportaram em seu estudo a imobilização da enzima acetilcolinesterase em uma matriz sol-gel de óxido de zinco depositada em eletrodos impressos, utilizada como um sensor amperométrico na detecção de pesticidas organofosforados. Du et al. [58], em seu trabalho construíram um biossensor para pesticidas organofosforados. Os autores utilizaram um eletrodo de carbono vítreo com a enzima acetilcolinesterase imobilizada. O

eletrodo foi modificado com um compósito de sílica derivado do sol-gel e contendo nanopartículas de ouro. Esse material forneceu um microambiente biocompatível para a enzima, servindo para estabilizar sua atividade e também evitou que ela saísse da interface. Raghu e colaboradores [59] também utilizaram a enzima acetilcolinesterase. Porém, em seu estudo a enzima foi imobilizada em um filme de sílica obtido por sol-gel a fim de modificar um eletrodo de pasta de carbono e usá-lo na detecção de metil paration e acefato. Lillo-Ramiro et al. [60] sintetizaram filmes de óxido de cobre pelo método sol-gel. Os filmes foram depositados em substratos de silicone pela técnica de deposição *spin coating*. O material obtido foi usado como sensor para a glicose. O óxido de cobre sofre oxidação em contato com glicose, formando o ácido glucônico. Dessa forma os filmes de óxido de cobre apresentaram-se adequados para serem usados como sensor não enzimático na detecção de glicose.

Neste trabalho o método sol-gel será utilizado tanto para obtenção do compósito contendo um alto teor de NTCPM com zircônia (utilizado como sensor para metil paration), quanto para a formação de filmes na superfície do vidro FTO com sílica e zircônia, assim como na etapa de imobilização da enzima.

2.2.1 Compósito à Base de Nanotubos de Carbono e Zircônia

Os nanotubos de carbono (NTC) são estruturas cilíndricas com nanômetros de diâmetro e muitos micrômetros de comprimento [61]. São formados por uma camada de carbonos trigonais hibridizados do tipo sp^2 com estrutura hexagonal enrolada em forma de um tubo oco e podem ser de parede simples ou de paredes múltiplas (NTCPM). No caso dos NTCPM, são estruturas formadas por múltiplos tubos concêntricos que rodeiam um ao outro e dependendo da sua quiralidade são classificados em alótropos metálicos ou semicondutores [62].

Os NTC foram descobertos em 1991 [63] e desde então as pesquisas sobre eles têm aumentado consideravelmente. Isso se dá principalmente no uso de NTC para obtenção de eletrodos [64–67] pois contribuem para melhorar as propriedades eletrônicas. Na sua presença, as reações de transferência de elétrons, apresentam correntes mais altas e sobre tensões mais baixas [62,68] e a cinética de transferência de elétrons é mais rápida que nos eletrodos de carbono tradicionais. Essas características resultam em sensores com baixo limite de detecção em matrizes complexas e com maior sensibilidade quando o analito está em baixas concentrações. No entanto, muitos fatores influenciam a elaboração de um bom sensor de NTC. Por exemplo, a modificação da superfície dos NTC, o pré-tratamento dos nanotubos, a adição de mediadores de elétrons e o método de fixação do eletrodo. As propriedades físicas e

catalíticas também tornam os NTC ideais para o uso em sensores, pois apresentam estabilidade química, alta condutividade e resistência mecânica [69].

Além disso, os NTC são considerados um excelente reforço para os óxidos de metal de transição, e são uma ótima alternativa para síntese de compósitos [70,71]. Quando materiais contendo óxidos de metal de transição são sintetizados, de forma com que tenham uma estrutura mesoporosa, eles apresentam ótimas propriedades eletrônicas, ópticas e catalíticas [25,26] e os NTC podem melhorar ainda mais as propriedades mecânica, elétrica e a condutividade desses óxidos [27–29]. Dentre os óxidos de metal de transição, destaca-se o óxido de zircônio (ZrO_2) devido a sua alta seletividade e capacidade de troca iônica, que o torna um material adequado para aplicação em catálise, separação e sensores [20–24], além disso o óxido de zircônio possui sítios ácido e básico fracos, o que o torna mais seletivo para adsorção [72,73].

Recentemente foi publicado por Chang et al. [74] um sensor para H_2O_2 . Os autores utilizaram nanopartículas de zircônia, poli (azul de toluidina) e gelatina funcionalizada com NTCPM para formação de filmes sobre um eletrodo de carbono vítreo. Wang et al. [24], sintetizaram um compósito mesoporoso com NTCPM e ZrO_2 por um processo hidrotermal utilizando um surfactante catiônico resultando na formação compósito com importante valor aplicacional devido à excelente condutividade elétrica, estrutura oca unidimensional e grande área superficial. Dos Santos e colaboradores [71] prepararam um compósito contendo aproximadamente 40% de NTCPM dispersos em uma matriz de ZrO_2 pelo método sol-gel. Os pesquisadores obtiveram um material, com alta área superficial, boa condutividade e poroso.

Neste contexto, produzir um sensor com um compósito de NTCPM e zircônia, obtido por sol-gel, torna-se interessante. Sendo possível combinar de forma sinérgica as propriedades físico-químicas pertencentes aos seus precursores assim como obter novas propriedades devido ao tamanho reduzido dos domínios que o constituem [51]. Na presente tese a zircônia será utilizada como matriz para os NTCPM, que por sua vez serão dispersos em uma solução aquosa contendo o estearato de amônio como dispersante. Dessa forma, o nanocompósito obtido pelo método sol-gel irá conter as características da zircônia e dos NTCPM, e será usado para confecção de um sensor para detecção do pesticida metil paration.

2.2.2 Óxidos Mistos de Sílica/Zircônia Aplicados para Formação de Filmes

Dentre muitos sólidos com inúmeras aplicações, os óxidos mistos são materiais com capacidade para combinar as propriedades mecânicas e químicas dos óxidos que os constituem. Existem muitos métodos empregados para a síntese desses materiais. Entre eles estão as rotas

hidrotermais, co-precipitação, a via do oxalato, processos sonoquímicos e o sol-gel, que vem sendo bastante usado por resultar em materiais homogêneos [75].

No processo sol-gel, o propóxido de zircônio hidrolisado reage com os grupos hidroxilas do TEOS também hidrolisado para formar dímeros e oligômeros com ligações Si-O-Zr [76]. A estrutura química de um compósito de sílica/zircônia ($\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$) é mostrada na Figura 3.

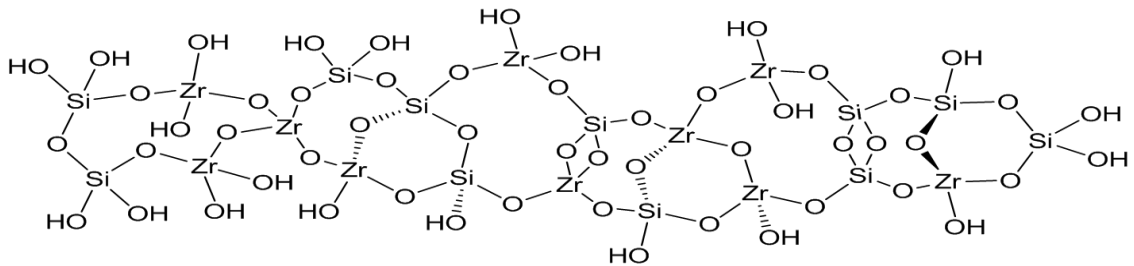


Figura 3: Estrutura química do compósito sílica/zircônia.

Os materiais formados pela sílica pura ou de sistemas formados por dois componentes como $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ possuem boa resistência mecânica, além de ótimas propriedades ópticas [77]. Esses sistemas formados pela incorporação de zircônia em matrizes de sílica resultam em materiais amorfos ou com cristalização incipiente [75,77–79]. A sílica limita as mudanças estruturais quando eles são aquecidos, fornecendo uma estrutura isotrópica que permite uma variedade de composições, sendo que o material formado a partir de sílica/zircônia é relativamente inerte e inofensivo [76].

Os sols produzidos a partir de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ podem ser usados como revestimentos e quando depositados em substratos, podendo criar películas finas [77]. As técnicas de deposição de filmes *dipping*, *spraying* e *spinning* permitem o revestimento de uma ampla variedade de substratos e geometrias complexas [19]. Dentre elas, a técnica *dip coating* possui vantagens por ser um processo simples, ocorrer em baixa temperatura, permite uniformidade de deposição e apresenta configuração econômica, no que diz respeito ao equipamento utilizado. Este possui uma construção simples. A técnica se resume em três etapas: mergulhar, remover e secar. Além dessas vantagens, a quantidade e espessura dos filmes podem ser controladas pelo número de mergulhos, concentração da suspensão ou variando a velocidade dos mergulhos [80,81]. Essa técnica permite a modificação de superfícies, como vidros condutores, para confecção de eletrodos para biossensores.

No que diz respeito a filmes de óxidos, eles podem ser mesoporosos, apresentando-se como materiais com propriedades interessantes, sendo adequados para revestimentos avançados na obtenção de dispositivos optoeletrônicos, sensores, entre outros [82,83]. Alguns

estudos sobre filmes finos de ZrO_2 , derivados de sol-gel, mostram que esses materiais possuem natureza porosa. Kumar e Reddy [84] sintetizaram por sol-gel, filmes finos de ZrO_2 mesoporoso utilizando como catalisador o ácido clorídrico, e o depositaram sobre um substrato de vidro pela técnica *dip coating*. A característica amorfa e mesoporosa dos filmes foi verificada por microscopia eletrônica de transmissão. Soller-Illia e coautores [82] sintetizaram de forma reprodutível filmes finos mesoporosos com uma estrutura mista de sílica/zircônia. A deposição dos filmes foi feita em substratos de vidro, folhas de polímero (celulose acetato) ou pastilhas de silício por *dip coating*. Wu e Sheng [85] obtiveram membranas de ZrO_2 com estrutura porosa usando o processo sol-gel. Os autores utilizaram o ácido acético como um ligante quelante para minimizar a aglomeração de zircônia e estabilizar o processo de hidrólise-condensação.

Além disso, a obtenção de filmes pelo método sol-gel oferece vantagens como fácil fabricação, controle químico e microestrutural. Os filmes e camadas derivadas do processo sol-gel apresentam alta área de superfície específica e também uma superfície externa que permite funcionalização por biomoléculas [15]. Batra e colaboradores [86], descreveram um método para a construção de um biossensor eletroquímico altamente sensível para a detecção de bilirrubina. O biossensor foi construído imobilizando covalentemente a bilirrubina oxidase em um compósito de nanopartículas de sílica revestidas de zircônia/quitosana, eletrodepositado em um eletrodo de ouro. Argüello et al. [14] reportaram um eletrodo construído a partir de um compósito contendo o azul de metileno imobilizado em uma matriz de sílica/zircônia fosforilada. O material obtido foi misturado com grafite e pressionado para confecção de discos. A síntese ocorreu pelo método sol-gel e o eletrodo oxida eletrocataliticamente a dopamina, o ácido ascórbico e ácido úrico.

Filmes de sílica/zircônia têm sido pouco explorados na construção de sensores e biossensores [87–89]. Dessa forma se pretende explorar as propriedades desse óxido misto na construção de dispositivos para a quantificação dos analitos já citados. Neste trabalho, filmes finos de SiO_2/ZrO_2 serão depositados na superfície de eletrodo de vidro FTO. Esse tipo de eletrodo abre possibilidades de desenvolvimento de sensores para vários analitos, pois a zircônia, devido às suas propriedades químicas, pode ser modificada com diferentes espécies eletroativas.

2.2.3 Nanopartículas de Ouro

Os nanomateriais metálicos possuem propriedades elétricas, catalíticas e ópticas únicas que atraem a atenção para o uso em tecnologia de sensores. Dentre as nanopartículas metálicas,

destacam-se as de ouro, de prata, de platina, de níquel, de cobre, de ferro e de cobalto, visto que elas apresentam condutividade, estabilidade, biocompatibilidade, atividade eletrocatalítica e alta área superficial [66].

As nanopartículas de ouro (AuNP), são de grande interesse na modificação de eletrodos para sensores e biossensores. Além das propriedades apresentadas pelas nanopartículas metálicas, as AuNP, quando incorporadas em eletrodos, aumentam a condutividade e transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e os centros redox [36,66,90,91]. Além disso, fornecem uma maior quantidade de locais eletroativos disponíveis para acomodar analito, [92] apresentam alta área superficial [93] e também diminuem o sobrepotencial requerido em respostas eletroquímicas [58,94]. Devido a todas essas características descritas, as nanopartículas de ouro têm sido aplicadas em áreas como nanomedicina, biodeteção, fotocatalise dentre outros campos [44].

Para o presente trabalho, as AuNP serão dispersas e aplicadas em forma de filmes na superfície do vidro FTO já contendo o filme de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$. Tem-se como objetivo, melhorar as propriedades do FTO e facilitar a incorporação da enzima lipase. Para conseguir a dispersão das AuNP, será utilizado um silsesquioxano iônico como agente estabilizante, controlador de tamanho e de adesão das AuNP. Este material foi desenvolvido pelo Laboratório de Sólidos e Superfícies (LSS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Figura 4). Para obtenção dos silsesquioxanos iônicos é realizada a policondensação de seus precursores organosilanos iônicos pelo método sol-gel [95,96]. Os principais precursores são o cloreto de 1-azonia-4-azabicyclo[2,2,2]octano [97] e o cloreto de 1,4 diazoniabicyclo[2,2,2]octano [98]. Os silsesquioxanos formam ligações estáveis de Si-O-Si em sua estrutura [99]. A sua solubilidade em água e solventes polares e a interação dos grupos SiO-H, existentes nos silsesquioxanos, permite o recobrimento de matrizes inorgânicas como alumina, sílica, titânia e vidros, formando filmes estáveis [100]. Dessa forma, proporciona às matrizes, as propriedades de troca iônica pertencentes aos grupos orgânicos [100,101].

Este material vem sendo utilizado pelo grupo para várias aplicações. A combinação das propriedades dos seus componentes orgânicos e inorgânicos permite ao mesmo ser utilizado na formação de filmes em superfícies [101–103], como modificador de eletrodos [104] e para estabilização de nanopartículas metálicas [95].

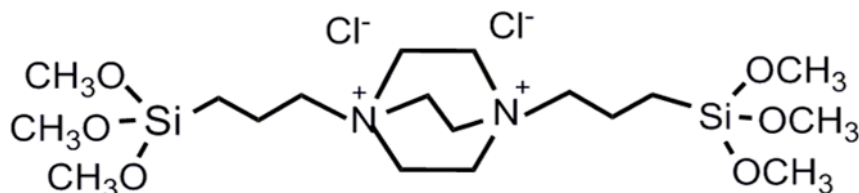


Figura 4: Silsesquioxano contendo o grupo catiônico 1,4 diazoniabicyclo[2,2,2]octano.

Podemos destacar alguns trabalhos na literatura sobre biossensores para triglicerídeos obtidos com eletrodos modificados com nanopartículas de ouro. Phongphut e coautores [105] desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção de triglicerídeos. Foi utilizado um nanocompósito baseado em ouro e poli (3,4-etilenodioxitiofeno) poli (estireno-sulfonato) para modificar eletrodos impressos. As enzimas lipase, glicerol-3-fostato oxidase e glicerol quinase foram co-imobilizadas. Os autores reportaram que as nanopartículas de ouro melhoraram significativamente as respostas eletroquímicas. No trabalho publicado por Wu et al. [106] foi fabricado um biossensor para triglicerídeos baseado na modificação de um eletrodo de carbono vítreo com um biocompósito de lipase e ouro nanoporoso. O biossensor apresentou excelente sensibilidade, seletividade, estabilidade e habilidade anti-interferente. Zhang et al. [93] desenvolveram um biossensor contendo AuNP, que apresentou excelente desempenho de detecção. O eletrodo foi construído com base em um híbrido de polidopamina e nanopartículas de ouro depositado em vidro condutor ITO e usado na detecção de tributirina.

2.2.4 Imobilização de Enzima para Biossensores

A definição de imobilização enzimática pode ser expressa como o confinamento das moléculas de enzima em uma matriz/suporte. A imobilização pode ser feita através de ligações químicas entre a enzima e o suporte ou o aprisionamento na matriz [107]. O encapsulamento biomolecular em matrizes de sílica derivadas de sol-gel foi relatado pela primeira vez em um estudo publicado por Braun et al. [108] que aprisionou enzimas em matrizes de TEOS. A imobilização enzimática em materiais sol-gel requer uma menor quantidade de enzima quando comparado com a imobilização covalente via glutaraldeído, pois a atividade enzimática é preservada devido à ausência da formação de ligações químicas [57].

A tecnologia de imobilização de enzimas solucionou problemas como a estabilidade das enzimas, perdas de atividade, reduziu o tempo de resposta enzimática e proporcionou a utilização de dispositivos que são facilmente manipulados, tanto em sistemas estacionários ou de fluxo [107]. Também se tem mostrado importante em áreas como a ciência biomédica, a biotecnologia e na produção de biossensores [109].

Os biossensores enzimáticos são alternativas eficientes na detecção de vários analitos pois apresentam alta seletividade [48,110–112]. Neste trabalho, o interesse está na construção de um biossensor enzimático para detecção de triglicerídeos. Nesse sentido, a principal enzima usada nos biossensores para detecção desse analito é a lipase. A resposta desses dispositivos é baseada na reação dessa enzima com um substrato, que nesse caso é um triglicerídeo, que formam glicerol e ácidos graxos [105].

As enzimas lipases também nomeadas triacilglicerol éster hidrolases (EC 3.1.1.3), catalisam a hidrólise da ligação de éster carboxílico em tri, di e monoacilgliceróis e os ácidos graxos que são os principais constituintes de gorduras e óleos animais, vegetais e microrganismos [48,113]. Outras reações de bioconversão em solventes orgânicos também são catalisadas pelas lipases como esterificação, hidrólise, transesterificação, acidólise e aminólise [113]. As lipases possuem inúmeras aplicações industriais que incluem produção de biodiesel, perfumaria, cosméticos, determinação biocatalítica de produtos farmacêuticos, empresas de nutrição e sabor, produção de biossensores, entre outras [48,113]. Quase todas as células produzem a lipase, no entanto, as lipases produzidas por micro-organismos são amplamente utilizadas por possuir aplicações mais práticas devido a fácil modificação das propriedades e dos baixos custos de produção.

Dentre as várias fontes de lipase, a obtida a partir do microrganismo *Candida rugosa* tem sido bastante utilizada por ter ampla especificidade e alta atividade, tornando-se ideal para aplicação em biossensores [113]. Zehani et al. [110] constataram em seu trabalho que a lipase *Candida rugosa* apresentou melhor sensibilidade e limite de detecção para diazinon quando comparada com os resultados obtidos com a lipase pâncreas suíno. Califano e colaboradores [112] escolheram a lipase *Candida rugosa* pois ela apresenta especificidade posicional (que é a capacidade de atuar em todas as ligações glicéridicas, independentemente de sua posição). Eles utilizaram a técnica de laser pulsado matriz-assistido, para depositar a lipase no substrato.

Assim, na presente tese, a lipase (*Candida Rugosa*) foi escolhida para ser imobilizada no vidro FTO utilizando uma matriz de sílica e ser usada na construção de um biossensor de triglicerídeos.

O Quadro 1 traz uma relação de biossensores produzidos com a lipase *Candida rugosa*.

Quadro 1: Biossensores desenvolvidos com a Lipase *Candida rugosa*

Lipase utilizada	Finalidade do biossensor
Lipase de <i>Candida rugosa</i> (EC 3.1.1.3)	Detecção de tributirina e pesticida [48]
	Determinação de metil paration [114]
	Análises de alimentos [115]
	Detecção de diazinon [110]
	Detecção malation [111]
	Detecção de pesticida [116]
	Detecção de β -ésteres hidroxiácido e triglicerídeos [112]
	Detecção de triglicerídeos [49]

2.3 VIDRO CONDUTOR FTO (ÓXIDO DE ESTANHO DOPADO COM FLÚOR)

Óxidos condutores transparentes (TCO) são materiais condutores e ópticamente transparentes que são importantes em muitas aplicações devido a demanda por essas características. As principais aplicações desses materiais estão na fabricação de células solares, sensores, biossensores, entre outros [33].

Os vidros condutores FTO (óxido de estanho dopado com flúor) são vidros do grupo TCO (óxido condutor transparente) que apresentam boa estabilidade química e térmica e quando comparados com outros TCO. Além disso, são melhores condutores elétricos, apresentam melhor transmitância óptica, refletância infravermelha e resistência à abrasão física [32,117]. A característica de bom condutor do FTO é devido ao óxido de estanho ser dopado com flúor, onde o flúor substitui o oxigênio de modo intersticial e substitucional, atuando como um doador de elétrons, tornando-o um semicondutor degenerado do tipo-n. Sua estabilidade química e térmica não é afetada mesmo em altas temperaturas, porque não depende somente do oxigênio para fornecer portadores de carga, que são também os fluoretos intersticiais e substitucionais [117].

O vidro FTO vem sendo escolhido para construção de biossensores devido à sua alta condutividade elétrica, alta tolerância a abrasões físicas, estabilidade química sob condições atmosféricas e custo-benefício [118–122] Mahari e coautores [118], fabricaram um imunossensor usando o vidro FTO como eletrodo com nanopartículas de ouro e o anticorpo

monoclonal nCovid-19 imobilizado e avaliaram a mudança na condutividade elétrica. Eles conseguiram um imunossensor altamente específico, ultrasensível e que fornece resultados entre 10 e 30 segundos. O vidro FTO foi usado por Vadeji e Dehghani [119] no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de DNA para os estudos eletroanalíticos de etoposídeo (potente agente clínico anticâncer). Um nanocompósito de óxido de cobalto-ferrita-grafeno modificado com hidróxido de zinco/camada dupla foi depositado eletroforeticamente na superfície do vidro FTO. O eletrodo exibiu baixo limite de detecção, alta sensibilidade, seletividade e ótima reprodutibilidade. Esmaeeli et al. [120], utilizaram nanofibras de polianilina modificadas com óxido de cobre e depositaram sobre o vidro FTO para obter um sensor não enzimático para medir a glicose. Os resultados por eles apresentados comprovaram a excelência do eletrodo proposto devido à sua facilidade de preparo, seletividade e estabilidade adequadas. Khan e colaboradores [121], usaram um método químico de etapa única para o crescimento direto de nanobastões de óxido de zinco bem alinhados em vidro FTO. Eles usaram esse eletrodo como sensor para detecção de piperidina (substância usada na síntese de produtos farmacêuticos e aditivos alimentares). O dispositivo fabricado apresentou excelentes performances em relação a sensibilidade e limite de detecção. Em outro estudo, Dumore e Mukhopadhyay [122] obtiveram um sensor eletroquímico, utilizando eletrodo de vidro FTO coberto pela técnica de *spin coating* com nanopartículas de selênio, para detecção de peróxido de hidrogênio. Eles mencionam que o eletrodo apresentou propriedades de detecção eletroquímica de importantes para biomarcadores de H₂O₂, podendo também ser aplicado no monitoramento de saúde, na indústria de alimentos e no monitoramento ambiental.

Nesta tese, um filme de SiO₂/ZrO₂/AuNP foi depositado por *dip coating* no vidro FTO e posteriormente, a enzima lipase foi imobilizada em uma matriz de sílica e usada para formar um filme sobre o vidro FTO. Essas modificações tornaram os eletrodos adequados para quantificação de tributirina.

2.4 ANALITOS ESTUDADOS

2.4.1 Metil Paration

O termo pesticida se refere a qualquer composto químico com função de matar vários tipos de pragas como roedores, fungos, insetos, ervas daninhas entre outros e são categorizados como rodenticidas, fungicidas, inseticidas e herbicidas respectivamente. Conforme sua

composição, os pesticidas são classificados em carbamatos, piretróides, piretrina, organoclorados (OC) e organofosforados (OP).

Os pesticidas organofosforados são compostos tóxicos usados como inseticida, helmética, fungicida, herbicida e nematocidas que vêm sendo aplicados há quase cinco décadas no controle de pragas domésticas e na agricultura. O mais grave é que seus resíduos continuam contaminando recursos hídricos, frutas, vegetais e até alimentos processados, afetando a saúde de muitos organismos como peixes, pássaros e seres humanos [123,124].

A toxicidade dos compostos OP é causada pela inibição de atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que é fundamental para o funcionamento adequado do sistema nervoso central. A inibição da enzima ocorre por um mecanismo de fosforilação da AChE que impede a enzima de catalisar a acetilcolina resultando em um acúmulo excessivo de acetilcolina, que leva a uma toxicidade colinérgica. Essa toxicidade causa fasciculação e interrompe a transmissão neurológica causando um estado de hiperexcitação e paralisia dos músculos e do centro respiratório [8,123].

Dentre os vários pesticidas organofosforados, o metil paration (*O*, *O*-dimetil-*O*- (p-nitrofenil fosforotioato, MP) possui amplo espectro de aplicação como inseticida agrícola, urbano e doméstico. Seus resíduos são muito prejudiciais para a saúde humana através da absorção pela pele, membranas mucosas, pelo trato gastrointestinal e respiratório mesmo em baixos níveis [36,125].

Devido sua extrema toxicidade, existe uma variedade de métodos para detecção do MP que foi desenvolvida nos últimos anos, como espectroscopia de massa, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida ou gasosa acoplada e quimiluminescência. Essas técnicas demandam tempo, pré-tratamentos complexos da amostra, instrumentos caros e manipulação por pessoas treinadas, o que limita suas aplicações. Assim, os métodos eletroquímicos podem ser uma alternativa para detecção de MP. Quando comparados, os métodos eletroquímicos apresentam vantagens em relação a essas técnicas pois possuem baixo custo, fácil operação, boa estabilidade e resposta rápida [126].

Nesse sentido, pretende-se desenvolver um sensor para MP utilizando um compósito à base NTCPM e zircônia para fabricação de eletrodos de pasta de carbono. As respostas eletroquímicas para MP foram obtidas usando a voltametria de pulso diferencial.

2.4.2 Triglicerídeos

Os triglicerídeos (TG) são ésteres compostos por um glicerol e três moléculas de ácido graxo que desempenham uma função importante no metabolismo como transportadores de gordura dietética e fonte de energia [105]. Para ser considerado normal e saudável, os níveis de TG no sangue devem estar entre 40–160 mg dL⁻¹ para homens e 35–135 mg dL⁻¹ para mulheres [105,127,128]. Quando esses níveis se elevam na corrente sanguínea ocorre a deposição de placas de gordura nas paredes das artérias causando aterosclerose. Isto pode elevar os riscos de desenvolver a hiperlipidemia que por sua vez causa doenças coronárias [45,105,106] e também outras doenças que envolvem o metabolismo lipídico de vários distúrbios endócrinos [128].

Como visto, o nível de TG no sangue é um indicador importante de anormalidades no metabolismo lipídico. No entanto, o nível de TG nos alimentos também se tornou significativo, pois houve um aumento da conscientização sobre a saúde e pela criação de normas regulatórias mais rigorosas para indústria de alimentos. Dessa forma a determinação de TG, que seja sensível e seletiva, é importante para o diagnóstico e supervisão alimentar [105,106].

Neste trabalho a lipase foi imobilizada no vidro FTO, e um biossensor impedimétrico para determinação da tributirina (TB) foi desenvolvido. A tributirina é um pró-fármaco de butirato natural, trata-se de um triglicerídeo de ácido graxo de cadeia curta e neutro. É uma substância absorvida rapidamente e quimicamente estável no plasma, sendo metabolizada por lipases intracelulares difundindo-se por meio de membranas, liberando butirato diretamente na célula [129]. A escolha da tributirina está relacionada ao fato de que ela pode ser atribuída como um substrato comum para lipases de várias origens [130]. Podemos citar alguns trabalhos que desenvolveram biossensores para detecção de triglicerídeos e que usaram a tributirina como substrato [45,46,131–133].

2.5 TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

A detecção eletroquímica é usualmente realizada pelo controle do potencial no eletrodo de trabalho, pela capacidade do analito em se oxidar ou reduzir e pelo monitoramento da corrente em função do tempo. Sabe-se que muitos compostos orgânicos, biológicos, compostos de interesse ambiental e farmacêuticos apresentam sítios oxidáveis ou redutíveis em suas moléculas tornando a aplicação de detecção eletroquímica viável [4].

Nos processos eletroquímicos, a reação de transferência de carga que ocorre na interface eletrodo/solução pode ser convertida em um sinal eletrônico como corrente (amperométrico), ou potencial (potenciométrico) e propriedades de condução alteradas (condutométricos) [134].

As detecções eletroquímicas usam células contendo os eletrodos necessários e a forma mais usual de montagem da célula eletroquímica é com o uso de três eletrodos (Figura 5). São eles: o eletrodo de referência, que possui um potencial fixo, que pode ser o Ag/AgCl, Hg/Hg₂Cl₂ (ECS) ou eletrodo de hidrogênio padrão, o eletrodo de trabalho, que é onde as reações de interesse acontece; e um contra eletrodo feito de um material condutor inerte (platina ou grafite), cuja função é completar o circuito elétrico e então a corrente é registrada como fluxo de elétrons entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo [4,135].

Na solução contida na célula é necessária a adição de um eletrólito suporte para diminuir a resistência da solução nas medidas de potencial controlado, minimizar a contribuição migracional ao fluxo total das espécies eletroativas e manter a força iônica constante [4]. Então todos os eletrodos são conectados em um potenciostato. A técnica e os parâmetros a serem usados são selecionados através de um software do equipamento [135].

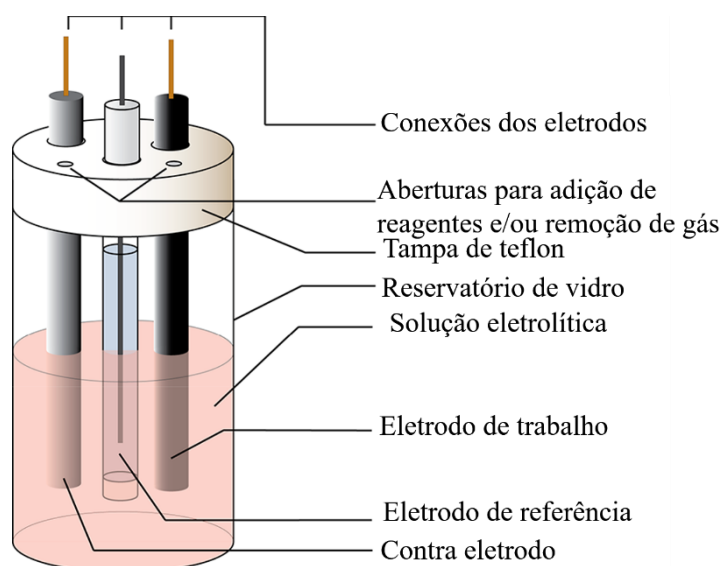


Figura 5: Representação de uma célula eletroquímica [135].

Utilizando técnicas eletroanalíticas pode-se determinar as figuras de mérito do sensor que são a sensibilidade, o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), entre outros. São termos usados para descrever a menor concentração de um analito que pode ser medido com segurança por um procedimento analítico. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) o limite de detecção de um método é a menor concentração ou quantidade absoluta de analito que tem um sinal significativamente maior do que o sinal de um branco apropriado. LQ é a concentração mais baixa em que um analito pode não ser apenas detectado de forma confiável, mas também que algumas metas predefinidas de viés e

imprecisão sejam atendidas. A capacidade de detectar o analito com confiança não é a mesma que a capacidade de relatar com confiança sua concentração ou de distinguir entre sua concentração em duas amostras. Portanto o Comitê de Química Analítica Ambiental da Sociedade Americana de Química recomenda o limite de quantificação [136,137].

2.5.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica bastante comum, e é empregada para avaliar processos de oxidação e redução de espécies. Também é útil para estudar reações químicas iniciadas por transferência de elétrons, como na catálise [135]. A eficiência desta técnica resulta de sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons.

A voltametria cíclica consiste em aplicar uma diferença de potencial (com valor inicial e final pré-definidos) [4] a uma taxa de varredura ($V s^{-1}$) como ilustrado na Figura 6 (a), indicando que durante o experimento o potencial varia linearmente a uma determinada velocidade por segundo através do eletrodo de trabalho e registra-se os valores da corrente em função do potencial aplicado [4,135], como ilustrado na Figura 6 (b), que mostra os picos de oxirredução da solução.

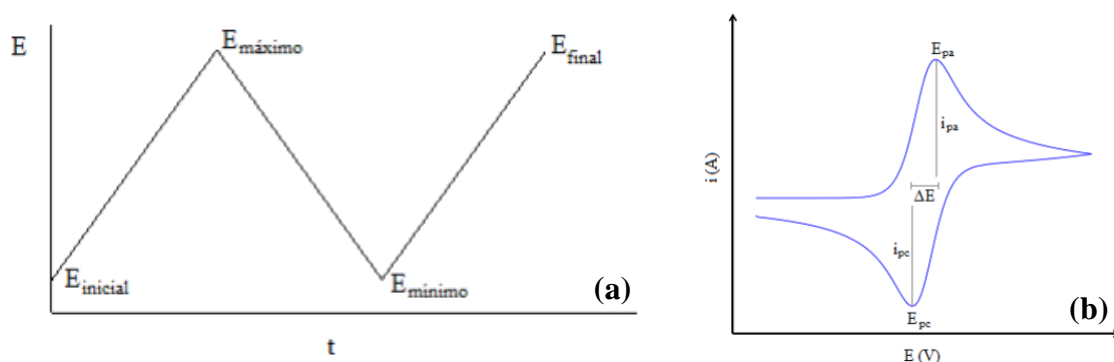


Figura 6: Relação de potencial em relação ao tempo em voltametria cíclica (a) [138]. Típico voltamograma cíclico obtido pela relação entre intensidade de corrente e potencial (b).

Através dos voltamogramas cíclicos (Figura 6 (b)) obtêm-se parâmetros com o potencial de pico anódico (E_{pa}) e pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}) e os potenciais de meio pico $E_p = (E_{pa} + E_{pc})/2$, esses valores correspondem a metade do valor máximo atingido pelas correntes anódicas e catódicas [139].

Em relação a reversibilidade da reação, que ocorre no eletrodo, esta pode ser classificada em reversível, irreversível e *quasi-irreversível*. Na reação reversível é observado no voltamograma um par de picos, anódico e catódico, em que a variação da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura é linear e o potencial de pico não varia com a velocidade de varredura. Em uma reação irreversível um sobrepotencial maior é necessário para conduzir os processos de oxidação e redução e o pico se desloca-se com a velocidade de varredura, para potenciais mais positivos (pico anódico) ou para potenciais mais negativos (pico catódico). Já na reação *quasi-irreversível* os picos de oxirredução também são vistos, no entanto o que a difere da reação reversível é a cinética de transferência eletrônica interfacial, que ocorre de forma mais lenta. Assim, a corrente de pico pode não se apresentar proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura e ainda pode-se notar uma tendência à irreversibilidade ao aumentar a velocidade de varredura [138,140].

Ainda a respeito da variação da corrente com a velocidade de varredura, pode-se obter mais informações como o mecanismo de controle do processo de oxirredução. Maiores valores de velocidades de varredura diminuem o tamanho da camada de difusão e correntes mais altas são registradas. Quando a relação entre a intensidade de corrente e a velocidade de varredura for linear considera-se que o processo é controlado por adsorção. Por outro lado, quando a relação entre a corrente de pico e raiz quadrada da velocidade de varredura for linear, considera-se que o processo é controlado por difusão da espécie que se oxida e se reduz. O processo controlado por difusão, para uma reação redox reversível, pode ser descrito pela equação de Randles-Sevcik [140]:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_0 \cdot C \cdot v^{1/2}$$

Onde i_p é a corrente de pico (A), n é o número de elétrons transferidos no processo redox, A é a área eletroativa (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão da solução redox e C é a concentração da solução redox.

Durante o registro de corrente em um voltamograma estão envolvidos dois diferentes processos, que correspondem à geração de corrente capacitiva e de corrente faradáica. Esta última, é gerada obedecendo a Lei de Faraday em que o fluxo de elétrons de uma reação química é diretamente proporcional à quantidade de carga elétrica que passa pela interface eletrodo/solução [140,141]. Enquanto que a corrente capacitiva é atribuída à corrente produzida durante a polarização da dupla camada elétrica na superfície do eletrodo. Esse processo é

inerente do sistema, visto que se aplica potenciais entre dois eletrodos, logo haverá passagem de corrente na solução devido à separação de cargas [140,141].

A voltametria cíclica foi utilizada em várias etapas desse trabalho. Resultados importantes das caracterizações eletroquímicas, tanto para o eletrodo de pasta de carbono modificado com NTCPM/ZrO₂ quanto para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase, foram obtidos por voltametria cíclica, como a intensidade de corrente de pico, a relação i_{pa}/i_{pc} e a separação do pico anódico (E_{pa}) e do pico catódico (E_{pc}). Através desses parâmetros, é possível avaliar comparativamente a reversibilidade do processo redox envolvido na superfície dos eletrodos. Também foi possível avaliar as reações de oxirredução de analitos, cálculo de área eletroativa e verificação de processos envolvidos na interface eletrodo/solução.

2.5.2 Voltametria de Pulso Diferencial

Voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica de pulso idealizada para minimizar as correntes de carregamento de fundo. A sequência de pulsos (S_n) em que um potencial de linha de base é mantido por um período de tempo especificado antes da aplicação de um pulso de potencial, dá a forma de onda da VPD. A corrente é medida no tempo τ' , um pouco antes da aplicação do potencial de pulso. Então o potencial é levemente elevado (normalmente 100 mV) e a corrente é medida novamente no tempo τ , no final do pulso (Figura 7). O potencial do eletrodo de trabalho é então retornado a um valor menor do que durante o pulso direto (mas pode ser configurado para retornar a qualquer valor), de modo que o potencial da linha de base de cada pulso é aumentado ao longo da sequência. É possível fazer uma varredura positiva (em direção a um limite anódico) ou negativa (em direção a um limite catódico) [140,142].

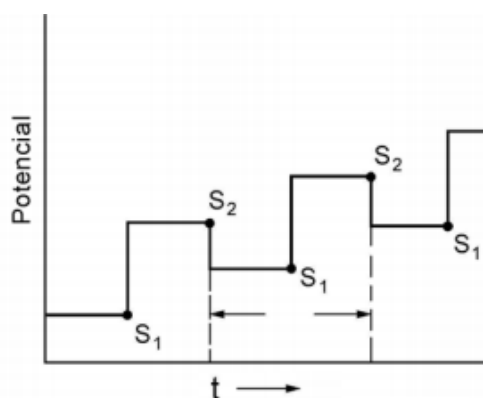


Figura 7: Representação esquemática da aplicação de potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial [143].

A voltametria de pulso diferencial tem uma sensibilidade de corrente maior e apresenta melhor resolução que a voltametria cíclica [139]. A VPD se baseia na diferença de taxas de decaimento da corrente de carga e da corrente faradaica. Essa técnica consiste em medir a corrente em diferentes pontos, antes e no final da aplicação do pulso. O resultado da superposição periódica de pulsos de amplitude constante em uma rampa de potencial contínua está relacionado com o potencial aplicado [138]. Conforme mostrado na Figura 8, o potencial de pico, corresponde ao ponto máximo do pico e serve para identificar a espécie eletroativa. É desejável que o valor da corrente correspondente ao potencial de pico seja proporcional à concentração da espécie eletroativa, para que seja possível a sua determinação quantitativa [143].

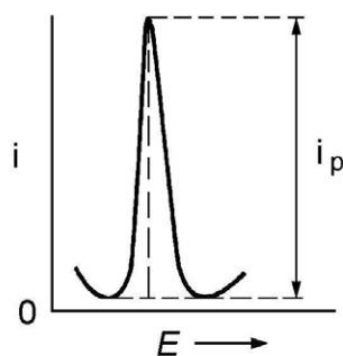


Figura 8: Registro digital de uma voltametria de pulso diferencial [141].

Por possuir maior sensibilidade para detecção de analitos, a voltametria de pulso diferencial foi utilizada neste trabalho para caracterização do sensor de MP. A técnica foi aplicada para encontrar a melhor resposta do eletrodo em relação à escolha do tampão e pH, e para encontrar as figuras de mérito do sensor desenvolvido (determinação de limite de detecção, sensibilidade e interferentes)

2.5.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Impedância pode ser definida como uma força de oposição à corrente elétrica em um circuito, e é medida com a mesma unidade que a resistência, Ω (ohm) [144]. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é usada para caracterizar o comportamento de um sistema eletroquímico, que permite avaliar diversos fenômenos que ocorrem na célula eletroquímica.

A EIE consiste em analisar a resposta do dispositivo eletroquímico quando é aplicado um sinal de pequena amplitude, sobreposto ao valor nominal da corrente (modo galvanostático)

ou tensão (modo potenciostático) através dos terminais do sistema. A impedância (Z) é então calculada como a razão entre a resposta e o sinal aplicado, dessa forma analisa-se o espectro de impedância em função das condições de operação e as variações que mudam a forma do espectro [145]. Uma alternativa de representação das medidas de impedância é o traçado de Nyquist que mostra Z_{Im} vs Z_{Re} para diferentes valores de ω , onde Z_{Im} e Z_{Re} são as partes imaginárias e real da impedância respectivamente [140].

Diferentes arcos podem aparecer em função dos fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo. A representação dos espectros de impedância também pode ser através de um modelo de circuito equivalente, chamado de modelo de Randle [140] (Figura 9). O circuito é formado por dois resistores, um capacitor e um elemento não linear, chamado de impedância de Warburg. A primeira resistência representa as perdas ôhmicas do sistema (R_m). A impedância de Faraday é considerada para descrever os efeitos da polarização dos eletrodos, que pondera tanto as perdas por ativação quanto as perdas por difusão. A segunda resistência (R_{CT}) é para modelagem de transferência de carga e a impedância de Warburg (Z_W) é usada para representar os efeitos de transferência de massa. Conectado em paralelo com um capacitor tem-se a impedância de Faraday para caracterizar os fenômenos de acúmulo de carga na dupla camada (C_{dl}) [145].

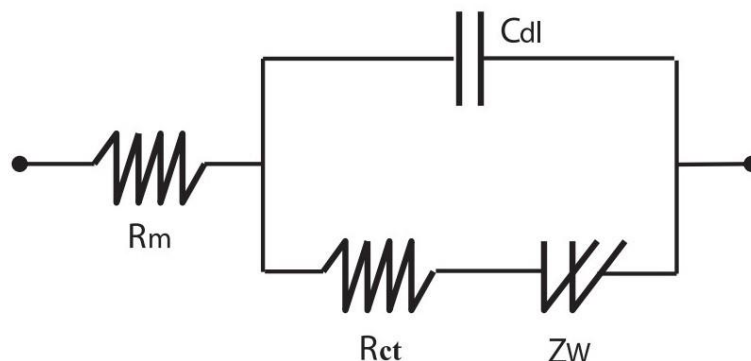


Figura 9: Representação do circuito de Randle [145].

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que permite avaliar fenômenos químicos e biológicos em superfícies, útil no desenvolvimento de sensores e biosensores [110].

Os sensores impedimétricos podem ser divididos em duas categorias: faradaico ou não faradaico. Nos sensores com a detecção faradaica, uma sonda redox é utilizada e a resistência de transferência de elétrons, R_{CT} , é monitorada. Assim o R_{CT} pode ser afetado por uma

superfície carregada que apresenta uma carga atrativa ou repulsiva sobre os íons próximos aos eletrodos. A carga da superfície depende da temperatura, do pH, entre outros fatores [146].

A EIE tem sido uma ferramenta importante para estudar as interações biomoleculares, detectando mudanças na capacitância e na resistência de transferência de elétrons interfacial na superfície do eletrodo [110,147]. Pode ser usada para diferentes eventos ocorridos em biossensores como por exemplo: reação enzima-substrato, antígeno-anticorpo, adsorção celular, permitindo os reconhecimentos complexos de forma sensível [110].

A EIE possui alguns benefícios quando comparada com outros métodos eletroquímicos, destacando-se o uso de corrente alternada (AC) de pequena amplitude para o sistema, portanto é uma técnica não destrutiva, podendo ser usada para muitos materiais. A EIE também permite descrever com eficácia a elétrica real e formação de dupla camada de um eletrodo e é útil para controlar mudanças nas características elétricas causadas por reações de bio reconhecimento na superfície do eletrodo modificado [7,148,149].

Diante do exposto, o uso da técnica de EIE neste trabalho será de grande importância para caracterização do biossensor de triglicerídeos, visto que somente a lipase será utilizada no biossensor. Dessa forma, as medidas obtidas serão da variação na resistência a transferência de elétrons causada pelas adições de tributirina, que na presença da lipase sofre hidrólise resultando nos produtos glicerol e ácidos graxos, estes últimos, alteram a concentração de H^+ na solução.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIAIS

NTCPM Baytubes C150P (Bayer, Alemanha), propóxido de zircônio (IV) em 1-propanol (Sigma-Aldrich, USA, 70 %), ácido acético (Dinâmica, Brasil, 99,7 %), acetilacetona (Sigma-Aldrich, Alemanha, 99 %), ácido esteárico (Dinâmica, Brasil, 95 %), hidróxido de amônia (Dinâmica, Brasil, 28-30 %), metil paration (Sigma-Aldrich, Alemanha), etanol (Emsure Merk, Alemanha, 99,9 %), diclorometano (Merk, Alemanha, 99,5 %), cloreto de potássio (Emsure Merk, Alemanha, 99,5 %), óleo mineral (Farmax, Brasil 100 %) vidro revestido com óxido de estanho dopado com flúor FTO (Sigma-Aldrich, USA, $\sim 7\Omega/sq$), tetraetil ortosilicato TEOS (Sigma-Aldrich, USA, 98 %), ácido clorídrico (Emsure Merk, Alemanha, 37 %), hidróxido de sódio (Dinâmica, Brasil), Lipase *Candida rugosa* EC 3.1.1.3 Tipo VII, ≥ 700 unidades/mg sólido (Sigma-Aldrich, USA), *p*-nitrofenil palmitato *p*NPP (Sigma-Aldrich,

USA, $\geq 98\%$) tributirina (Sigma-Aldrich, 97%), Triton x-100 Octoxynol (Nuclear, Brasil), 1,4 diazoniabicyclo[2,2,2]octano DABCO (Sigma-Aldrich, USA, $\geq 99\%$), N,N- dimetilformamida (Sigma-Aldrich, USA, 99,8 %), cloropropiltrimetoxisilano CPTMS (Sigma-Aldrich, USA, $>97\%$), metanol (Vetec, Brasil, 99,8 %), formamida (VetecTM, Sigma-Aldrich, Alemanha, 98 %), ácido cloroaúrico feito com ácido nítrico (Sigma-Aldrich, Alemanha, $\geq 65\%$); ácido sulfúrico (Ecibra, Brasil, 95-98 %) e ouro, (Vetec, Brasil), borohidreto de sódio (Nuclear, Brasil, 97 %). Tampão Britton-Robinson (BR) usou-se ácido acético, ácido clorídrico e ácido bórico (Neon, Brasil, 99,5 %), tampão fosfato de sódio usou-se fosfato de sódio monobásico (Fmaia Gold, Brasil, 99 %) e bibásico (Dinâmica, Brasil, 99 %), tampão acetato de sódio usou-se acetato de sódio anidro (Vetec, Brasil, 99 %) e ácido acético. Todos reagentes são de grau analítico e foram usados sem nenhuma purificação. Para todas soluções aquosas, foi utilizada água destilada.

3.2 MÉTODOS

Inicialmente serão descritas as etapas necessárias para produzir um eletrodo do tipo pasta de carbono com o compósito de NTCPM em matriz de zircônia. No item 3.2.1 será descrito o procedimento para preparar o compósito NTCPM/ ZrO_2 e no item 3.2.2 será detalhada a preparação do eletrodo de pasta de carbono com esses materiais. Posteriormente, serão especificadas as etapas de preparação do eletrodo baseado no vidro FTO. Nos itens 3.2.3 e 3.2.4 serão relatadas as etapas de preparação das dispersões de AuNP. Nos itens 3.2.5 e 3.2.6 serão expostas as deposições de filmes de sílica/zircônia e de nanopartículas de ouro no vidro FTO e no item 3.2.7 será explicada a imobilização da enzima lipase. Todos os materiais obtidos foram sintetizados pelo método sol-gel.

3.2.1 Compósito NTCPM/ ZrO_2

Para a obtenção de um compósito com alto teor de NTCPM efetuaram-se os cálculos a partir da massa molar do propóxido de zircônio ($327,22 \text{ g mol}^{-1}$), para que a quantidade final de NTCPM presente no compósito NTCPM/ ZrO_2 estivesse entre 40% e 60% (NTCPM40%/ ZrO_2 e NTCPM60%/ ZrO_2).

Considerou-se que durante a hidrólise de 1 mol do propóxido de zircônio (Figura 10), a molécula de água provoca a sua quebra formando o hidróxido de zircônio e propanol conforme a Equação 4. O hidróxido de zircônio irá se policondensar, ocorrendo então a formação do xerogel de zircônia, sendo considerado que se formou 1 mol de zircônia para cada mol de

propóxido adicionado. A zircônia estequiométrica possui massa de 123,22 g mol⁻¹, como pode ser visto na Equação 5 e foi usada essa proporção para estimar a massa de NTCPM necessária para atingir a quantidade final de NTCPM no compósito.

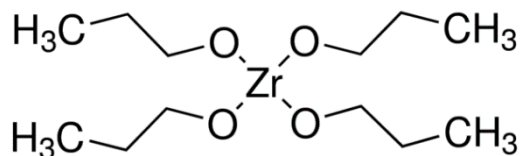
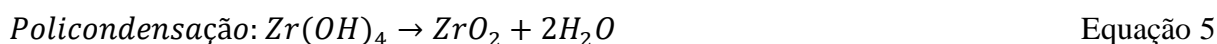
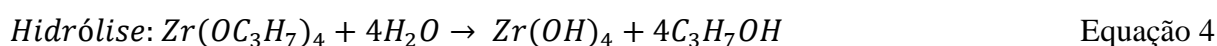


Figura 10: Estrutura química do propóxido de zircônio (IV).



Os compósitos com alto teor de nanotubos de carbono de parede múltipla (NTCPM) foram sintetizados utilizando o método sol-gel, conforme técnica adaptada e descrita por Almeida et al. [70]. Um fluxograma da síntese dos compósitos à base de NTCPM/ZrO₂ é apresentado na Figura 11.

Para obtenção de amostras homogêneas, inicialmente foi realizada a dispersão dos NTCPM em água destilada contendo um surfactante como agente dispersante. O surfactante estearato de amônio foi produzido a partir do ácido esteárico e hidróxido de amônio sob agitação a 70 °C por 15 minutos. As proporções foram calculadas para obtenção de 1 g de estearato de amônio em 100 mL de água destilada (1 g 100 mL⁻¹). Essa solução foi agitada a 50 °C por 4 horas.

Posteriormente, em 10 mL da solução acima foi adicionado 0,9 g e 1,35 g de NTCPM para preparar compósitos com 40 e 60% respectivamente. Essa mistura foi colocada no ultrassom por 10 horas, em temperatura ambiente, com o recipiente fechado para não haver evaporação da água. Depois de decorridas 10 horas, tem-se então a dispersão aquosa dos NTCPM, pronta para ser utilizada na síntese do compósito usando a técnica sol-gel.

A síntese do compósito consistiu na mistura de 5,0 mL de propóxido de zircônio, 2 mL de acetilacetona e 10 mL de água destilada contendo o estearato de amônio e os NTCPM dispersos anteriormente. Depois que todos os reagentes são misturados, utilizando agitação magnética em temperatura ambiente, acontece a formação do gel que em geral ocorre em 30 minutos. O gel formado é mantido em repouso e em temperatura ambiente por uma semana para secagem. Após esse período, o resultado é um xerogel que consiste em uma mistura

contendo NTCPM/ ZrO_2 mais os resíduos orgânicos da síntese, que foram eliminados com lavagem em etanol e secagem a vácuo. O xerogel seco foi armazenado em um dessecador até o uso.

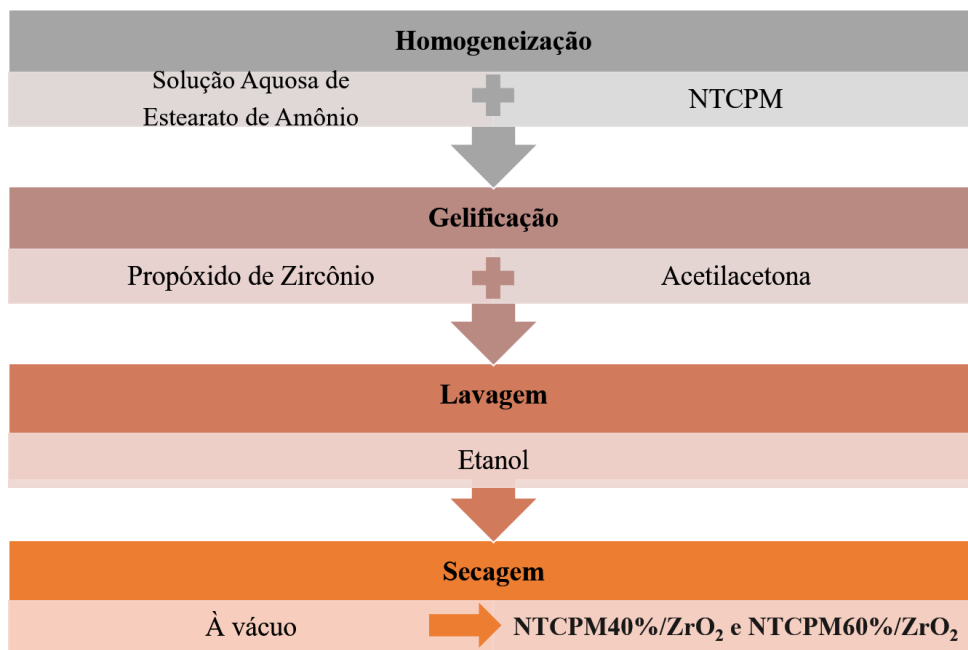


Figura 11: Fluxograma da síntese dos compósitos NTCPM/ ZrO_2 .

3.2.2 Preparação de Eletrodos Pasta de Carbono com o Compósito NTCPM/ ZrO_2

Os eletrodos de trabalho de pasta de carbono (EPC) foram produzidos utilizando 0,0150 g do compósito e 0,006 mL de óleo mineral (nujol). O compósito foi previamente triturado em ágata e em seguida misturado com o nujol para formação de uma pasta. Esta pasta foi prensada manualmente em uma tampa de teflon com uma cavidade de 0,1 cm de profundidade de um eletrodo de trabalho contendo um disco de platina de 0,5 cm de diâmetro colado em um tubo de vidro com um fio de cobre como condutor conforme a Figura 12.

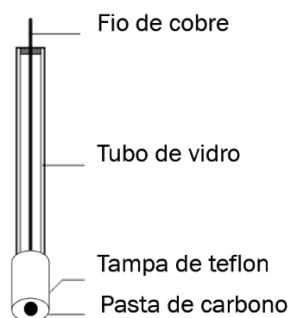


Figura 12: Ilustração de um eletrodo pasta de carbono.

3.2.3 Síntese do Silsesquioxano Iônico

A síntese do silsesquioxano iônico contendo o grupo cloreto de 1,4-bis-3-(propiltrimetoxisilano)diazoniabicyclo[2,2,2]octano foi realizada conforme descrito por Arenas et al. [98] com algumas modificações. Sob atmosfera inerte, 20 mmol de 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano (DABCO) foram dissolvidos em 27 mL de N,N-dimetilformamida. Em seguida foram adicionados 40 mmol de cloropropiltrimetoxisilano (CPTMS) e colocados sob agitação e aquecimento a 75 °C por 72 horas até a formação de um precipitado branco denominado cloreto de bis(3-n-propiltrimetoxisilil)-1,4diazoniabicyclo[2,2,2]octano.

Esse sólido foi lavado com 10 mL de dimetilformamida, em seguida com metanol e seco por 2 horas a 70 °C. Logo após, o material obtido foi pesado e adicionado 25 mL de formamida e 0,6 mL de água para cada 3 g de material. Primeiramente adicionou-se a formamida e após a dissolução foi adicionado a água e 3 gotas de ácido fluorídrico sob agitação e aquecimento a 70 °C. Após a homogeneização, o gel formado foi transferido para uma placa de petri e colocado para secar em chapa de aquecimento a uma temperatura constante de 50 °C. O material obtido neste trabalho foi denominado cloreto de DABCOSIL e foi usado como estabilizante, controlador de tamanho e agente de adesão das AuNP ao filme de sílica/zircônia.

3.2.4 Dispersão de AuNP em Cloreto de Dabcosil

A dispersão de nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizada com cloreto de DABCOSIL foi obtida conforme descrito por Nunes et al. [95] dissolvendo-se 0,100 g de cloreto de DABCOSIL em 10 mL de água destilada sob aquecimento de 60 °C com agitação periódica. Após a dissolução, 2,0 mL de HAuCl_4 5×10^{-3} mol L^{-1} foram adicionados, seguido do agente de redução NaBH_4 recentemente preparado (10 mL da solução de NaBH_4 0,02 mol L^{-1}). Neste trabalho foi chamado de AuNP/DABCOSIL.

3.2.5 Filmes de Sílica/Zircônia sobre o vidro Condutor FTO

A formação de filmes na superfície dos vidros FTO foi realizada pela técnica de deposição de filmes *dip coating*, desenvolvida neste trabalho, conforme ilustrado na Figura 14.

Primeiramente o precursor da sílica (TEOS) foi hidrolisado em 2 mL etanol, água e 0,05 mL de ácido clorídrico concentrado, permanecendo sob agitação por 2 horas (solução A). Em seguida o precursor propóxido de zircônio 0,670 mL (1,5 mmol) foi diluído em 2 mL ácido

acético, e foi adicionado sob constante agitação na solução A. Na solução resultante foi adicionada 1,08 mL de água e 0,1 mL de ácido clorídrico concentrado, para completar o processo de hidrólise da zircônia. Esse sistema ficou sob agitação por 30 minutos, resultando em um sol transparente (Sol-sílica/zircônia).

Soluções com diferentes proporções de TEOS foram preparadas com a finalidade de conter 3, 5, 10, 20, 30 e 50% mol no Sol-sílica/zircônia. As quantidades utilizadas de TEOS e água em cada solução preparada se encontram descritas na

Tabela 1.

Tabela 1: Quantidade de TEOS e água utilizados na preparação do Sol- Sílica/Zircônia.

% molar de silício	TEOS (mL)	H₂O (mL)
3	0,010	0,033
5	0,018	0,057
10	0,040	0,122
20	0,080	0,270
30	0,145	0,461
50	0,340	1,080

Em cada dispersão Sol-sílica/zircônia foi submergido 1 vez por 1 minuto o vidro FTO com dimensões de 1 x 5 cm, utilizando a técnica *dip coating* com velocidade de mergulho de 0,35 mm s⁻¹. O equipamento utilizado foi construído pelo laboratório de sólidos e superfícies e pode ser visto na Figura 13. Finalmente os vidros FTO foram calcinados a 400 °C por 1 hora em mufla (Figura 14) e armazenados em um dessecador. Os filmes foram chamados de FTO/SiO₂/ZrO₂. Os vidros FTO foram previamente lavados com sabão neutro, água e etanol e secos conforme More et al. [150].

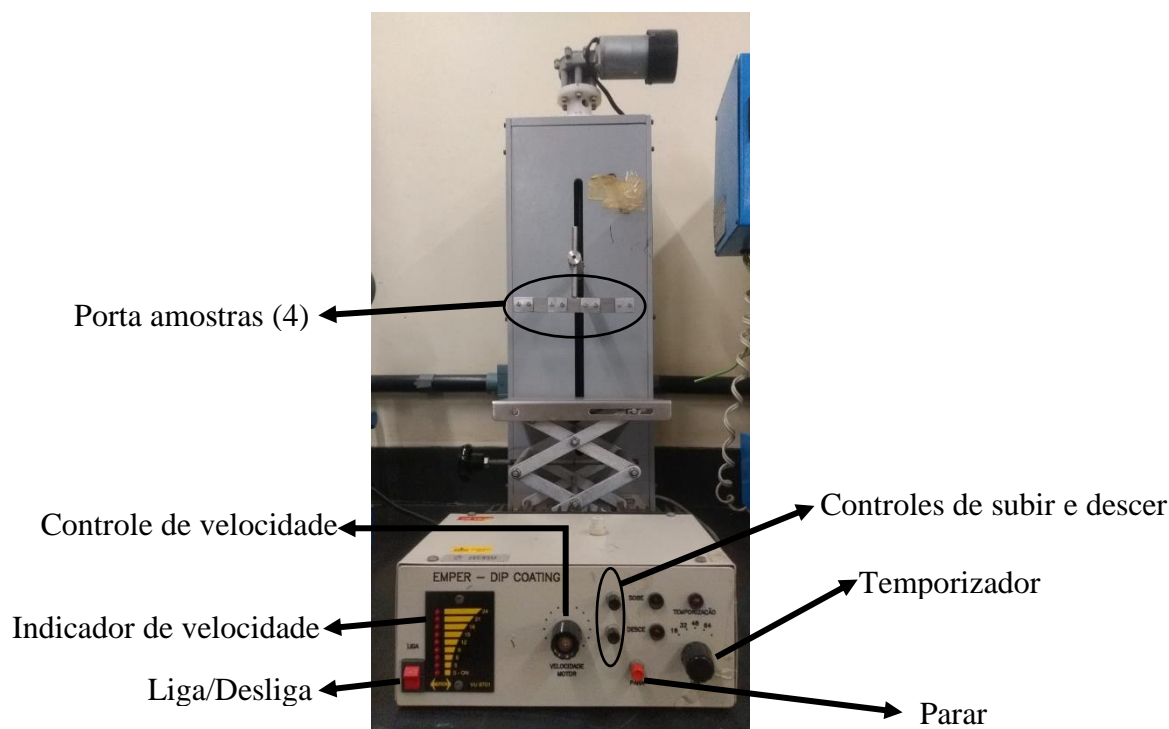


Figura 13: Equipamento utilizado para a técnica *dip coating*.

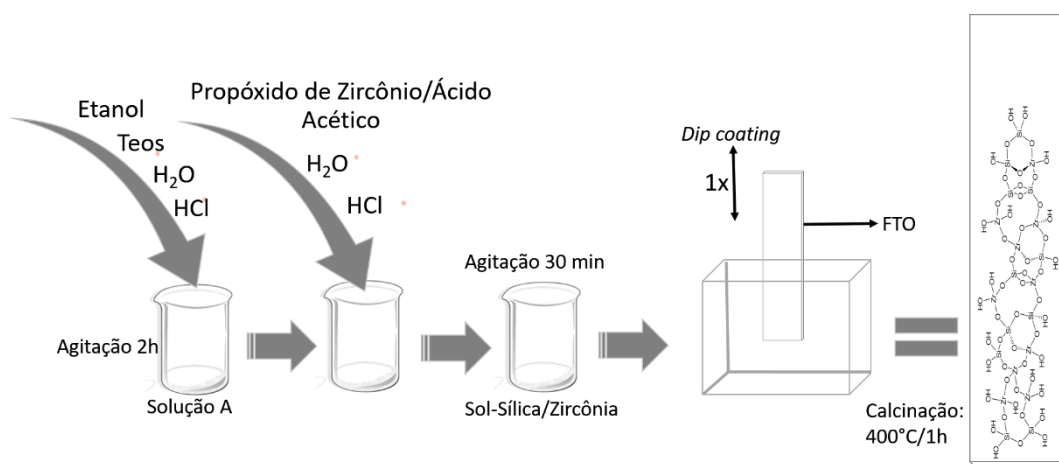


Figura 14: Esquema de preparação e deposição do filme de SiO₂/ZrO₂ no vidro FTO limpo.

3.2.6 Filmes de AuNP/DABCOSIL sobre Filme SiO₂/ZrO₂

Conforme resultados apresentados na sessão 4.2.1, somente o vidro FTO/SiO₂/ZrO₂ contendo 10 % de sílica mostrou-se promissor para as modificações a seguir.

A deposição do filme de AuNP/DABCOSIL foi realizada utilizando a técnica de *dip coating* adaptada de Schneid et al. [151] conforme ilustrado na Figura 15. Em cerca de 4 mL da dispersão de AuNP/DABCOSIL, o vidro FTO/SiO₂/ZrO₂ contendo 10 % de sílica foi submergido 3, 5 e 10 vezes com velocidade de mergulho de 2,1 mm s⁻¹ por 1 minuto com

intervalo de 3 minutos entre cada mergulho. Em seguida, os filmes de AuNP/DABCOSIL foram tratados termicamente estufa a 125 °C por 1 h. Esses filmes foram nomeados de FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP.

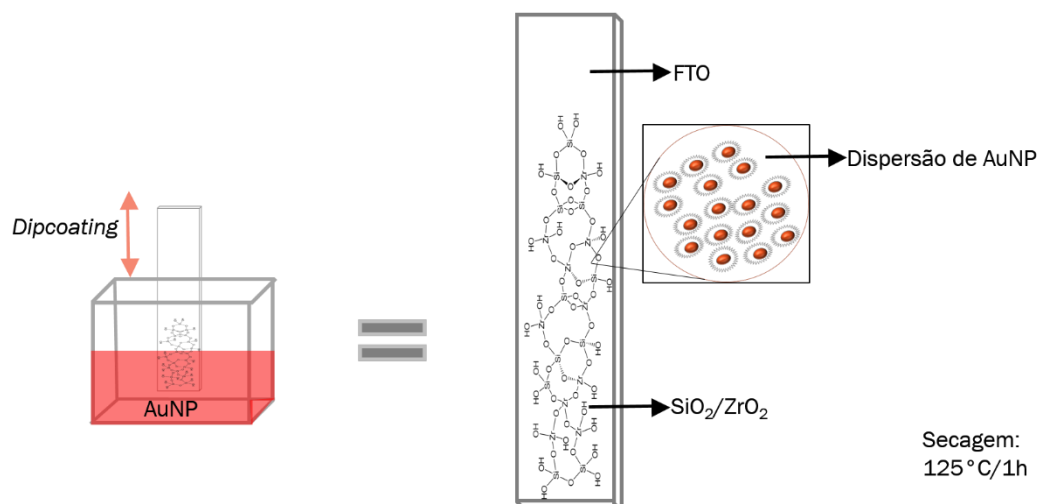


Figura 15: Esquema de preparação e deposição dos filmes de AuNP/DABCOSIL nos vidros FTO/ SiO₂/ZrO₂.

3.2.7 Imobilização da Enzima Lipase (*Candida Rugosa*)

Sobre a superfície dos vidros FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP, foi imobilizada a enzima lipase, pelo método desenvolvido neste trabalho. Primeiramente a uma solução visualmente homogênea foi preparada com 5 mL de TEOS e 1,6 mL ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹. A mistura ficou sob agitação por 3 horas para pré-hidrólise do TEOS. Em seguida a mistura foi neutralizada com NaOH 0,05 mol L⁻¹ até pH 6.

Posteriormente, uma solução contendo 2,7 mg mL⁻¹ ou 5,4 mg mL⁻¹ de lipase foi preparada em água destilada e adicionada na solução de TEOS pré-hidrolisada. Essa mistura foi utilizada para formar um filme de sílica contendo enzima na superfície do vidro FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP, usando também o método *dip coating* com velocidade de mergulho de 2,1 mm s⁻¹ com tempo de imersão de 1 minuto.

A atividade enzimática da lipase foi obtida pelo método de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP), descrito por Winkler e Steckmann [152], permitindo a determinação da atividade lipolítica através de um método espectrofotométrico utilizando o *p*NPP como substrato, que será hidrolisado a ácido palmítico e *p*-nitrofenol que possui coloração amarelada. A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1μmol de *p*-nitrofenol (*p*NP) por minuto. A lipase utilizada apresentou atividade de 140,5 U mL⁻¹. Os vidros FTO com filmes de sílica/lipase foram então armazenados em dessecador na

geladeira por 1 semana para completa secagem. Esses eletrodos foram chamados de FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase. A Figura 16 apresenta uma ilustração dos processos de deposição do filme sobre a superfície do vidro FTO.

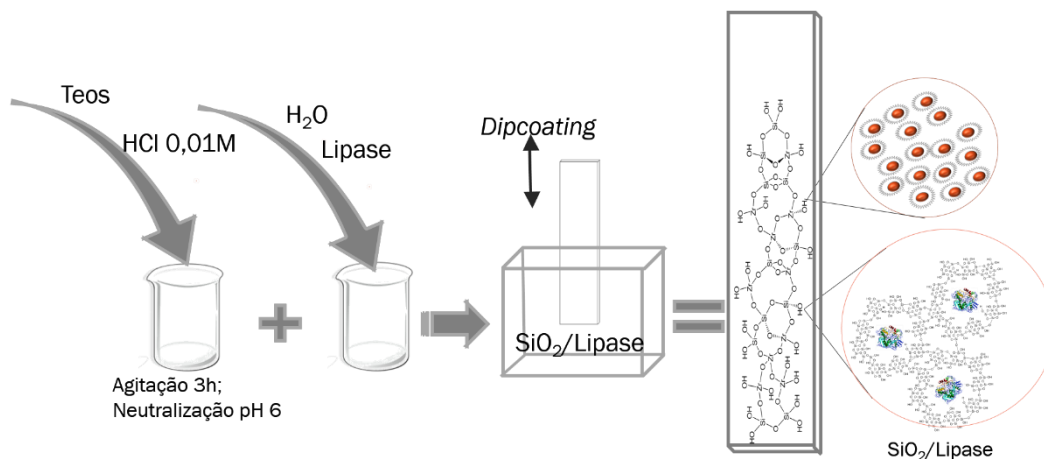


Figura 16: Esquema de preparação e deposição do filme de SiO₂/Lipase no vidro FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP.

No Quadro 2 estão apresentados todos os materiais produzidos e que passaram por caracterização eletroquímica.

Quadro 2: Materiais produzidos e caracterizados eletroquimicamente.

Materiais	Eletrodo	Analito	Técnica Eletroquímica
Compósito NTCPM40%/ZrO ₂	EPC	-	Voltametria cíclica
Compósito NTCPM60%/ZrO ₂	EPC	Metil paration	Voltametria cíclica e de pulso diferencial
Sílica/Zircônia	Vidro FTO	-	Voltametria cíclica
Sílica/Zircônia com AuNP	Vidro FTO	-	Voltametria cíclica
Sílica/Zircônia com AuNP/Lipase	Vidro FTO	Triglicerídeos	Espectroscopia de impedância

3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

3.3.1 Análise Termogravimétrica

Os materiais NTCPM/ZrO₂ e os NTCPM puros da Bayer (Bytubes) foram submetidos a análise termogravimétrica (TGA) usando um analisador TGA-50 (Shimadzu, Japão). As amostras foram aquecidas a partir da temperatura ambiente até 900 °C a uma taxa de 20 °C min⁻¹ em atmosfera inerte usando nitrogênio como gás de purga.

3.3.2 EDS obtido por Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise elementar do compósito NTCPM60%/ZrO₂ foi realizada com um espectrômetro de raios X por dispersão em energia conservativa (Thermo-Fisher) acoplado a um microscópio JEOL LV5800. A amostra foi compactada como discos (4,6 ton cm⁻²) e metalizada com carbono para evitar o carregamento elétrico. O teor de carbono e zircônio foi obtido com procedimento de quantificação do software "Noran System Six", utilizando filtro *top-hat* para remover o ruído de fundo e correção ϕ (ρZ) para corrigir os efeitos da matriz.

3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada no equipamento JEOL – JEM 1200 EXII, operando a uma tensão de 80 kV. A suspensão do compósito NTCPM60%/ZrO₂ foi obtida dispersando a amostra em álcool isopropílico no banho de ultrassom por 5 minutos, então 1 gota dessa dispersão foi adicionada sobre o porta amostra de cobre (grid), revestida com carbono e seca a temperatura ambiente.

3.3.4 Isotermas de Adsorção e Dessorção de N₂

As isotermas de adsorção e dessorção de N₂ foram obtidas para os compósitos NTCPM40%/ZrO₂ e NTCPM60%/ZrO₂, na temperatura do nitrogênio líquido utilizando o equipamento Tristar II 3020 Krypton Micromeritics.

As amostras foram submetidas a um tratamento térmico de 120 °C por 10 horas sob vácuo. A área superficial foi obtida pelo método de multipontos BET (Método Brunauer, Emmet e Teller) e a curva de distribuição de poros foi obtida pelo método BJH (Método de Barret, Joyner e Hallenda).

3.3.5 Análise Elementar de C, H e N

Os compósitos NTCPM40%/ZrO₂ e NTCPM60%/ZrO₂ foram analisados para detectar a quantidade de carbono utilizando o equipamento Perkin ElmerMCHNS/O, 2400. Aproximadamente 2 mg de amostra foi usada na análise.

3.3.6 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos para o compósito NTCPM60%/ZrO₂ e para os NTCPM puros, utilizando um espectrômetro Horiba Jobin-Yvon iH30 com laser de Hélio-Neônio com comprimento de onda de 632 nm e potência nominal de 10 mW e CCD refrigerada com nitrogênio líquido.

3.3.7 Difração de Raios X

A difração de raios X foi realizada para o compósito NTCPM60%/ZrO₂ e para os NTCPM puros em um difratômetro da Siemens D500, usando radiação Cu-K α ($\lambda=0,154056$ nm), com geometria $\theta/2\theta$ com 2θ variando de 10° a 90°.

3.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no equipamento MEV Zeiss EVO MA10. Os vidros FTO com filmes de SiO₂/ZrO₂, SiO₂/ZrO₂/AuNP e SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase foram cortados e colados em porta amostras de alumínio (stubs) com auxílio de uma fita de carbono e metalizados com ouro (SiO₂/ZrO₂) e com carbono (demais amostras).

3.3.9 Espectroscopia na Região do UV-Vis

Os espectros de refletância e transmitância total na região do UV-Vis dos filmes de SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP foram obtidos utilizando um espectrofotômetro com duplo feixe da VARIAN modelo CARY 5000, a janela espectral analisada foi de 300 a 800 nm. Para o cálculo da porcentagem de luz absorvida pelos filmes usou-se a Equação 6:

$$(\%)Abs = 100 - (\%)T - (\%)R$$

Equação 6

3.3.10 Perfilometria Óptica

Foi avaliado a espessura de cada filme formado sobre o vidro FTO por perfilometria óptica utilizando o perfilômetro BRUKER ContourGT-K (Optical Profiler), lente IX5, luz verde (monocromática), o equipamento possui LEDs com comprimento de onda entre 500-550nm. Primeiramente mediu-se o filme de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$, em seguida foram depositadas as camadas da dispersão de AuNP/DABCOSIL e então mediu-se a espessura destes filmes e posteriormente o filme de $\text{SiO}_2/\text{Lipase}$ foi depositado e após uma semana de secagem foram realizadas as medidas novamente. As medidas foram realizadas em diferentes pontos do filme.

3.3.11 Ângulo de Contato com a Água

Como objetivo de verificar a hidrofobicidade dos filmes na superfície do vidro FTO foram realizadas medidas do ângulo de contato dos filmes $\text{SiO}_2\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ e $\text{SiO}_2\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$. O equipamento utilizado foi o DSA100 (Drop Shape Analyzer), Krüss e o volume da gota de água foi 5 μL .

3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As caracterizações eletroquímicas realizadas por voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato IviumStat utilizando o software Ivium e para a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) utilizou-se o potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30/FRA 2 e utilizou-se o software Nova 2.0.

As medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica de três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência (eletrodo de calomelano saturado para o EPC modificado e eletrodo de prata cloreto de prata, para o eletrodo de vidro FTO com filmes depositados) e um fio de platina como contra eletrodo. Os eletrodos de trabalho utilizados foram os EPC, preparados com os materiais NTCPM40%/ ZrO_2 , NTCPM60%/ ZrO_2 , e com os vidros FTO/ $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$, FTO/ $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ e FTO/ $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$, ao ser utilizado, uma área de 1 cm^2 foi isolada para realização das medidas.

3.4.1 Sensor para Metil Paration

3.4.1.1 Caracterização por Voltametria Cíclica

Os EPC preparados com os materiais NTCPM40%/ZrO₂, NTCPM60%/ZrO₂ foram caracterizados por voltametria cíclica. Utilizou-se como sonda uma solução aquosa contendo o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio 0,001 mol L⁻¹ contendo o eletrólito suporte KCl 0,5 mol L⁻¹. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, e os voltamogramas cíclicos foram realizados em diferentes velocidades de varredura (5 a 300 mVs⁻¹). A faixa de potencial foi de -0,2 até 0,6 V.

3.4.1.2 Caracterização por Voltametria de Pulso Diferencial

Para o sensor de metil paration (MP) utilizou-se o EPC NTCPM60%/ZrO₂. Foram realizados testes de tampão usando os tampões fosfato de sódio (PBS), acetato de sódio (AC) e Britton-Robinson (BR) todos 0,1 mol L⁻¹ em pH 7. Maiores intensidades do pico de interesse do MP foram observadas nos tampões PBS e BR, então esses tampões foram testados em diferentes valores de pH. Para o tampão PBS foi testado os pH 5,8; 6,4; 7,0; 7,4 e 8,0 e tampão BR os pH 4,0; 4,5 e 5,0. As medidas foram obtidas por VPD.

A resposta do eletrodo EPC NTCPM60%/ZrO₂ em relação às adições de MP foi verificada por VPD e utilizou-se na célula 10 mL de tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4 contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. A solução estoque do pesticida foi preparada em etanol na concentração de 0,01 mol L⁻¹ e alíquotas de 20 µL a 200 µL foram adicionadas para construção da curva de calibração. A cada adição, a solução foi agitada por 15 segundos e permaneceu em repouso por 60 segundos antes da leitura. A faixa de potencial aplicada foi de 0,5 até -0,7 V, tempo de pulso de 110 milissegundos, amplitude de pulso de 100 mV, velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

3.4.1.3 Análise de Interferentes para Metil Paration

Os interferentes foram escolhidos baseando-se na possibilidade de a presença dessas substâncias interferirem na detecção do MP, testou-se os cátions e os ânions Cu²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, SO₄²⁻, Na⁺, Ni²⁺ e o composto nitroaromático *p*NPP. Os interferentes na detecção de MP foram testados para o EPC NTCPM60%/ZrO₂. Uma alíquota de 10 µL, na concentração de 0,1 mol L⁻¹, foi adicionada logo após a adição e leitura do MP. As medidas foram realizadas por voltametria de pulso diferencial.

3.4.1.4. Amostra Real

Para preparo da solução estoque de amostra real, a soja (30g) foi triturada com diclorometano (30 mL), o extrato foi filtrado e então adicionou-se 2 mL de etanol. Utilizando essa solução, foi preparada a solução estoque de extrato de soja contendo $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de MP.

3.4.2 Sensor para Triglicerídeos

3.4.2.1 Caracterização por Voltametria Cíclica

Os eletrodos FTO/SiO₂/ZrO₂ e FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP foram caracterizados por voltametria cíclica. Utilizou-se como sonda uma solução aquosa contendo o par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ contendo o eletrólito suporte KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, e os voltamogramas cíclicos foram realizados em diferentes velocidades de varredura (5 a 300 mVs^{-1}). A faixa de potencial foi de $-0,5$ até $1,0 \text{ V}$.

Testes com o *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) foram realizados por voltametria cíclica para verificar a imobilização da enzima no eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase. Foi utilizado o tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 contendo KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e uma solução estoque de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de *p*NPP que foi obtida diluindo-se o *p*NPP em 1 mL de dimetilsulfóxido e em seguida adicionou-se 9 mL de tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ contendo 0,5% de triton x-100. Alíquotas de 200, 400 e 600 μL foram adicionadas e a cada adição agitou-se por 1 minuto seguido de repouso por 1 minuto antes de cada leitura. A faixa de potencial aplicada foi de $-0,5$ até $1,0 \text{ V}$. Também foi avaliado a interferência da velocidade de varredura de 10 a 100 mV s^{-1} .

3.4.2.2 Caracterização por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Utilizando a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) o efeito do pH na detecção de TB foi investigado em tampão fosfato ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) com pH variando de 6,0 a 8,0.

Foi avaliado o comportamento do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase na presença de diferentes concentrações de ácido butírico. Para isso foi utilizada uma solução de ácido butírico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ da qual alíquotas de 50 a 500 μL foram adicionadas. Avaliou-se o comportamento do eletrodo com a enzima inativada em relação às adições da solução estoque de tributirina (50 a 250 μL). Para inativar a enzima, o eletrodo foi aquecido em estufa a 150°C por 30 minutos.

A resposta do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase em relação às adições de tributirina foi observada pela técnica EIE. As medidas foram realizadas na faixa de frequência de 100 kHz até 10 mHz e aplicou-se um potencial de 0,19 V que corresponde ao potencial de meia onda obtida por voltametria cíclica em solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] com amplitude de 5 mV.

Na célula eletroquímica usou-se a solução de ferrocianeto de potássio/ferricianeto de potássio 0,001 mol L⁻¹ (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]), com o eletrólito suporte, KCl 0,1 mol L⁻¹ preparada em solução tampão PBS pH 7,0. Uma solução estoque de 0,01 mol L⁻¹ de tributirina (TB) foi obtida diluindo o mesmo em PBS 0,05 mol L⁻¹ contendo 0,5 % de triton x-100 conforme descrito em Rezvani et al. [45]. Alíquotas de 50 µL a 370 µL foram adicionadas e a cada adição agitou-se por 1 minuto seguido de repouso por 1 minuto antes de cada leitura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA MP USANDO UM COMPÓSITO DE NANOTUBOS DE CARBONO E ZIRCÔNIA

Neste trabalho foram obtidos dois compósitos à base de nanotubos de carbono e zircônia, o compósito NTCPM40%/ZrO₂ planejado para ter 40% de nanotubos carbono e o compósito NTCPM60%/ZrO₂ planejado para ter 60% de nanotubos de carbono.

Esses compósitos foram aplicados como eletrodos de pasta de carbono para determinação de metil paration.

4.1.1 Caracterização Estrutural e Textural Dos Compósitos NTCPM/ZrO₂

O compósito NTCPM60%/ZrO₂, foi caracterizado por TGA, EDS por MEV, MET, BET, CHN, espectroscopia de Raman e DRX, já o compósito NTCPM40%/ZrO₂ foi caracterizado pelas técnicas TGA, BET e análise elementar CHN.

A análise termogravimétrica (TGA) forneceu informações sobre a perda de massa dos compósitos NTCPM40%/ZrO₂, NTCPM60%ZrO₂ e dos NTCPM puros da Bayer (Baytubes). Os termogramas obtidos estão apresentados na Figura 17.

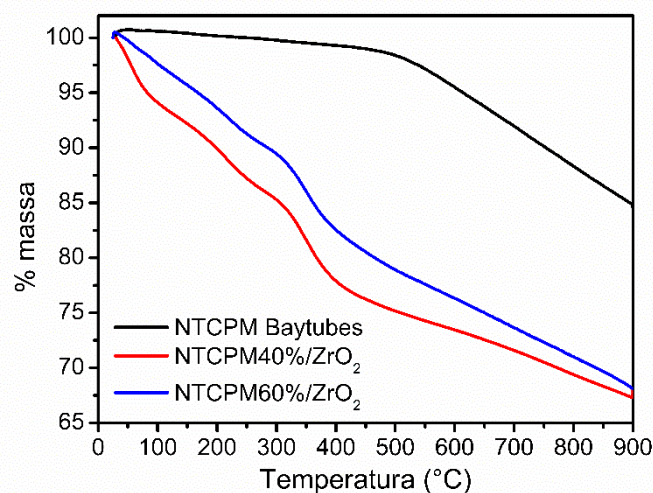


Figura 17: Análise termogravimétrica dos compósitos NTCPMZrO₂ e dos NTCPM puros da Baytubes.

Conforme a Figura 17, as amostras dos compósitos NTCPM/ZrO₂ apresentaram perdas de massa significativas durante todo processo de aquecimento. Entre temperatura ambiente e 150 °C ocorrem as perdas de massa relativas à umidade dos materiais analisados. Essas perdas estão próximas à 8 % e 4 % para as amostras de compósito com 40 % e 60 % de NTCPM respectivamente, e próximas de zero para os NTCPM puros que são hidrofóbicos, indicando assim que os compósitos se tornaram mais hidrofílicos.

As amostras dos compósitos, ao contrário dos NTCPM puros, contêm toda parte orgânica proveniente da fase sol-gel e apresenta maior perda de massa entre 150 e 600 °C. A partir de 250 °C, a perda de massa dos compósitos também está relacionada à desidroxilação dos grupos hidroxila do xerogel de zircônia formado durante o processo sol-gel, que são convertidos em óxido de zircônio durante o aquecimento [71]. Mesmo considerando todas as perdas, o resíduo dos compósitos com 40 e 60 % de NTCPM são de 67,4 % e 73,3 % da massa original, respectivamente.

Por outro lado, os NTCPM puros Baytubes apresentam perda de massa mais expressiva a partir de 500 °C, mantendo um resíduo de 84,5%, indicando sua alta estabilidade térmica. A Tabela 2 traz o percentual de massa perdida em determinadas faixas de temperatura.

Tabela 2: Perda percentual de massa das amostras de NTCPM/ZrO₂

Amostra	Percentual de perda de massa (%)			Resíduo (%)
	25 °C – 150 °C	150 °C – 600 °C	600 °C – 900 °C	
NTCPM40%/ZrO ₂	7,82	19,62	5,17	67,39
NTCPM60%/ZrO ₂	4,0	19,0	3,75	73,25
NTCPM Baytubes	0,0	4,51	10,97	84,52

A Figura 18 (a) mostra uma imagem de MEV do compósito NTCPM60%/zircônia obtida com elétrons retroespalhados, em que áreas escuras e claras formam domínios micrométricos.

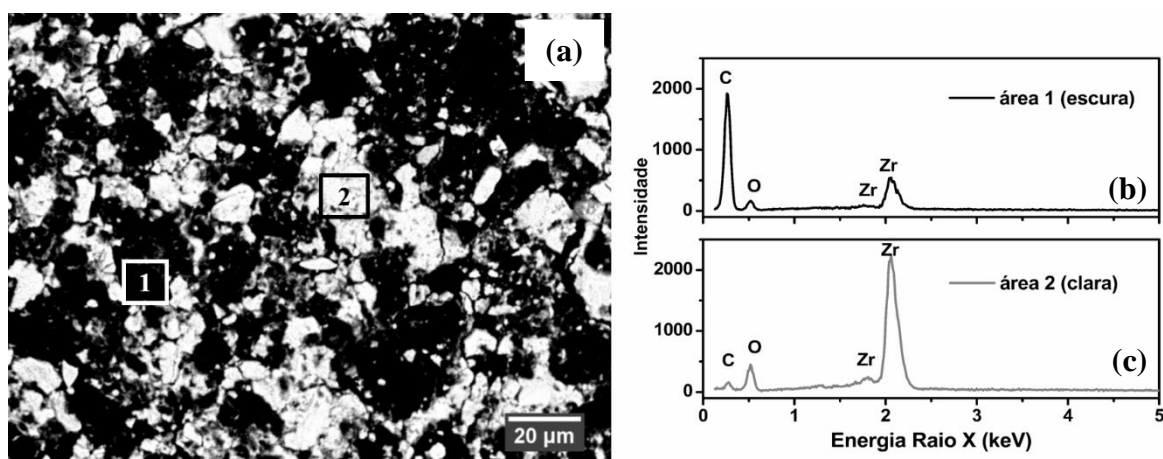


Figura 18: Imagem de elétrons retroespalhados obtida por MEV do compósito NTCPM60%/zircônia (a). Espectros EDS de (b) área 1 (escuro) e (c) área 2 (claro).

Nas imagens de elétrons retroespalhados (Figura 18 (a), as regiões com números atômicos mais altos são claras devido ao alto poder de espalhamento dos elementos de maior número atômico. Os espectros de EDS das áreas 1 e 2 (Figura 18 (b) e 18 (c), respectivamente) indicam que a área escura 1 é rica em carbono (e pobre em Zr), enquanto a área clara 2 é rica em Zr (e pobre em carbono).

A técnica de MET fornece detalhes da morfologia dos NTCPM. As imagens do compósito NTCPM60%/ZrO₂ são apresentadas na Figura 19 (a) e 19 (b).

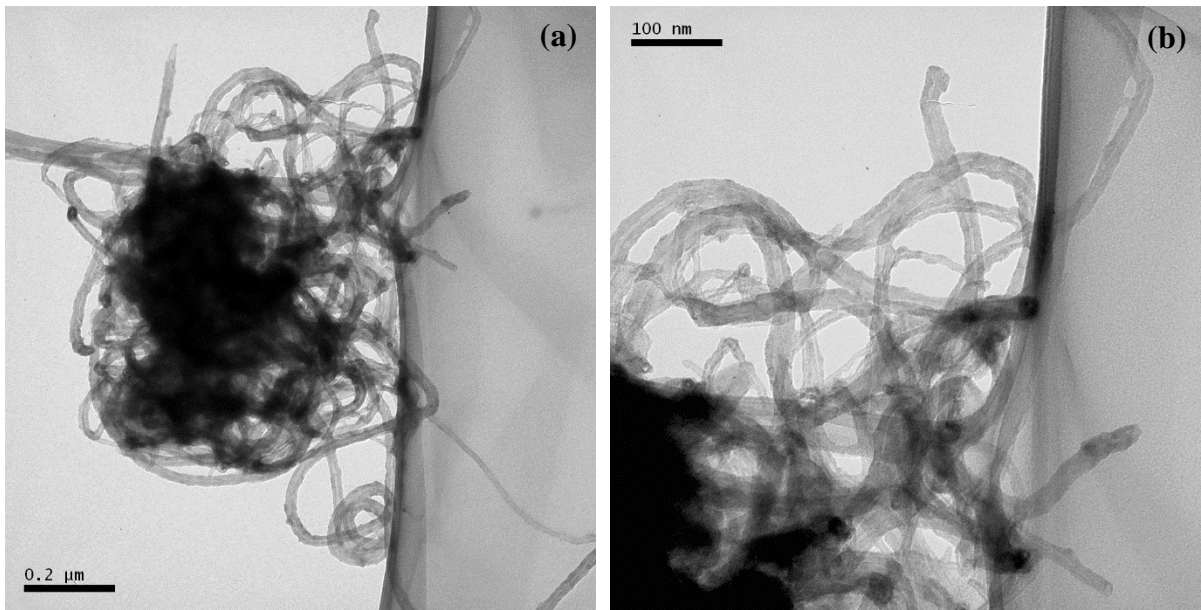


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão do compósito NTCPM60%/ZrO₂ em diferentes magnificações.

As imagens de MET, no modo de transmissão convencional, fornece detalhes da morfologia do compósito NTCPM60%/ZrO₂. É possível observar que a integridade física e morfológica do NTCPM está preservada. O material escuro e aparentemente amorfo, que envolve os emaranhados de NTCPM, é interpretado como a matriz de zircônia, visto que o zircônio tem um alto número atômico e, portanto, aparece escuro nas imagens de MET convencional. Essas características já foram observadas em trabalhos anteriores [70,71]. As imagens confirmam que os nanotubos estão presentes em grandes proporções volumétricas, suficientes para fornecer caminhos contínuos que permitem a condutividade elétrica. Neste compósito, a fração de zircônia fornece suporte para o NTCPM.

A análise textural dos compósitos NTCPM/ZrO₂ foi avaliada por isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio, que são apresentadas na Figura 20, e das quais são obtidas as curvas de distribuição de poros apresentadas na Figura 21. A área superficial e volume de poros estão apresentados na Tabela 3.

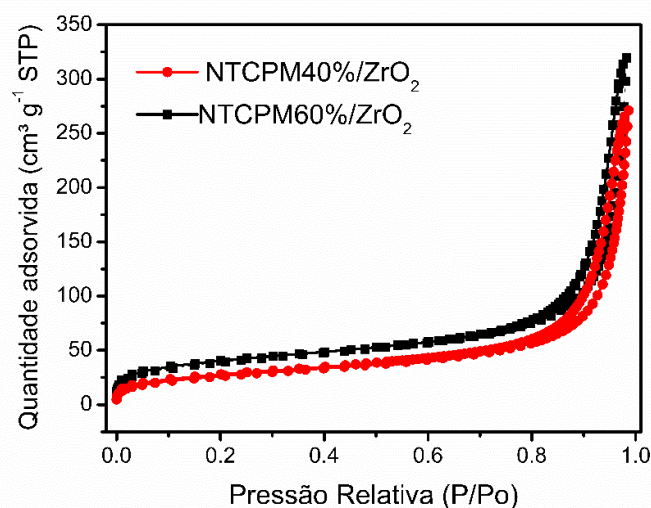


Figura 20: Análise textural dos compósitos NTCPM/ZrO₂: Isotermas de adsorção-desorção de N₂.

Nas isotermas mostradas na Figura 20, se observa em todos compósitos um aumento da quantidade de adsorção de nitrogênio em uma pressão relativa P/P_o acima de 0,8, e também presença de histerese, esse comportamento é típico de materiais mesoporosos contendo poros maiores que 5nm [150].

As curvas de distribuição de tamanho de poros BJH (Figura 21), apresentam distribuição bimodal de poros. A região dos poros com diâmetro abaixo de 5 nm com pico em 2,3 nm está relacionada aos poros formados pela boca dos tubos dos NTC e a região dos mesoporos com diâmetro entre 10 e 50 nm, com máximo em 30 nm, deve-se ao enrolamento desses tubos [153], conforme observado por MET. Esta distribuição de tamanho de poros bimodal é típica de NTCPM e foi mantida nos compósitos [154,155].

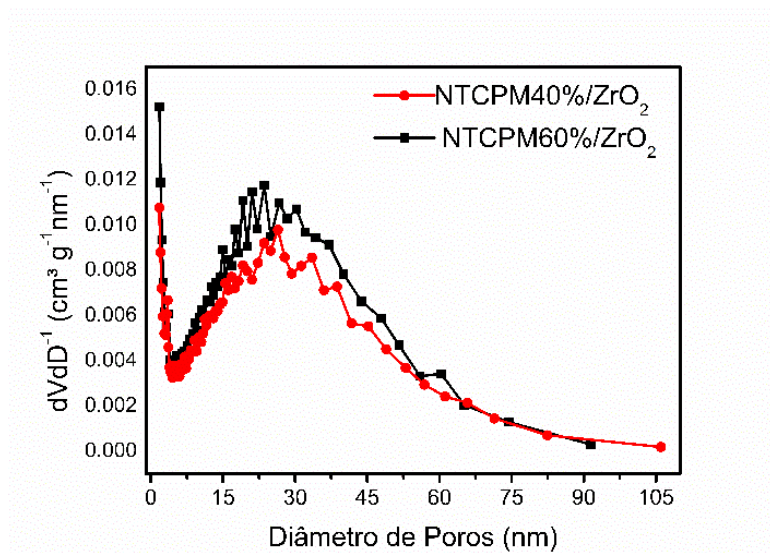


Figura 21: Distribuição de tamanho de poros dos compostos NTCPM/ZrO₂ obtida pelo método BJH.

Conforme a Tabela 3, os compostos NTCPM40%/ZrO₂ e NTCPM60%/ZrO₂ apresentaram volume de poros de 0,406 e 0,469 cm³ g⁻¹ e área superficial de 96 e 135 m² g⁻¹ respectivamente. Essas porosidades e áreas superficiais significativas podem ser explicadas pela presença de uma elevada quantidade volumétrica de NTCPM nos compostos, que é maior ainda no composto NTCPM60%/ZrO₂. Quando considerados isoladamente, os NTCPM possuem uma área superficial de 196 ± 5 m² g⁻¹ [154]. Estes resultados de propriedades texturais, evidenciaram a presença de micro e mesoporosidade nos compostos de NTCPM/zircônia, bem como a elevada área superficial que tornam este tipo de material elegível para sua aplicação como eletrodo, pois facilitam o processo de difusão dos analitos, melhorando a resposta do eletrodo.

Os compostos NTCPM40%/ZrO₂ e NTCPM60%/ZrO₂ foram analisados pela técnica de Análise Elementar CHN com o intuito de verificar a quantidade de carbono que foi incorporada. O resultado está apresentado na Tabela 3:

Tabela 3: Análise elementar e valores de área superficial e volume de poros dos compostos NTCPM60%/ZrO₂ e NTCPM40%/ZrO₂.

Amostra	C (%)	H (%)	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poros (cm ³ g ⁻¹)
NTCPM40%/ZrO ₂	40,76	2,42	96	0,406
NTCPM60%/ZrO ₂	44,63	1,57	135	0,469

De acordo com o resultado obtido, pode-se concluir que um alto teor de NTCPM foi incorporado, como pôde ser verificado também pelas imagens de MET, e pela espectroscopia Raman (Figura 22) que apresenta picos característicos dos NTC. O compósito que foi planejado para conter aproximadamente 60 % de NTCPM pela análise elementar apresentou cerca de 45 %.

No trabalho de dos Santos et al. [71] uma quantidade menor de NTC, cerca de 40 % foi incorporada ao compósito e foi obtida uma porcentagem de carbono semelhante a 40 %. No entanto, no presente trabalho o compósito passou por um processo de lavagem com etanol, podendo ter removido o excesso de NTCPM que não foi incorporado à matriz de zircônia, podendo ter resultado em uma menor porcentagem de NTCPM no compósito depois de lavado.

No caso do compósito NTCPM40%/ZrO₂ o teor de carbono encontrado também foi próximo de 40 %. Pode-se concluir que talvez a matriz de zircônia tenha capacidade de reter apenas 40 % de nanotubos de carbono sem que ocorra lixiviação.

O compósito NTCPM60%/ZrO₂, assim como os NTCPM puros da Baytubes foram caracterizados pela técnica de espectroscopia Raman. Os espectros obtidos podem ser observados na Figura 22 e sua inserção respectivamente.

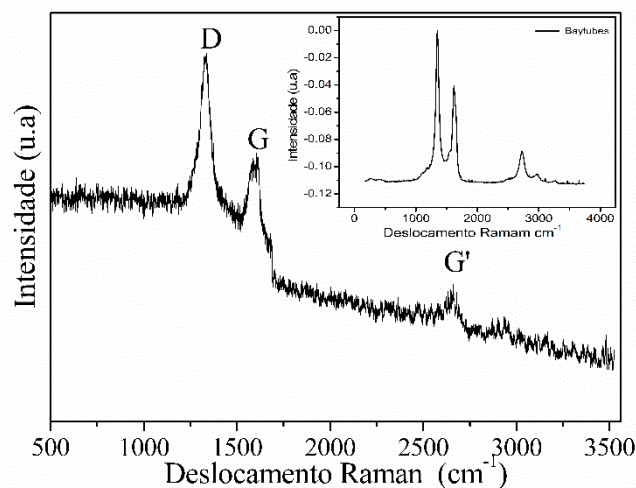


Figura 22: Espectro Raman do compósito NTCPM60%/ZrO₂. Figura inserida: Espectro Raman dos NTCPM puros da Baytubes.

O espectro dos NTCPM puros apresentado na inserção da Figura 22, é característico das estruturas de carbono, contendo as bandas D, em $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$, que está relacionada aos defeitos devido aos átomos de carbono tetraédricos contidos nos NTCPM; banda G em $\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$ que

é atribuído à vibração dos hexágonos formados pelos carbonos trigonais da estrutura dos nanotubos e a banda G' em $\sim 2680\text{ cm}^{-1}$ que representa o tom harmônico da banda D [156].

Essas mesmas bandas são encontradas no espectro do compósito NTCPM60%/ZrO₂ (Figura 22), confirmando assim a presença e integridade dos NTCPM. O espectro também mostrou um efeito de fluorescência causado pela presença de zircônia. Resultado semelhante foi obtido pelo estudo de dos Santos et al. [71] em que materiais baseados em NTCPM incorporado em zircônia.

O compósito NTCPM60%/ZrO₂, assim como os NTCPM puros da Baytubes também foram caracterizados pela técnica de difração de raios X. A Figura 23 mostra o difratograma do compósito NTCPM60%/ZrO₂ e do NTCPM puro (inserção da Figura 23). Pode-se observar que o compósito apresenta o pico característico do NTCPM que aparece em $2\theta = 26^\circ$, este pico está relacionado ao plano grafítico 002 do carbono.

O difratograma do compósito apresentado na Figura 23 é muito semelhante ao difratograma dos nanotubos de carbono puros, sendo um bom indicativo da composição do compósito ser majoritário em NTCPM [71]. Ademais, não foram observados picos referentes à fase formada pelo gel de zircônia, apenas um halo entre 25° e 35° , indicando que esta fase nesse compósito está na forma amorfa. Esse resultado era esperado, uma vez que a zircônia foi preparada pelo método sol-gel à temperatura ambiente e não sofreu nenhum tratamento térmico que pudesse induzir à cristalização.

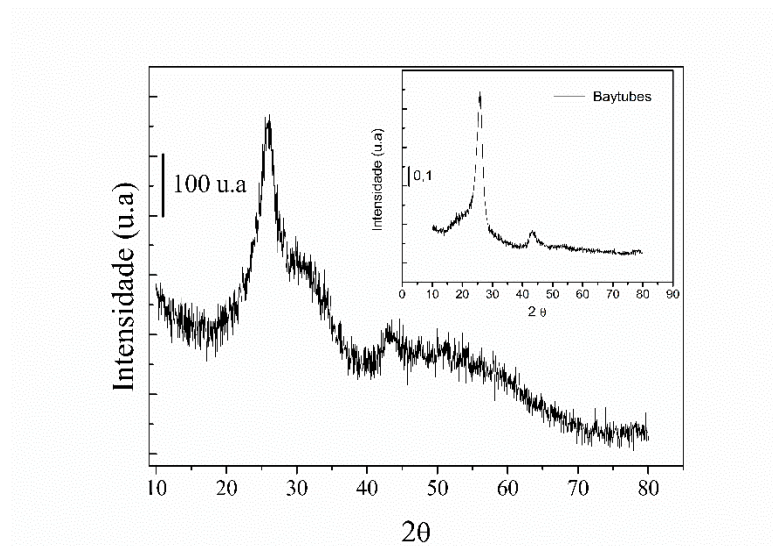


Figura 23: Difratograma de raios X do compósito NTCPM60%/ZrO₂. Figura inserida: Difratograma de raios X dos NTCPM puros da Baytubes.

4.1.2 Caracterização Eletroquímica em Solução de Ferro/Ferricianeto de Potássio ($K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$) dos Compósitos à Base de NTCPM/ ZrO_2

O comportamento redox dos eletrodos modificados com NTCPM40%/ ZrO_2 e NTCPM60%/ ZrO_2 , foi avaliado por VC em uma solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ com concentração de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, os voltamogramas cíclicos após estabilização das medidas são apresentados na Figura 24.

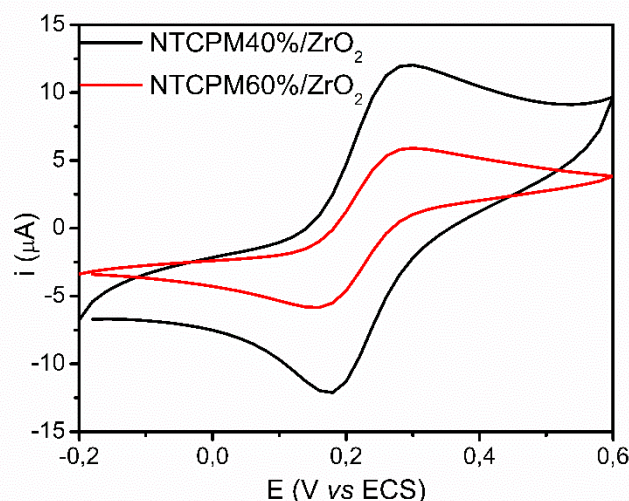


Figura 24: Voltamogramas cíclicos comparativos dos EPC com os compósitos NTCPM40%/ ZrO_2 e NTCPM60%/ ZrO_2 na presença de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

Nos voltamogramas obtidos é possível observar o comportamento redox do sistema Fe(II)/Fe(III) similar nos dois EPC avaliados, com valores de potenciais de picos de oxidação e redução próximos. O compósito NTCPM60%/ ZrO_2 mostrou uma corrente capacitiva menor entre os potenciais de -0,2 e 0,1 quando comparado com o material NTCPM40%/ ZrO_2 . Esse resultado pode estar associado a maior quantidade de nanotubos de carbono incorporados no compósito NTCPM60%/ ZrO_2 , que causaram a formação de uma dupla camada elétrica menor na interface eletrodo/solução, conseqüentemente uma menor corrente capacitiva.

Apesar de apresentar uma diferença pequena na porcentagem em massa carbono, conforme o resultado de CHN, a proporção volumétrica de carbono no compósito NTCPM60%/ ZrO_2 aumenta devido a sua baixa densidade, se comparada a da zircônia. Devido a isso o compósito NTCPM60%/ ZrO_2 apresentou maior área superficial e também maior volume de poros (Tabela 3). A partir desses voltamogramas, construiu-se a Tabela 4 com parâmetros pertinentes ao estudo eletroquímico como intensidade de pico anódico (i_{pa}), intensidade de pico catódico (i_{pc}), a relação i_{pa}/i_{pc} e a separação do pico anódico (E_{pa}) e do pico

catódico (E_{pc}), sendo $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$. Através desses parâmetros, é possível avaliar comparativamente a reversibilidade do processo redox envolvido na superfície dos EPC.

Tabela 4: Parâmetros eletroquímicos determinados por VC com velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

EPC	ΔE_p (mV)	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)	i_{pa}/i_{pc}
NTCPM40%/ZrO ₂	120	12,0	-12,1	0,99
NTCPM60%/ZrO ₂	140	5,9	-5,8	1,01

Todos os EPC modificados apresentaram separação de picos cujo valor é superior ao valor de ΔE_p ideal, que é 0,059 V. Esse comportamento é típico de um processo *quasi-reversível*, indicando resistência de transferência de elétrons na superfície do eletrodo [154,155]. Em relação à intensidade dos picos anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}), o valor da relação i_{pa}/i_{pc} , próximo a 1, indica boa reversibilidade [157,159].

De acordo com os valores da Tabela 4, o material NTCPM40%/ZrO₂ apresentou menor sobrepotencial para a transferência de carga, ou seja, menores valores de ΔE_p quando comparados ao material NTCPM60%/ZrO₂. Adicionalmente, observa-se a maior intensidade de picos anódico e catódico, na velocidade de 20 mVs⁻¹, para o EPC NTCPM40%/ZrO₂ entretanto esse eletrodo apresentou-se mais capacitivo em relação ao compósito NTCPM60%/ZrO₂, e tratando-se de medidas quantitativas é desejável uma maior contribuição da corrente faradaica do que de corrente capacitiva.

Os VC dos EPC NTCPM/ZrO₂ em diferentes velocidade de varredura, de 5 a 300 mVs⁻¹ e estão apresentados na Figura 25 (a) para o EPC NTCPM60%/ZrO₂ e na Figura 26 (a) para o EPC NTCPM40%/ZrO₂.

As relações entre i_{pa} , i_{pc} e a $v^{1/2}$ e entre i_{pa} , i_{pc} e a v são mostradas nas Figura 25 (b) e Figura 26 (b) respectivamente.

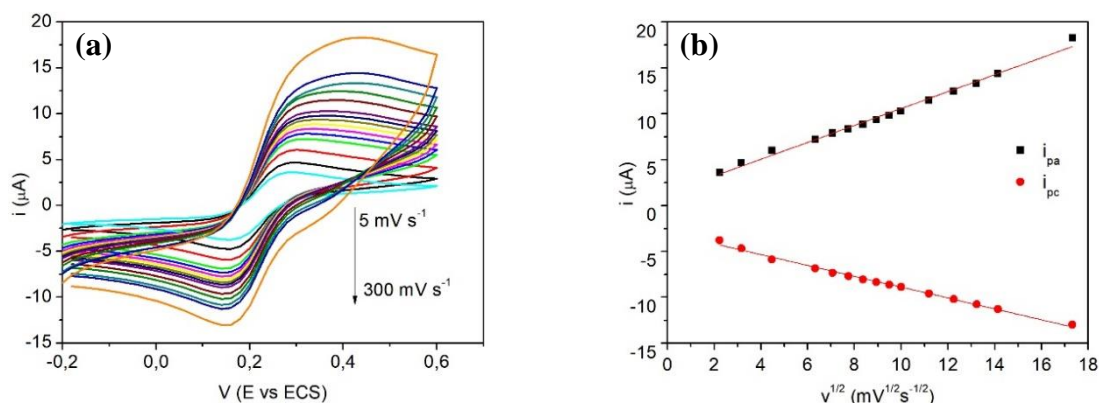


Figura 25: VC do EPC NTCPM60%/ZrO₂ variando as velocidade de varredura de 5 a 300 mVs⁻¹ em solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ (a). Relação linear entre i_{pa} , i_{pc} e $v^{1/2}$ (b).

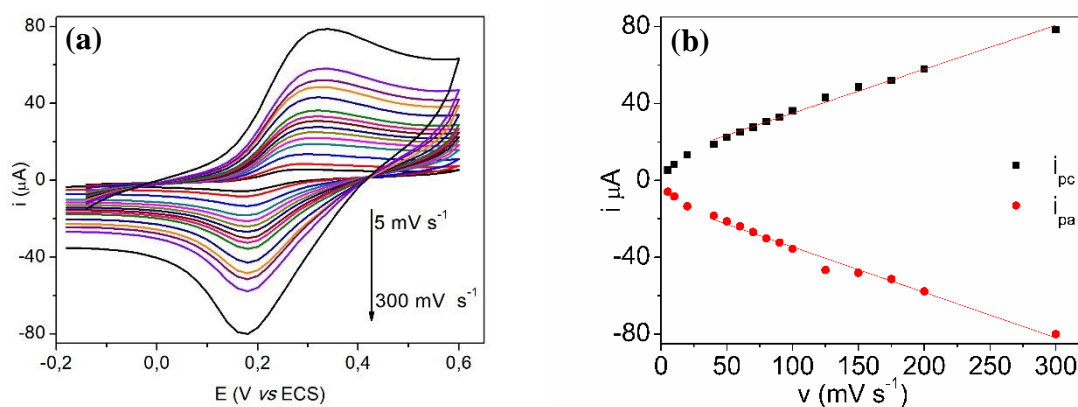


Figura 26: VC do EPC NTCPM40%/ZrO₂ variando as velocidade de varredura de 5 a 300 mVs⁻¹ em solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ (a). Relação linear entre i_{pa} , i_{pc} e v (b).

É notável para os dois EPC um ligeiro aumento na separação do pico, que é proporcional ao aumento da velocidade de varredura, sugerindo que o processo envolvido na interface eletrodo/solução é *quasi-reversível* [138]. Além disso, os VC do EPC NTCPM60%/ZrO₂ mostraram uma relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a intensidade dos picos anódico e catódico, conforme mostrado na Figura 25 (b).

As equações das retas da relação linear entre a raiz quadrada da velocidade de varredura e a intensidade dos picos anódico e catódico obtidas para o eletrodo NTCPM60%/ZrO₂ são descritas por:

$$i_{pa}(\mu A) = 1,37 (\pm 0,24) + 0,92 (\pm 0,02) v^{1/2} \left(mV^{1/2} s^{-1} \right) \text{ com } R^2 = 0,991 \quad \text{Equação 7}$$

$$i_{pc}(\mu A) = -2,97 (\pm 0,13) - 0,59 (\pm 0,01) v^{1/2} \left(mV^{1/2} s^{-1} \right) \text{ com } R^2 = 0,993 \quad \text{Equação 8}$$

As equações das retas da relação linear entre a velocidade de varredura e a intensidade dos picos anódico e catódico obtidas para o eletrodo NTCPM40%/ZrO₂ são descritas por:

$$i_{pa}(\mu A) = 9,32 (\pm 1,09) + 0,24 (\pm 0,01) v(mV s^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,992 \quad \text{Equação 9}$$

$$i_{pc}(\mu A) = -8,81 (\pm 1,13) - 0,25 (\pm 0,01) v(mV s^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,992 \quad \text{Equação 10}$$

O comportamento linear entre i_{pa} , i_{pc} e $v^{1/2}$, sugere que a oxidação e a redução da solução sonda na interface eletrodo/solução são controladas majoritariamente por difusão [160,161]. Assim, a área eletroativa do EPC NTCPM60%/ZrO₂ pode ser calculada com aproximação usando a Equação 11 do modelo de Randles-Sevcik [161].

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D_0 \cdot C \cdot v^{1/2} \quad \text{Equação 11}$$

Onde i_p é a corrente de pico (A) a 0,02 V s⁻¹, n é o número de elétrons transferidos no processo redox, A é a área eletroativa (cm²), D_0 é o coeficiente de difusão de uma solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] ($6,7 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹), C é a concentração da solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] (1×10^{-6} mol L⁻¹).

Isolando A (área eletroativa) da Equação 11, a área eletroativa foi determinada, resultando em 7,4 mm² para EPC NTCPM60%/ZrO₂, que é semelhante a outros eletrodos baseados em NTCPM [163,164]. Esta área eletroativa quando comparada com demais trabalhos citados, é considerada satisfatória para aplicação do eletrodo como sensor [8,31].

Para o eletrodo NTCPM40%/ZrO₂ não se aplica a equação do modelo de Randles-Sevcik, pois ele só apresentou relação linear entre a velocidade de varredura e i_{pa} e i_{pc} conforme mostrado na Figura 26 (b), indicando um que processo de oxidação e redução do Fe(II)/Fe(III) é controlado majoritariamente por adsorção.

Para confirmar qual processo ocorre na superfície do eletrodo, plotou-se o gráfico da relação entre $\log i_{pa}$, i_{pc} vs $\log v$ conforme mostrado na Figura 27. As equações das retas são descritas por:

$$\log i_{pc}(\mu A) = 0,27 (\pm 0,02) + 0,65 (\pm 0,01) \log v (mV s^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,999 \quad \text{Equação 12}$$

$$\log i_{pa}(\mu A) = 0,28 (\pm 0,03) + 0,64 (\pm 0,02) \log v (mV s^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,995 \quad \text{Equação 13}$$

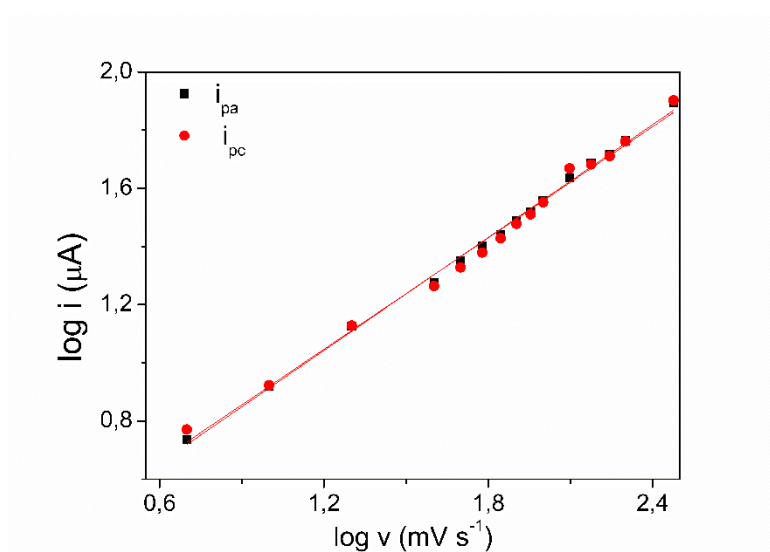


Figura 27: Relação linear entre log i_{pa} , log i_{pc} e log v .

Valores de coeficiente angular entre 0,5 e 1,0 indicam que o processo é controlado por difusão e adsorção simultaneamente [165,166]. Os coeficientes angulares das regressões lineares obtidos foram 0,64 e 0,65. Dessa forma pode-se dizer que os processos de oxidação e redução do Fe(II)/Fe(III) na superfície do eletrodo NTCPM40%/ZrO₂ são controlados por adsorção e difusão.

4.1.3 Aplicação do Compósito NTCPM60%/ZrO₂ como Sensor Eletroquímico Para Metil Paration

Diante dos resultados obtidos, para aplicação na detecção de MP, escolheu-se o compósito NTCPM60%/ZrO₂. O material contendo 40 % de nanotubos, o NTCPM40%/ZrO₂, possui uma maior proporção de zircônia em sua composição e, o eletrodo construído com este material apresentou uma baixa reprodutibilidade e pouca estabilidade nas medidas do branco em solução tampão para detecção do MP. E a estabilização é uma etapa importante antes da adição do analito.

São apresentados na Figura 28, os VC do EPC NTCPM60%/ZrO₂ na ausência (curva A) e presença de $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP (curva B) em solução tampão BR (pH 4).

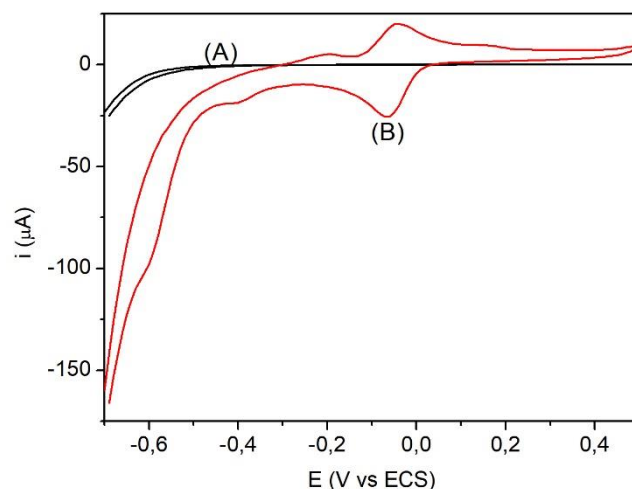


Figura 28: VC do EPC NTCPM60%/ZrO₂ (A) na ausência e (B) na presença de $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4. Velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .

Nota-se, que na ausência de MP, não é verificado corrente de pico anódico ou catódico. E quando em presença de MP observa-se um par de picos redox reversíveis, com potencial de oxidação em $-0,04 \text{ V}$ e de redução em $-0,07 \text{ V}$. Os picos reversíveis são atribuídos ao processo de transferência de dois elétrons [8,37] e estão relacionados às reações de oxidação e redução do grupo hidroxilamina (-NHOH) e do grupo nitroso (-NO). Sendo que a redução do grupo nitro do MP para o grupo hidroxilamina corresponde ao pico de redução irreversível ($E_{pc} = -0,5 \text{ V}$), como representado na Figura 29.

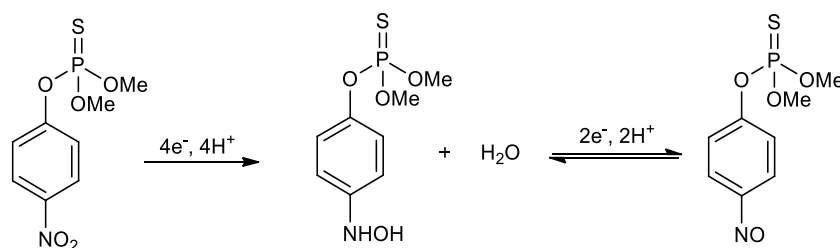


Figura 29: Representação das reações de oxirredução do MP.

As medidas de corrente em função da velocidade de varredura fornecem informações sobre o mecanismo na interface do eletrodo/solução. As VC dos EPC modificados com NTC60%/ZrO₂ na presença de MP, em diferentes velocidades de varredura (5 a 300 mV s^{-1}) são mostradas na Figura 30.

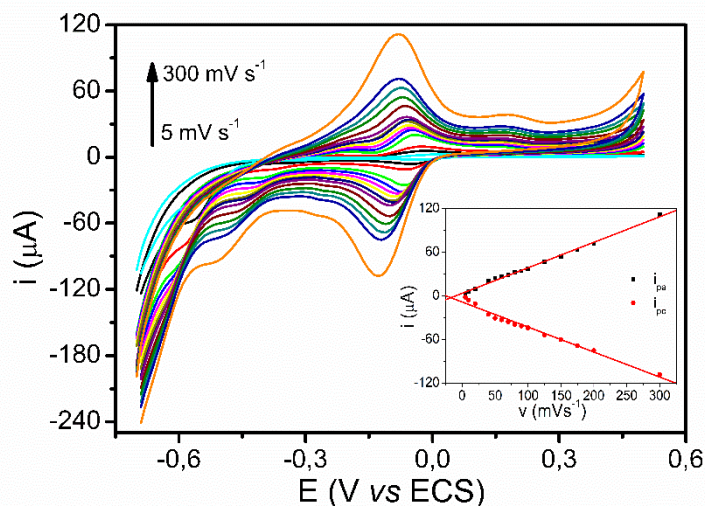


Figura 30: VC obtidos em diferentes velocidades de varredura (5 a 300 mV s^{-1}) para o EPC NTCPM60%/ZrO₂ em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 4 contendo $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP. Figura inserida: Relação entre i_{pa} , i_{pc} e v .

Observa-se que as correntes de pico anódico e catódico aumentam linearmente com o aumento da velocidade de varredura, indicando que a reação na superfície do eletrodo é controlada por adsorção [167]. Na inserção da Figura 30, pode ser observada uma relação linear entre a velocidade de varredura e as intensidades de pico anódico e catódico obtidas para o EPC modificado com NTCPM60%/ZrO₂ na presença de MP. As equações são descritas por:

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = 3,27 (\pm 0,88) + 0,35 (\pm 0,01) v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,997 \quad \text{Equação 14}$$

$$i_{pc}(\mu\text{A}) = 8,6 (\pm 0,72) - 0,34 (\pm 0,01) v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,989 \quad \text{Equação 15}$$

Com o intuito de confirmar qual processo ocorre na superfície do eletrodo, plotou-se o gráfico que mostra a relação entre $\log i_p$ e $\log v$ conforme mostrado na Figura 31 e equações são descritas por:

$$\log i_{pa}(\mu\text{A}) = -0,16 (\pm 0,03) + 0,88 (\pm 0,01) \log v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,997 \quad \text{Equação 16}$$

$$\log i_{pc}(\mu\text{A}) = -0,15 (\pm 0,07) + 0,90 (\pm 0,04) \log v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,989 \quad \text{Equação 17}$$

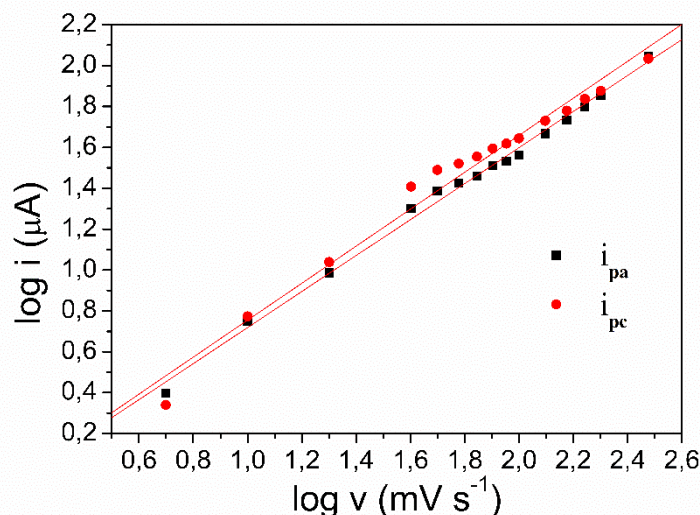


Figura 31: Relação linear entre $\log i_{pa}$, i_{pc} e $\log v$.

De acordo com esse modelo, quando os coeficientes angulares das relações entre $\log i_p$ e $\log v$ apresentam valores entre 0,5 e 1,0, há indicação de que o processo é controlado por difusão e adsorção simultaneamente. Um valor de inclinação de 0,5 implicaria um processo controlado somente por difusão, enquanto um valor de 1,0 indica que o processo é controlado somente por adsorção [165,166].

Quatro séries de experimentos foram realizadas com eletrodos diferentes na presença de MP e em condições semelhantes (Tabela 5). Os coeficientes angulares médios, os desvios padrão e os coeficientes de variação são apresentados em sequência. O coeficiente angular médio do $\log i_{pa}$ vs $\log v$ foi de 1,01, com desvio padrão de 0,09 e o coeficiente de variação foi de 8,9 %. Quanto à reação catódica, o coeficiente angular médio do $\log i_{pc}$ vs $\log v$ foi de 1,09 com desvio padrão de 0,06 e o coeficiente de variação foi de 5,5 %.

Tabela 5: Coeficientes angulares das relações entre $\log i_p$ e $\log v$ para EPC NTCPM60%/ZrO₂ em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4 contendo $291,3 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de MP.

Coeficiente $\log i_{pa}$ vs $\log v$	Coeficiente $\log i_{pc}$ vs $\log v$
0,99481	1,0831
1,10034	1,0783
0,84878	0,98904
1,10716	1,211746

Considerando-se que o coeficiente angular e média foram próximos a 1, pode-se afirmar que o mecanismo de oxidação e redução do MP é controlado por adsorção. O EPC modificado

por NTCPM60%/ZrO₂ é baseado em um compósito no qual os componentes são dispersos em um nível de micrômetro. Tanto a porção de zircônia, quanto o NTCPM apresentam capacidade de adsorção do MP. Essa característica nos NTCPM, pode ser atribuída a grande área superficial desse material que facilita a reação eletroquímica do MP [39]. Já a zircônia apresenta afinidade específica por grupos fosfato contidos no MP [168].

4.1.4 Comportamento Eletroquímico do MP por Voltametria de Pulso Diferencial

A fim de obter a melhor resposta para a detecção de MP com o EPC NTCPM60%/ZrO₂, foram avaliados por VPD, o comportamento do eletrodo em diferentes soluções tampão (acetato de sódio, Britton-Robinson e fosfato de sódio), comumente reportadas na literatura [37,169,170] para detecção desse analito.

Essas avaliações de tampão e pH são etapas muito importantes, que permitem determinar as condições ótimas que viabilizam o processo de oxidação/redução na superfície do eletrodo e de detecção do analito, visando obter a melhor resposta do eletrodo, como a melhor sensibilidade e o menor limite de detecção. A Figura 32 apresenta os VPD obtidos para os tampões estudados.

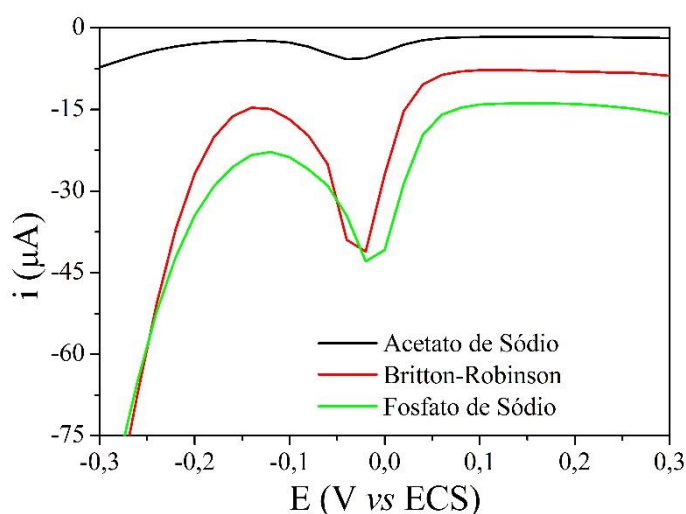


Figura 32: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ na presença de $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP com $v=20 \text{ mV s}^{-1}$ em tampão AC, BR e PBS, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, todos em pH 7.

Nos VPD obtidos é possível observar o pico característico da reação de redução do MP. Vale ressaltar que para cada análise construiu-se um novo eletrodo, e para inferir em qual tampão apresentou melhor resultado, calculou-se os valores de i_p para cada tampão testado.

Conforme os valores de i_p obtidos, se observa que as intensidades de corrente catódicas foram similares para BR ($29,4 \mu\text{A}$) e PBS ($24,2 \mu\text{A}$) (considerando a altura do pico a partir da

sua base). Dessa forma foram realizados testes em PBS em uma faixa mais ampla de pH, variando de 5,8 até 8,0 Figura 33 (a). Ao observar os resultados, se pode notar que maiores intensidades de corrente foram obtidas em valores de pH mais ácidos.

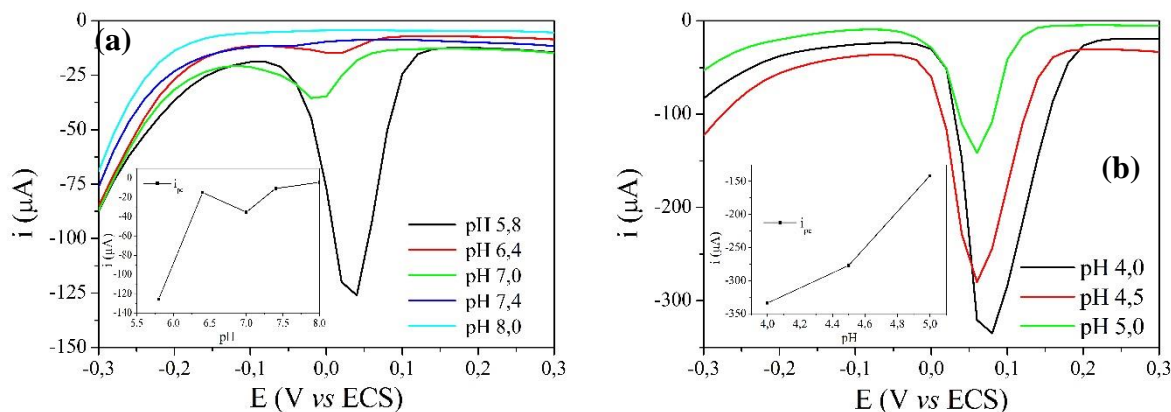


Figura 33: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ na presença de $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP com $v=20 \text{ mV s}^{-1}$ em PBS, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em pH de 5,8 até 8,0. Figura inserida: Efeito do pH na corrente catódica do pico (a). VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ na presença de $291,3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de MP com $v=20 \text{ mV s}^{-1}$ em BR, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, em pH de 4,0 a 5,0. Figura inserida: Efeito do pH na corrente catódica do pico (b).

Todavia, em trabalhos reportados na literatura [40,169,170] o MP apresentou valores significativos de intensidade de corrente em pH ácido. Dessa forma a resposta do analito foi testada em tampão Britton-Robinson nos pH 4,0; 4,5 e 5,0 (Figura 33 (b), uma vez que esse tampão apresentou resposta satisfatória.

Conforme mostrado na Figura 33(b), os picos característicos do MP são mais intensos em pH 4,0. Logo esse foi o pH escolhido para realizar a determinação do MP por voltametria de pulso diferencial. O fato do pico de redução do MP apresentar melhores resultados de corrente em valores de pH mais ácidos, está relacionado com a concentração de H⁺ no meio, que favorece as reações eletroquímicas que envolvem transferência de prótons, como é o caso das reações de oxirredução do MP (Figura 29). Já valores de pH mais alcalinos podem resultar em degradação dos compostos presentes nos pesticidas OP [37,171].

O resultado de VPD para MP, usando o EPC NTCPM60%/ZrO₂, em uma faixa mais ampla de potencial, é mostrado na Figura 34. Dois picos de redução são vistos, um próximo a -0,5 V e outro próximo a 0,1 V. O pico de redução de MP em -0,5 V (NO₂-MP a NHOH-MP) foi selecionado, uma vez que a intensidade deste pico foi maior quando comparado com o pico de redução do MP a 0,1 V, conforme observado. O mesmo pico de redução de MP também foi escolhido no estudo de Govindasamy et al. [172].

A curva (B) da Figura 34 também mostra o VPD do MP na mesma concentração, utilizando um EPC modificado sem zircônia, utilizando apenas NTCPM, onde é possível

observar que os picos são menos intensos e menos definidos. Esse resultado indica que a presença de zircônia no compósito potencializa marcadamente a resposta do eletrodo, aumentando a intensidade dos picos de redução e deslocando a posição dos picos para valores de potencial mais positivo. Já foi demonstrado que a ligação Zr-O da zircônia atrai fortemente grupos fosfóricos dos pesticidas organofosforados (OP) proporcionando assim uma forte afinidade por esse grupo [124, 125]. A zircônia é usada com frequência como um agente de captura para enriquecimento seletivo de OP e proteínas fosforiladas devido à sua forte afinidade com o grupo fosfórico [168].

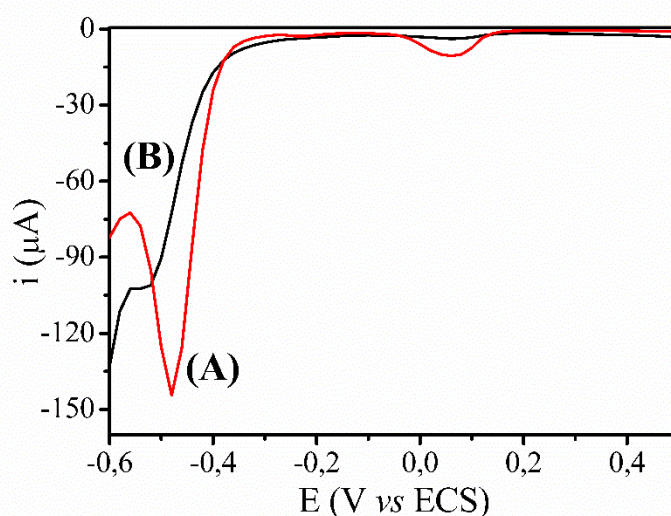


Figura 34: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ (Curva A) e EPC NTCPM (Curva B) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0 na presença de 99×10^{-6} mol L⁻¹ de MP.

A resposta do eletrodo NTCPM60%/ZrO₂ em relação às adições de MP em concentrações na faixa de $19,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ a $176,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ foi verificada por VPD em tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0. Os voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 35 (a) e a variação da intensidade de corrente em função da concentração do MP é mostrada na Figura 35 (b).

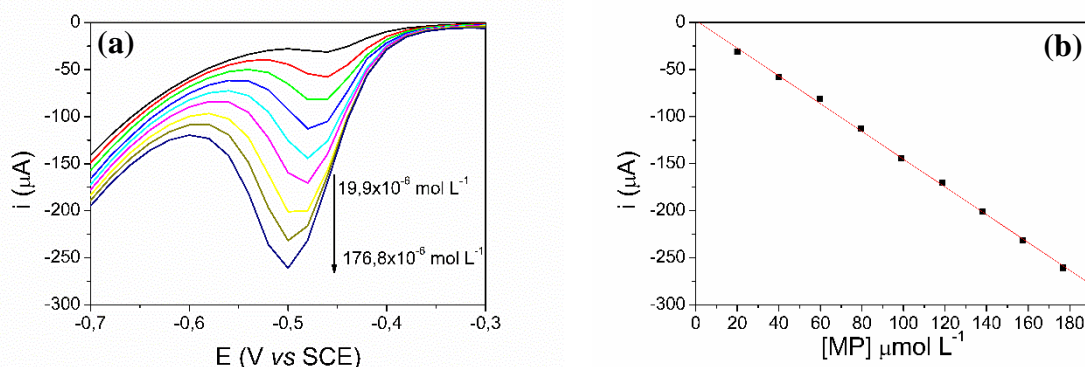


Figura 35: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0 com adições de metil paration 0,01mol L⁻¹(a). Relação linear entre i_{pc} e a concentração de MP ($19,9 \times 10^{-6}$ e $176,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) (b).

Conforme pode ser visto na Figura 35 (b), existe uma relação linear entre i_{pc} e a concentração de MP na faixa de $19,9 \times 10^{-6}$ a $176,8 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ que é descrita pela Equação 18:

$$i (\mu A) = 2,185 (\pm 2,06) - 1,475 (\pm 0,02)[MP](\mu mol L^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,999 \quad \text{Equação 18}$$

A sensibilidade do eletrodo foi obtida pelo coeficiente angular da reta que apresentou o valor de $1,475 \mu A \mu M^{-1} L$. O limite de detecção (LD) calculado foi de 9×10^{-9} mol L⁻¹ por meio da fórmula $LD = 3 * SD_b / \text{sensibilidade}$ e o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela fórmula $LD = 10 * SD_b / \text{sensibilidade}$ foi de $0,03 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Onde SD_b é o desvio padrão do branco com $n=3$. A seguir, a Tabela 6 mostra uma comparação do EPC NTCPM60%/ZrO₂ com outros eletrodos reportados na literatura para detecção de MP.

Tabela 6: Comparação de diferentes eletrodos na determinação de metil paration

Eletrodo	Faixa linear (mol L⁻¹)	Limite de detecção (mol L⁻¹)	REF.
AB–chitosan film/CGE	$2 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-9}$	[173]
Pd/MWCNTs	$3,43 \times 10^{-7} - 4,81 \times 10^{-5}$	$1,72 \times 10^{-7}$	[37]
MWCNTs–PAAM/GCE	$5 \times 10^{-9} - 1 \times 10^{-5}$	2×10^{-9}	[8]
MIPs	$2,0 \times 10^{-7} - 1,0 \times 10^{-5}$	$6,7 \times 10^{-8}$	[38]

Eletrodo	Faixa linear (mol L⁻¹)	Limite de detecção (mol L⁻¹)	REF.
Ag@GNRs/SPCE	$0,005 \times 10^{-6} - 2780 \times 10^{-6}$	$0,5 \times 10^{-9}$	[172]
CNTs/CP	$3,43 \times 10^{-8} - 3,43 \times 10^{-6}$	$13,4 \times 10^{-9}$	[39]
TiO ₂ /Graphene/GCE	$0,002 - 5 \times 10^{-6}$ $5 - 100 \times 10^{-6}$	1×10^{-9}	[170]
MIP/Au/GCE	$0,05 - 15 \times 10^{-6}$	$0,01 \times 10^{-6}$	[174]
CP5-rGO/GCE	$0,001 - 150 \times 10^{-6}$	$0,3 \times 10^{-9}$	[171]
ZrO ₂ NPs- chitosan/PEDOT/ITO	$17,2 \times 10^{-9} - 6,86 \times 10^{-6}$	$9,61 \times 10^{-9}$	[125]
NPG/GCE	$0,5 - 150 \times 10^{-6}$	$0,02 \times 10^{-6}$	[175]
NTCPM60%/ZrO₂	$19,9 - 176,8 \times 10^{-6}$	$9,0 \times 10^{-9}$	Este trabalho [176]

AB: Acetileno Preto

CGE: Eletrodo carbono cerâmico

Pd/MWCNTs: Paládio/Nanotubos de parede múltipla

PAAM: Poli (acrilamida)

MIPs: Polímeros molecularmente impressos

GNR/SPCE: Nanofitas de grafeno/eletrodo de carbono impresso em tela

CNTs/CP: Nanotubos de carbono/Papel de carbono

CP5-rGO: Pillar[5]arene-Grafeno reduzido

ZrO₂ NPs/PEDOT/ITO: Nanopartículas de zircônia/ Poli 3,4-etilenodioxitiofeno/óxido de índio dopado com estanho

NPG: Ouro nanoporoso

Se pode notar que o eletrodo deste trabalho apresentou baixo LD quando comparado com a maioria dos trabalhos, indicando que é altamente sensível em baixas concentrações. É um resultado muito interessante quando se leva em consideração que o eletrodo foi construído com um composto relativamente simples obtido por uma técnica de baixo custo que é o sol-gel.

O LD obtido é suficiente para a detecção de concentrações letais para peixes, a qual, segundo o estudo de Monteiro [177], a dose letal foi de 3,97 mg/L ($13,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e de acordo com Machado e Fanta [178] a concentração letal é de 7 ppm (24×10^{-6} mol L⁻¹).

Ainda, segundo a Resolução CONAMA 20/86, revisada para a Resolução CONAMA 357/05, que estabelece que a dose permitida de organofosforados totais e carbanatos para

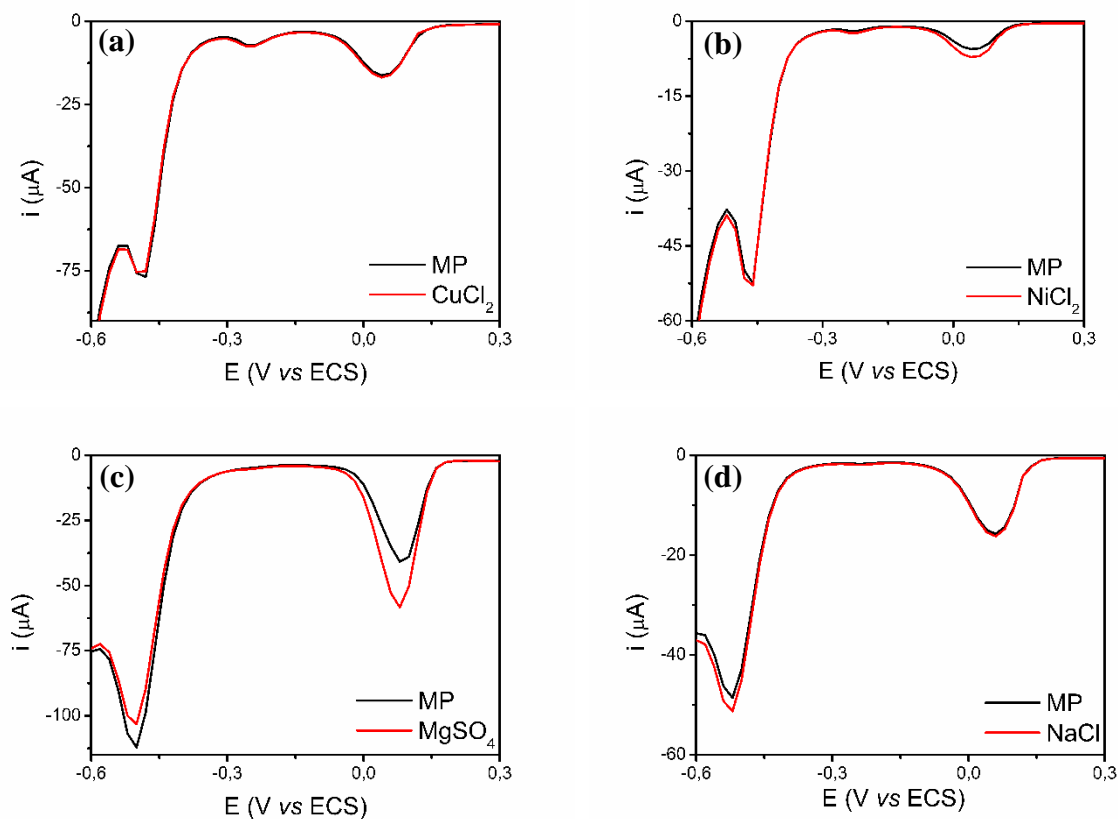
garantir a vida aquática é de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0,343 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), também está dentro dos valores que o EPC NTCPM60%/ZrO₂ é capaz de detectar.

Outro fator importante é que a resposta para o metil paration foi alcançada com 1 minuto e 15 segundos após a imersão do eletrodo na solução contendo MP enquanto alguns trabalhos apresentam respostas depois de um tempo maior [8,124,169,170].

4.1.5 Interferentes

Como se pretende aplicar o eletrodo produzido em amostras reais, é de grande importância avaliar o efeito de alguns íons e compostos nitro aromáticos na detecção do MP e testar a seletividade do compósito NTCPM60%/ZrO₂. A determinação por VPD do MP em concentração $49,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, foi testada na presença de $10 \mu\text{L}$ de uma solução $0,1 \text{ mol/L}^{-1}$ dos íons Cu²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, SO₄²⁻, Na⁺, Ni²⁺ e do composto nitrofenólico *p*NPP conforme pode ser vista na Figura 36.

Os resultados indicaram uma alta seletividade do MP pelo compósito NTCPM/ZrO₂, já que não apresentou alteração significativa na intensidade do pico do MP. Apenas os íons Mg²⁺ e SO₄²⁻ apresentaram interferência na medida de MP. Esses íons, quando em concentração de $9,4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ implicaram em uma redução de 7,8 % na *i*_{pc} do pico do MP Figura 36 (c).



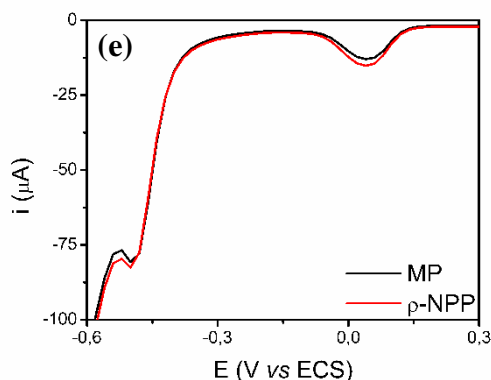


Figura 36: VPD do EPC NTCPM60%/ZrO₂ em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4 na presença de 49,8×10⁻⁶ mol L⁻¹ de MP com adições dos íons de Cu²⁺ (a), de Cl⁻ (a, b e d), de Ni²⁺ (b), de Mg²⁺ (c) de SO₄²⁻ (c) de Na⁺ (d) e do pNPP (e).

4.1.6 Repetibilidade e Reprodutibilidade

A repetibilidade e reprodutibilidade do EPC confeccionado com o NTCPM60%/ZrO₂ foram avaliadas. O teste de repetibilidade foi realizado por VC em uma solução contendo 99×10⁻⁶ mol L⁻¹ de MP conforme mostrado na Figura 37. O mesmo eletrodo foi usado em 13 ciclos e o desvio padrão relativo das medidas foi de 0,91 %. Após 20 ciclos o desvio aumentou para 7,6 %. Para o teste de reprodutibilidade foram usados 7 eletrodos diferentes usando uma solução contendo 39,8×10⁻⁶ mol L⁻¹ de MP (Figura 38). O desvio padrão relativo obtido foi de 14,2 %, indicando uma boa reprodutibilidade na preparação dos eletrodos.

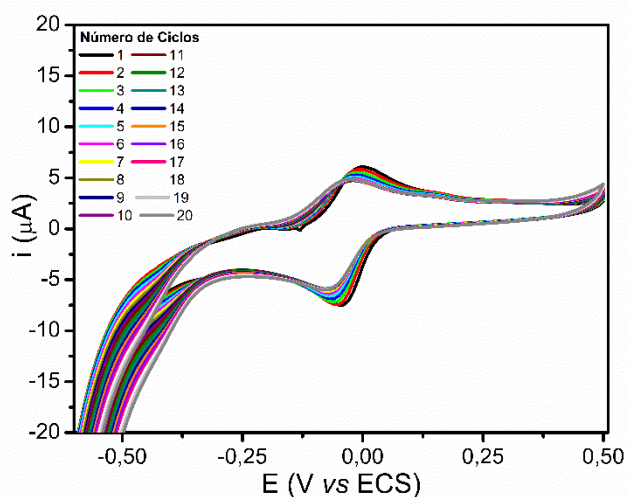


Figura 37: VC do EPC NTCPM60%/ZrO₂ em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 4 na presença de 99×10⁻⁶ mol L⁻¹ de MP em solução tampão BR 0,1 M pH 4 em velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹.

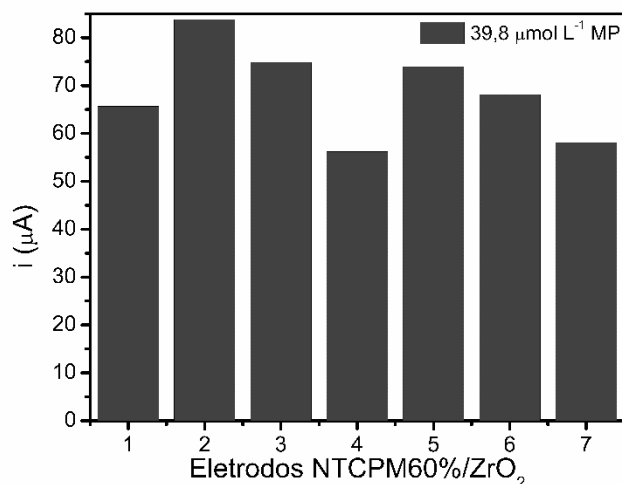


Figura 38: Reprodutibilidade do sensor NTCPM60%/ZrO₂ na presença de 39,810⁻⁶ mol L⁻¹ de MP com os valores de corrente catódica representadas em módulo para cada eletrodo.

4.1.7 Aplicação em Amostras de Extrato de Soja

Para avaliação do sensor eletroquímico em amostra real, a determinação de MP foi realizada em uma amostra de soja contaminada com MP. Foram utilizadas diferentes concentrações de MP nas amostras de soja, a saber, 160, 180 e 200×10⁻⁶ mol L⁻¹. As recuperações das amostras medidas ficaram entre 102 e 113 %, e o desvio padrão relativo foi de 5,2 %. O pesticida MP não foi detectado nas amostras em branco. Esses resultados indicam que este eletrodo apresenta potencial para a determinação de MP em amostras de extrato de soja.

4.2 DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA TRIGLICERÍDEOS USANDO O VIDRO CONDUTOR FTO COM FILMES DE SiO₂/ZrO₂/AuNP/LIPASE

4.2.1 Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica dos Filmes SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP

A primeira etapa foi o planejamento do método de deposição de um filme SiO₂/ZrO₂ sobre o vidro FTO. Com a finalidade de encontrar a relação molar Si/Zr que seja ideal para que as propriedades de condução do eletrodo sejam mantidas próximas às propriedades do vidro FTO, foram depositados filmes de SiO₂/ZrO₂ com diferentes porções de silício incorporados no Sol-sílica/zircônia. Essas proporções foram 3, 5, 10, 20, 30 e 50 % de silício. O estudo foi realizado por voltametria cíclica na presença de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] com concentração

de $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e os voltamogramas obtidos estão na Figura 39. É possível observar que o filme com a proporção molar de 10/90 de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ apresenta picos de oxidação e redução do Fe(II)/Fe(III) mais definidos e mais intensos que os demais filmes.

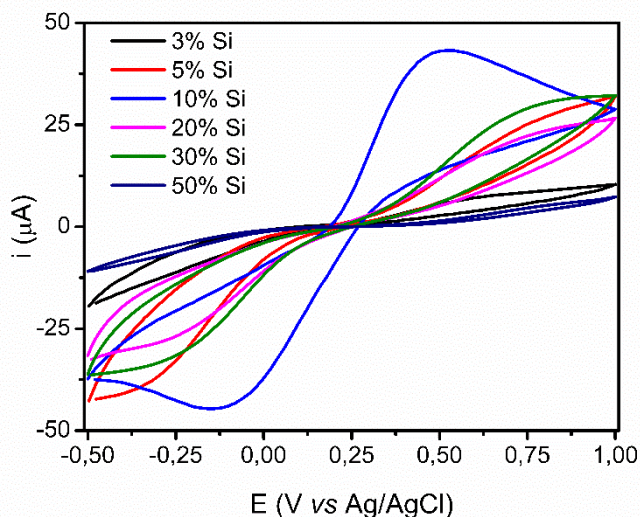


Figura 39: VC dos eletrodos $\text{FTO/SiO}_2/\text{ZrO}_2$ com diferentes porcentagens de silício em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Uma vez que essa proporção foi definida como 10 % mol no Sol-sílica/zircônia, na sequência foi estudada a deposição do filme AuNP/DABCOSIL . Foram feitos testes para avaliar o desempenho do eletrodo $\text{FTO/SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ com diferentes quantidades de mergulhos na dispersão AuNP/DABCOSIL . Foram feitos 3, 5 e 10 mergulhos na dispersão de nanopartículas de ouro sobre o vidro $\text{FTO/SiO}_2/\text{ZrO}_2$. A Figura 40 traz os resultados de voltametria cíclica obtidos nas mesmas condições já usadas anteriormente. Podemos concluir que a formação de 5 camadas de AuNP/DABCOSIL resultou em melhor desempenho do eletrodo $\text{FTO/SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ que apresentou maior intensidade de corrente para o par redox Fe(II)/Fe(III) , quando comparado com os eletrodos sem AuNP , com 3 e 10 camadas, e apresentando desempenho semelhante ao vidro FTO limpo. No eletrodo de vidro FTO onde foram depositadas 10 camadas, provavelmente mais do agente DABCOSIL foi incorporado, e como se trata de um polímero híbrido orgânico-inorgânico solúvel, ele forma um filme que interfere na passagem de corrente elétrica [100, 101]. Sendo assim, o eletrodo contendo 5 camadas foi considerado adequado para imobilizar a enzima lipase e prosseguir com as demais caracterizações, bem como para serem aplicados como eletrodos na determinação de triglicerídeos.

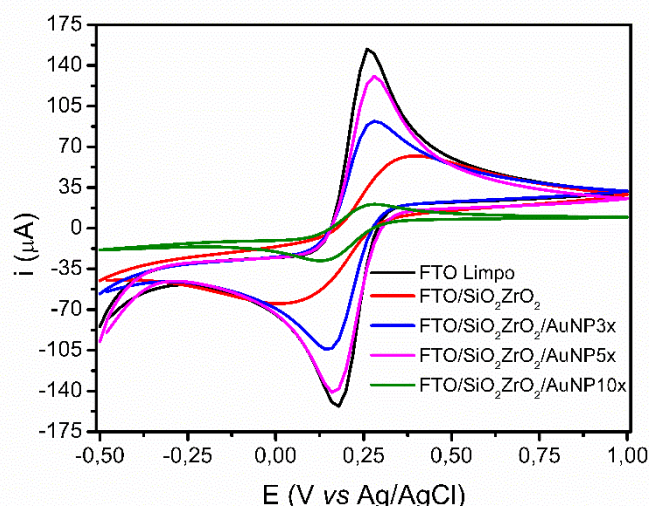


Figura 40: VC dos eletrodos FTO limpo, FTO/SiO₂/ZrO₂ e FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP com 3, 5 e 10 mergulhos na dispersão AuNP/DABCOSIL em solução de de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹.

4.2.2 Caracterização Físico-Química dos Filmes Sobre o Vidro Condutor FTO

Os filmes SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP depositados no vidro FTO foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região UV-Vis, os filmes SiO₂/ZrO₂, SiO₂/ZrO₂/AuNP e SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura e perfilometria óptica, e os filmes de SiO₂/ZrO₂/AuNP e SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase sobre o vidro FTO foram caracterizados por ângulo de contato com a água.

Os espectros de absorção UV-Vis dos filmes SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP são apresentados na Figura 41 (a). A banda-de absorção das AuNP estabilizadas por este dispersante em suspensões aquosas é observada próximo a 521 nm [10] como mostrado na Figura 41(b). De acordo com o trabalho de Menezes et al. [10] AuNP estabilizadas com DABCOSIL apresentaram diâmetro médio de 6,5 ±2,4 nm.

Na Figura 41 (a) observa-se que o espectro do filme SiO₂/ZrO₂/AuNP, apresenta o máximo de absorção em ~530nm, confirmando a presença das nanopartículas depositadas, esse máximo não foi observado no filme SiO₂/ZrO₂. Esse pequeno deslocamento na banda para maiores comprimentos de onda é comum acontecer quando ocorre a deposição dos filmes em um substrato de vidro devido às mudanças do índice de refração [118]. Ocorre também o alargamento da banda característico de acoplamento plasmônico no filme.

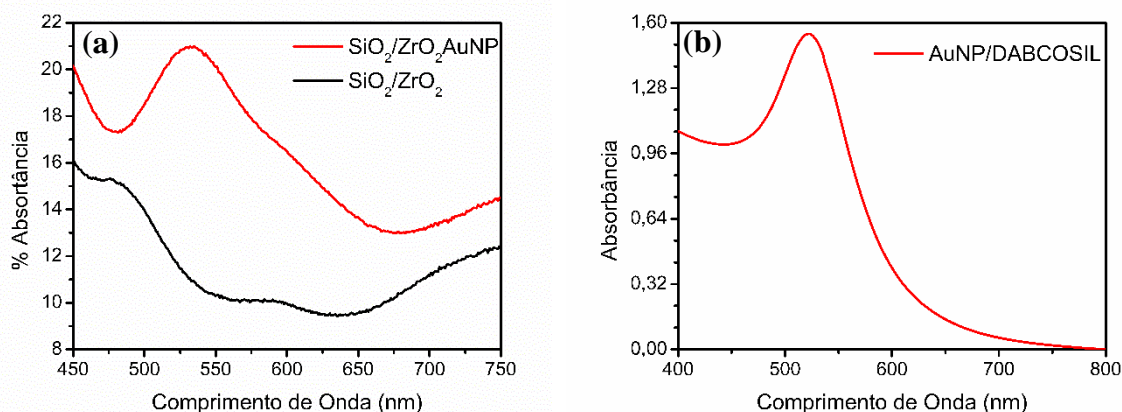


Figura 41: Espectros de absorção UV-Vis obtido para os filmes SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP sobre o vidro FTO (a). Espectros de absorção UV-Vis obtido para a dispersão AuNP/DABCOSIL (b).

Sabe-se que as nanopartículas de ouro apresentam grande afinidade por biomoléculas, sendo assim, a presença delas é importante para a construção de um biossensor. As nanopartículas de ouro melhoram a atividade catalítica da lipase devido às interações eletrostáticas e mudanças conformacionais e ainda melhoram a seletividade [179].

Cada estágio de deposição dos filmes na superfície do vidro FTO foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens dos filmes podem ser vistas nas Figura 42, Figura 43 e Figura 44 respectivamente.

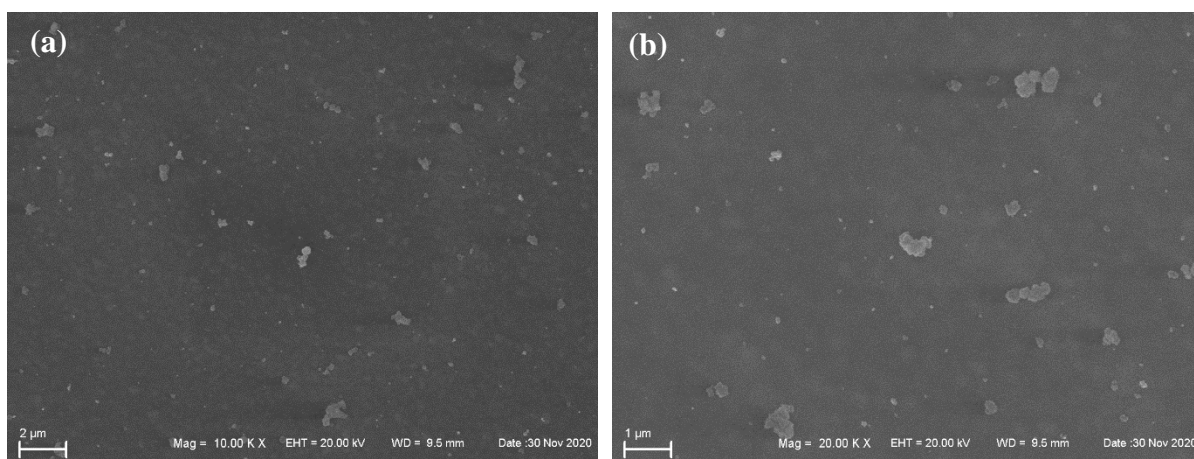


Figura 42: Imagens de MEV dos filmes SiO₂/ZrO₂ sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).

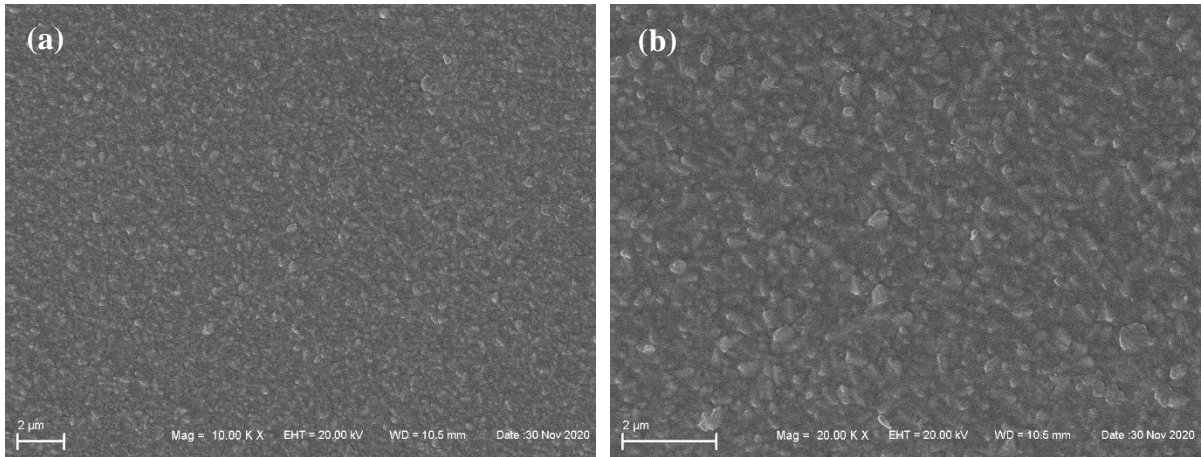


Figura 43: Imagens de MEV dos filmes $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).

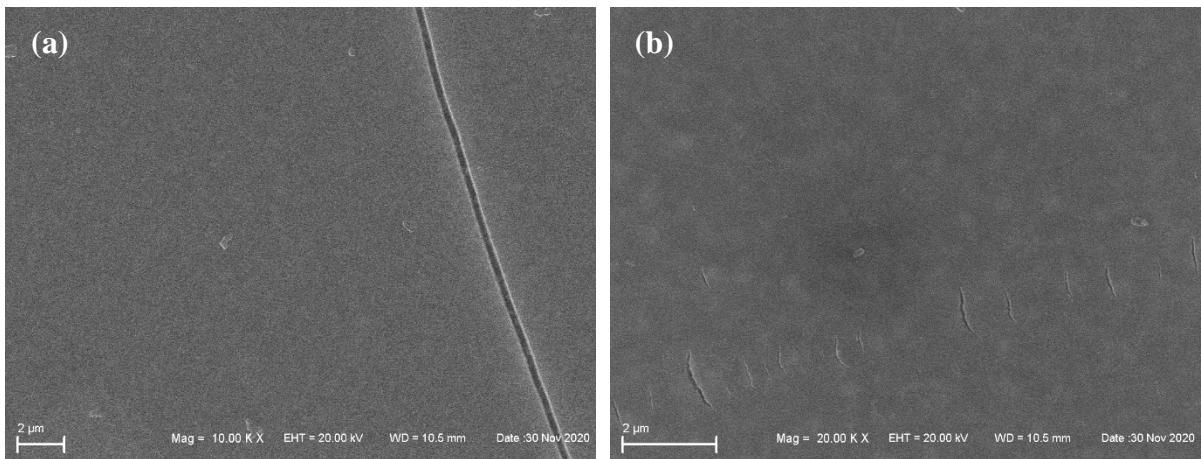


Figura 44: Imagens de MEV dos filmes $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ sobre o vidro FTO com aumento de 10k x (a) e 20k x (b).

De modo geral os filmes parecem ser homogêneos, íntegros e sem muitos defeitos na magnitude observada. A deposição das nanopartículas de ouro estabilizadas pelo cloreto de DABCOSIL (Figura 43 (a) e 43 (b)) parece aumentar a rugosidade do filme, que é novamente amenizada pela deposição do filme $\text{SiO}_2/\text{Lipase}$ (Figura 44 (a) e 44 (b)). Esses resultados demonstram que os métodos desenvolvidos foram muito satisfatórios para a deposição dos filmes.

Para os filmes $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ e $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ foram realizadas medidas do ângulo de contato com a água conforme apresentado nas Figura 45 (a) e (b) respectivamente. Materiais com ângulo de contato com a água abaixo de 90° são considerados hidrofílicos e acima de 90° são hidrofóbicos. Os filmes de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ e $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ exibiram características de superfície hidrofílica com ângulo de contato de $66,76^\circ \pm 1,35^\circ$ e

$60,42^\circ \pm 1,74^\circ$, respectivamente. As enzimas, por característica, apresentam a superfície externa hidrofílica o que as torna solúveis em água, porém sua parte interna é hidrofóbica [180,181]. A característica hidrofílica da amostra $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ também pode ser explicada pela presença do gel de sílica que se forma para aprisionar a lipase, pois esse filme tem a superfície revestida por grupos OH.

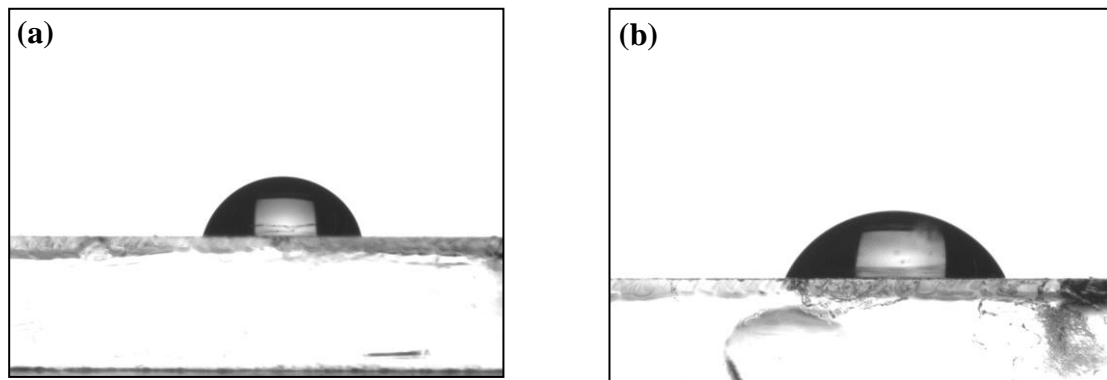


Figura 45: Ângulo de contato da água para o filme $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ (a). Ângulo de contato da água para o filme $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ (b).

São considerados filmes finos, os filmes obtidos com espessura $<1 \mu\text{m}$ depositados usando as técnicas *spin coating*, *dip coating* ou *spray coating* [182].

Na Figura 46 se pode observar a espessura média de cada filme depositado na superfície do vidro FTO, obtida pela técnica de perfilometria óptica. O filme fino de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ apresentou espessura média de $0,206\mu\text{m} \pm 0,026$. A espessura média do filme fino de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}$ foi de $0,382\mu\text{m} \pm 0,021$, o valor da espessura do filme aumentou em relação ao filme anterior, podendo ser uma evidência da formação dos filmes de $\text{AuNP}/\text{DABCOSIL}$. Os filmes obtidos apresentaram espessuras compatíveis com trabalhos apresentados na literatura [60,87], onde filmes foram sintetizados por sol-gel e depositados por técnicas semelhantes. Já o filme de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2/\text{AuNP}/\text{Lipase}$ apresentou espessura média de $1,289\mu\text{m} \pm 0,037$, não podendo então ser denominado um filme fino. Esse aumento na espessura é indicativo da imobilização lipase oclusa na matriz da sílica.

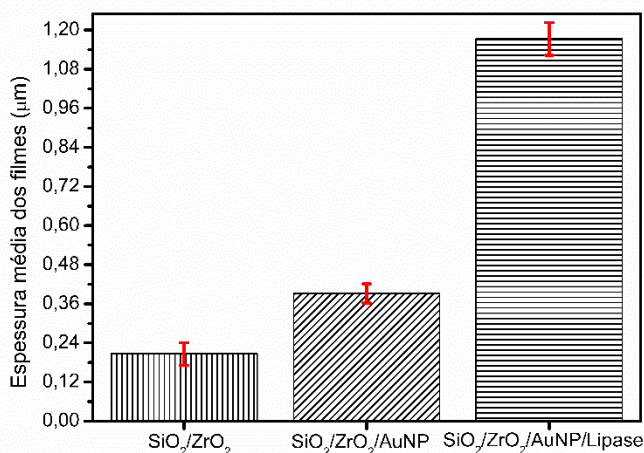


Figura 46: Espessura dos filmes SiO₂/ZrO₂, SiO₂/ZrO₂/AuNP e SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase na superfície do vidro FTO.

4.2.3 Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância do Eletrodo FTO SiO₂ZrO₂/AuNP/Lipase.

Para confirmação da imobilização da lipase e escolha da melhor concentração (2,7 mg mL⁻¹ ou 5,4 mg mL⁻¹) de enzima a ser usada no Sol-sílica/Lipase, foram realizados testes por VC, utilizando o substrato *p*NPP. Os resultados apresentados a seguir são do eletrodo contendo 5,4 mg mL⁻¹ da enzima lipase *Candida Rugosa* imobilizada, pois o eletrodo contendo 2,7 mg mL⁻¹ da lipase não apresentou picos na VC como pode ser visto na Figura 47 (a). A Figura 47 (b) mostra os VC em diferentes concentrações de *p*NPP (0 a 14,6×10⁻⁶ mol L⁻¹), onde é possível observar que somente na concentração de 14,6×10⁻⁶ mol L⁻¹ os picos de oxirredução são definidos e com maior intensidade. Os picos observados na VC, são referentes à oxirredução produto resultante da hidrólise do *p*NPP em presença da enzima conforme demonstrado na Figura 48 (b).

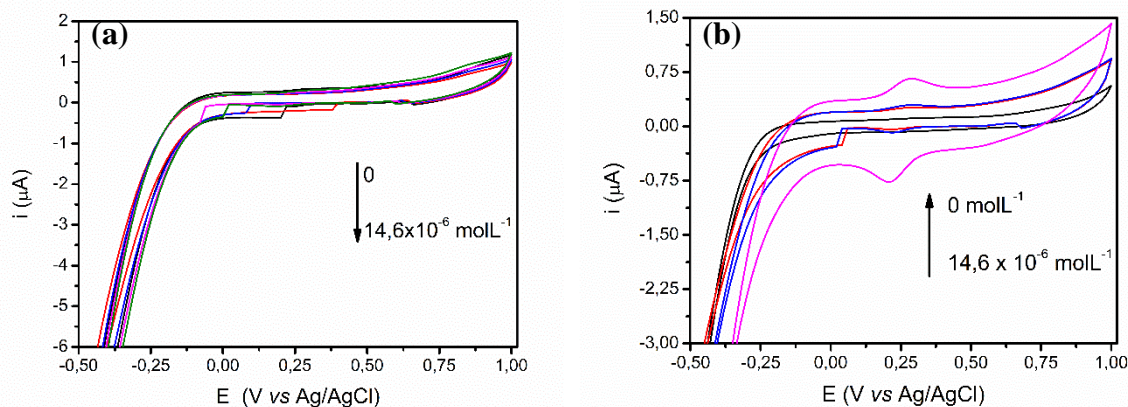


Figura 47: VC do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP com 5,4 mg mL⁻¹ de lipase imobilizada na presença diferentes concentrações de *p*NPP (0 a 14,6×10⁻⁶ mol L⁻¹) (a). VC do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP com 2,7 mg mL⁻¹ de lipase imobilizada na presença diferentes concentrações de *p*NPP (0 a 14,6×10⁻⁶ mol L⁻¹) (b).

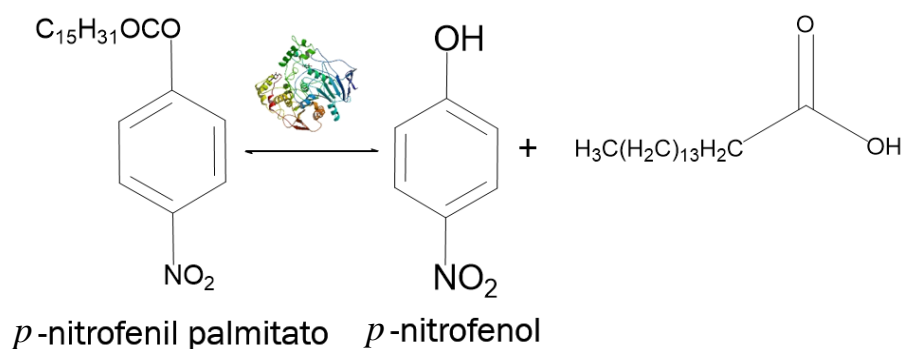


Figura 48: Reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato em *p*-nitrofenol pela enzima lipase.

Usou-se o *p*NPP apenas para determinação da quantidade de enzima a ser imobilizada no eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP. Esse resultado também indica que a metodologia desenvolvida para imobilizar a lipase foi eficiente. A lipase foi imobilizada e apresenta atividade satisfatória para confecção do biossensor de triglicerídeos.

As VC do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase na presença de *p*NPP, em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s⁻¹) são mostradas na Figura 49 (a). Essas medidas fornecem informações sobre o mecanismo na interface eletrodo/solução. É possível observar que a intensidade da corrente de ambos picos, catódico e anódico, aumentam linearmente com o aumento da velocidade de varredura indicando que a reação na superfície do eletrodo pode ser controlada pelo processo de adsorção [167].

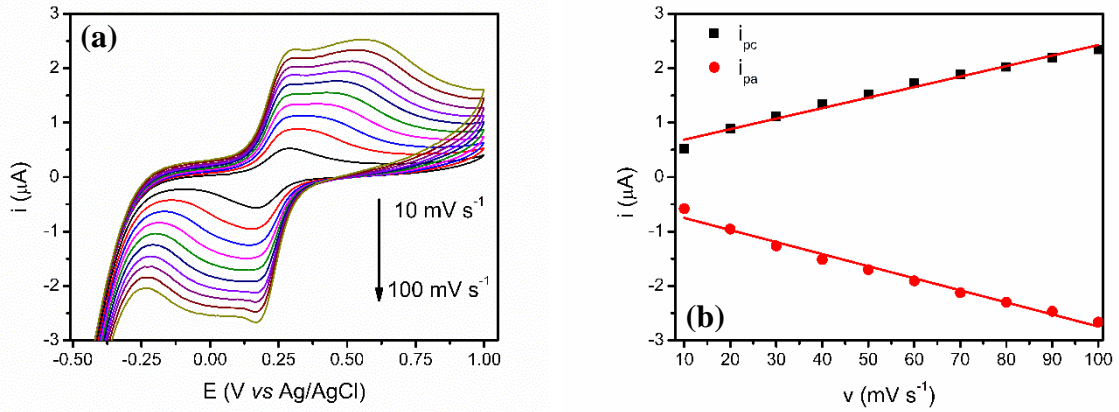


Figura 49: VC obtidos em diferentes velocidades de varredura (10 a 100 mV s^{-1}) para o eletrodo FTO/SiO₂ZrO₂/AuNP/Lipase em solução tampão PBS 0,05 mol L^{-1} pH 7 contendo $14,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de pNPP (a). Relação entre i_{pa} , i_{pc} e v (b).

Na Figura 49 (b) a relação linear entre a velocidade de varredura e as intensidades dos picos catódicos e anódicos, obtidos para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase podem ser observados e as equações são descritas pelas Equações 19 e 20:

$$i_{pa}(\mu\text{A}) = 0,49(\pm 0,05) + 0,019(\pm 9,01 \times 10^{-4})v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,981 \quad \text{Equação 19}$$

$$i_{pc}(\mu\text{A}) = -0,52(\pm 0,06) - 0,022(\pm 9,69 \times 10^{-4})v (\text{mV s}^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,983 \quad \text{Equação 20}$$

Para confirmar qual processo ocorre na superfície do eletrodo, a relação entre o $\log i_p$ e $\log v$ também foi plotada e está representada na Figura 50 e descritas pelas Equações 21 e 22.

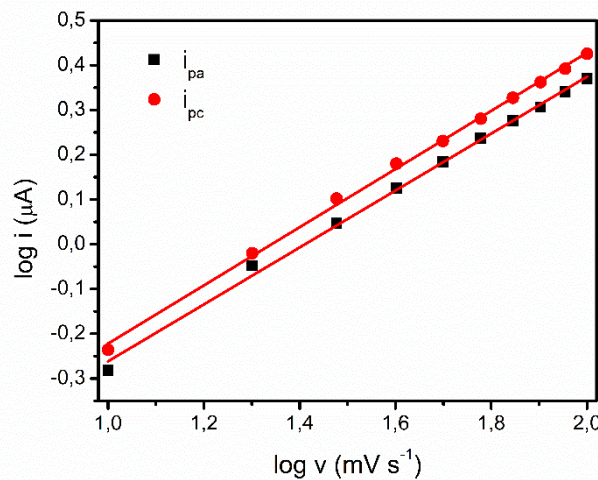


Figura 50: Relação linear entre $\log i_{pa}$, i_{pc} e $\log v$.

$$\log i_{pa}(\mu A) = -0,90(\pm 0,02) + 0,63(\pm 0,01)\log v (mVs^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,997 \text{ Equação 21}$$

$$\log i_{pc}(\mu A) = -0,87(\pm 0,01) + 0,65(\pm 0,01)\log v (mVs^{-1}) \text{ com } R^2 = 0,998 \text{ Equação 22}$$

De acordo com este modelo, quando o coeficiente angular da relação entre $\log i_p$ e $\log v$ apresenta valores entre 0,5 e 1,0 há indicação que o processo é controlado por difusão e adsorção simultaneamente. Um coeficiente angular com valor igual 0,5 indicaria um processo controlado por difusão, já com valor igual a 1,0 indica que o processo é controlado por adsorção [165,166]. Assim, como os valores obtidos foram 0,63 e 0,65, se pode afirmar que o mecanismo de oxidação e redução do *p*NPP é controlado por difusão e adsorção simultaneamente. Duas séries de experimentos foram realizados com eletrodos diferentes na presença de *p*NPP e em condições semelhantes. O coeficiente angular médio do $\log i_p$ vs $\log v$ foi de 0,62 com desvio padrão de 0,03 e o coeficiente de variação foi de 4,7%.

A EIE fornece um bom método para explorar as características eletroquímicas da superfície dos eletrodos modificados. O valor do eixo na interceptação de frequência mais baixa (diâmetro de Nyquist) oferece um valor de resistência de transferência de carga (R_{CT}) [183]. Com essas medidas pode ser determinada a impedância, que está relacionada com a resistência do material a passagem de corrente na interface eletrodo/solução. A correlação dos dados experimentais com os teóricos pode ser encontrada pelos gráficos de Nyquist que são melhor modelados usando circuitos equivalentes [184].

Para obter a melhor resposta para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase quando aplicado na detecção de tributirina (TB), foram realizados estudos utilizando a EIE em diferentes valores de pH de PBS na presença de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ contendo KCl 0,1 mol L⁻¹. Os eletrodos foram testados em pH 6,0, 7,0 e 8,0 como mostrado na Figura 51.

A redução da resistência à transferência de carga na presença de 24,9 μmol L⁻¹ de TB em relação ao branco em pH 6,0 foi de 9,2 %. Em pH 7,0 foi de 52 %. Em pH 8,0, não houve redução nos valores de R_{CT} . Dessa forma, como o tampão fosfato de sódio pH 7,0 apresentou a melhor resposta, ou seja, maior redução no valor de R_{CT} em relação ao branco e então foi escolhido para realizar a determinação de TB. Essas avaliações de pH são etapas muito importantes, que permitem determinar as condições ideais de detecção do analito.

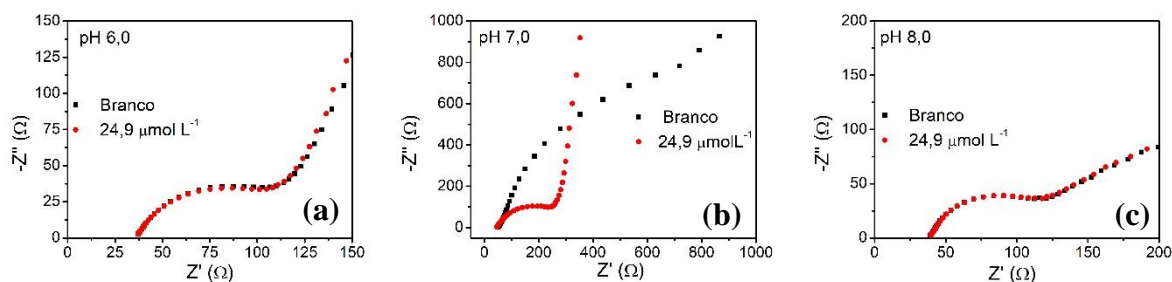


Figura 51: EIE do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase na presença de $24,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de TB em solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ com KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ preparada em solução tampão PBS $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,0 (a); 7,0 (b) e 8,0 (c).

A lipase presente no eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase hidrolisa a tributirina formando glicerol e ácido graxo, resultando em aumento da concentração de H⁺ na solução (Figura 52). Conseqüentemente ocorre um aumento na taxa de transferência de cargas levando à diminuição do valor de R_{CT} [183].

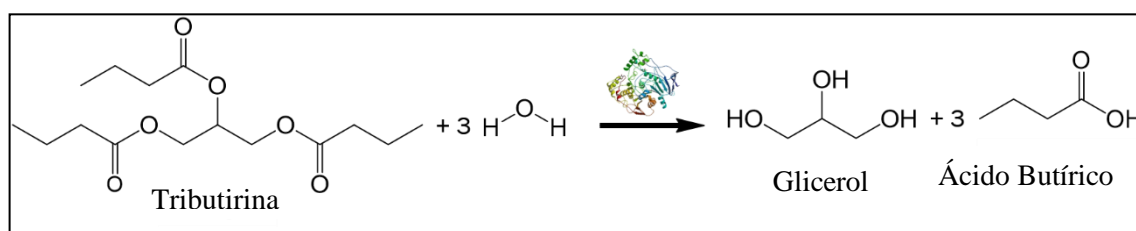


Figura 52: Hidrólise da tributirina pela lipase.

Baseando-se nessa reação, o eletrodo FTO/SiO₂ZrO₂/AuNP/Lipase foi testado quanto ao seu comportamento em relação às adições de ácido butírico (com a lipase ativa) e adições de tributirina (com a lipase inativa). Podemos observar na Figura 53 (a) que as adições de ácido butírico influenciam na resposta do eletrodo, causando redução nos valores de R_{CT}. Na Figura 53 (b) observa-se que sem atividade enzimática, as adições de TB não causam alteração nos valores de R_{CT}. Este teste teve como intuito provar que as respostas do eletrodo FTO/SiO₂ZrO₂/AuNP/Lipase estão relacionadas com a formação do ácido butírico devido a presença da lipase imobilizada.

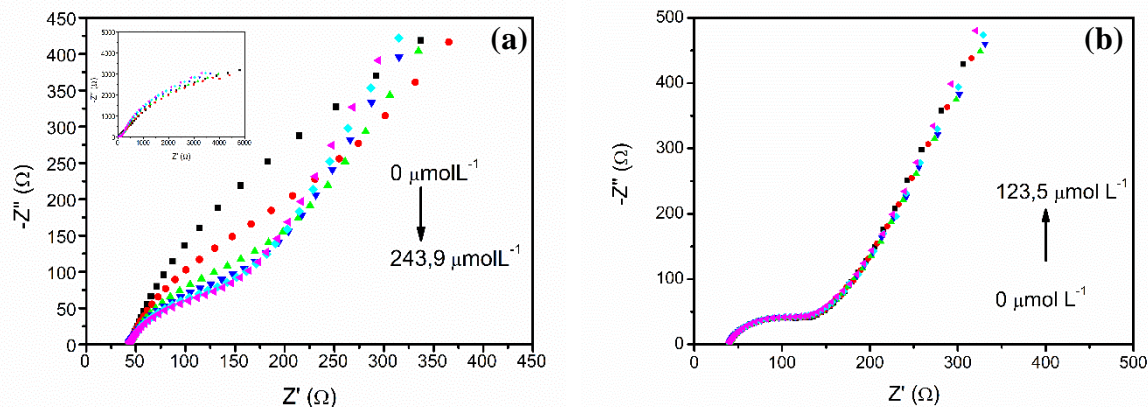


Figura 53: Comportamento do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase em solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ com KCl 0,1 mol L⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 em relação às adições de ácido butírico) 0,01 mol L⁻¹ (com a lipase ativa). Figura inserida: EIE com eixos ampliados (a). Adições de tributirina 0,01 mol L⁻¹ (com a lipase inativa) (b).

Diante do conjunto de resultados obtidos, tanto por voltametria cíclica, quanto por EIE, o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase apresentou-se adequado, uma vez que foi provado que a enzima está imobilizada e é sensível para detecção de tributirina. Portanto ele foi utilizado na detecção de triglicerídeos pela técnica de EIE. Alíquotas de 50 a 220 μL da solução estoque de tributirina 0,01 mol L⁻¹ foram adicionados na célula contendo 20 mL da solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ preparada em PBS 0,05 mol L⁻¹. A resposta do eletrodo em relação às adições está representada na Figura 54(a), onde são observados os diagramas de Nyquist obtidos. A figura inserida mostra o circuito equivalente do ajuste de curva resultante para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase sem adição de tributirina.

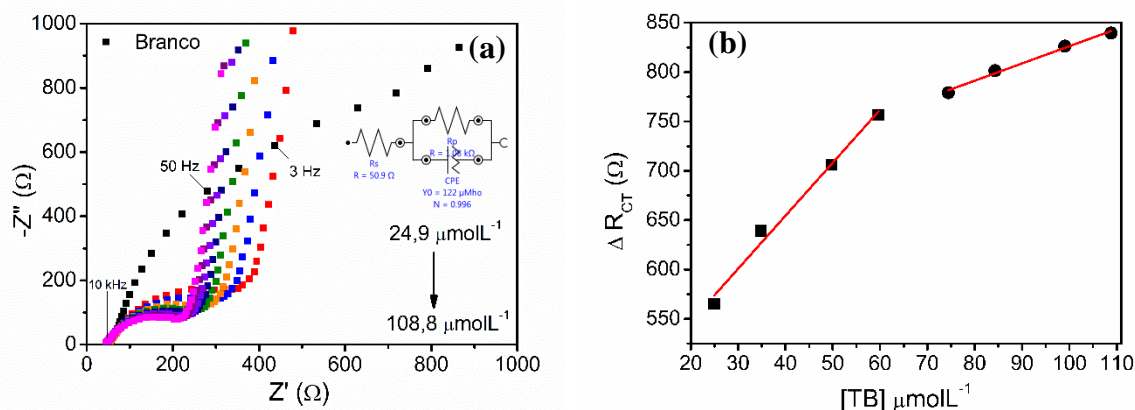


Figura 54: Medidas de EIE para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase em solução de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] 0,001 mol L⁻¹ com KCl 0,1 mol L⁻¹ preparada em solução tampão PBS 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0 na presença de 24,9 a 108,8×10⁻⁶ mol L⁻¹ de tributirina 0,01 mol L⁻¹. Figura inserida: Circuito equivalente do ajuste de curva resultante para o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase (a). Relação linear entre ΔR_{CT} e a concentração de tributirina (b).

Nota-se na Figura 54(a) que os arcos capacitivos diminuíram com o aumento da concentração de tributirina. Os valores de ΔR_{CT} foram calculados usando a relação ΔR_{CT} [$\Delta R_{CT} = R_{CT}$ branco- R_{CT} amostra]. Na Figura 54(b) observa-se que existe uma relação linear entre ΔR_{CT} e a concentração de tributirina na faixa de 24,9 a $108,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, descrita pelas Equações 23 e 24:

$$Z (\Omega) = 439,626 (\pm 17,926) + 5,372 (\pm 0,404) [TB](\mu\text{molL}^{-1}) \quad R^2 = 0,989 \quad \text{Equação 23}$$

$$Z (\Omega) = 651,530 (\pm 11,448) + 1,746 (\pm 0,124) [TB](\mu\text{molL}^{-1}) \quad R^2 = 0,990 \quad \text{Equação 24}$$

Assim, usando a relação $LD = 3 \times SDb/\text{sensibilidade}$, o limite de detecção (LD) calculado foi de $1,86 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A sensibilidade do eletrodo foi obtida pelo coeficiente angular das equações 23 e 24, que foi de $5,372 \times 10^{-6} \Omega \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ e $1,746 \times 10^{-6} \Omega \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ respectivamente, e o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela relação, $LQ = 10 \times SDb/\text{sensibilidade}$, com o resultado de $6,21 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. SDb são os desvios padrão dos valores de R_{CT} na solução branco com $n = 3$. A Tabela 7 mostra uma comparação do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase com outros eletrodos já relatados para detecção dos triglicerídeos tributirina, tripalmitina e trioleína.

Tabela 7: Comparação de diferentes eletrodos na determinação de triglicerídeos.

Eletrodo	Método	Faixa Linear (mol L⁻¹)	Analito	Limite de detecção (mol L⁻¹)	Ref.
Grafite/AC/Lip/ Chit	Amp.	1,65-11,6×10 ⁻³	TB	327×10 ⁻⁶	[45]
Lip-GDH/Chit- nano-ZrO ₂ /ITO	Amp.	0,82-13,2×10 ⁻³	TB	51,2×10 ⁻⁶	[46]
PDA/AuNP/ FTO	Amp.	1-25×10 ⁻³	TL	75×10 ⁻⁶	[44]
Multienzimas/ CGE	Amp.	0,14-1,12×10 ⁻³	TL	140×10 ⁻⁶	[49]
Lip-GLDH/CNF e Lip- GLDH/AgCNF	Volt.	3,3-13,2 e 1,65-13,2×10 ⁻³	TB	0,87 e 0,35×10 ⁻³	[132]

Eletrodo	Método	Faixa Linear (mol L⁻¹)	Analito	Limite de detecção (mol L⁻¹)	Ref.
Membrana de hidrogel de pectina	Ótico	1,24-13,2×10 ⁻³	TP	186×10 ⁻⁶	[185]
Lip-GDH/TB/ERGO/ITO	Volt.	0,5-4,51×10 ⁻³	TB	180×10 ⁻⁶	[131]
CNP-L/CuONP/MWCNT/Pe/GCE	Amp.	1,13-56,5 e 9,04-234×10 ⁻⁶	TL	3,61 e 4,07×10 ⁻⁶	[186]
Lip-(ε -PL-Hep)-GCE	Volt.	1,65-9,9×10 ⁻³	TB	154×10 ⁻⁶	[133]
Lip NPs+GKNPs+G PONPs/Au	Amp.	0,113- 1,13×10 ⁻³	TL	1,13×10 ⁻⁶	[187]
Lip/NPs/GKNPs /GPONPs/PG	Amp.	1-45×10 ⁻³	TL	0,001×10 ⁻⁶	[188]
Lip/nano-CeO ₂ /ITO	Volt.	0-1,65×10 ⁻²	TB	1,08×10 ⁻³	[189]
FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase	Imp.	24,9-59,6 e 74,4- 108,8×10⁻⁶	TB	1,86 e 5,73×10⁻⁶	Este traba-lho

AC: Carbono ativado

Chit: Quitosana

ITO: Óxido de índio dopado com estanho

LIP: Lipase

GDH: Glicerol desidrogenase

PDA: Polidopamina

AuNP: Nanopartículas de ouro

FTO: Óxido de Estanho Dopado com Flúor

TB: Azul de Toluidina

ERGO: Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

CNP-L: Nanopartículas magnéticas revestidas de quitosana

CuONP: Nanopartículas de óxido de cobre

MWCNT/Pe: Nanotubos de carbono de parede multipla/Pectina

GCE: Eletrodo de Carbono Vítreo

CNFs: Nanofibras de carbono

AgCNFs: Nanofibras de carbono impregnadas com prata

GLDH: glicerol desidrogenase

ε -PL-Hep: ε-polilisina-heparina

LipaseNPs: Nanopartículas de Lipase
GKNPs: Nanopartículas de glicerol quinase
GPONPs: Nanopartículas de glicerol-3-fosfato oxidase
PG: Lápiz grafite
nano-CeO₂: nanopartículas de óxido de cério
SiO₂: Sílica
ZrO₂: Zircônia

Amp.: Amperométrico
Volt.: Voltamétrico
Imp.: Impedimétrico

TB: Tributirina
TL: Trioleína
TP: Tripalmitina

Observando a Tabela 7, se nota que o biossensor obtido nesta tese, FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase, apresentou o menor LD para o triglicerídeo tributirina, quando comparado com os demais trabalhos que utilizaram o mesmo TG. Esse resultado indica que o biossensor é altamente sensível em baixas concentrações. É um resultado muito promissor considerando que o eletrodo foi construído a partir de uma metodologia nova, desenvolvida nesta tese, para imobilização da lipase. O filme de SiO₂/lipase foi obtido por sol-gel, que é uma técnica simples e de baixo custo.

4.2.4 Reprodutibilidade

Considerando 3 eletrodos, o desvio padrão relativo foi de 5 % para concentração de $74,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Em concentrações menores de $59,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $49,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de TB, os desvios padrão relativos foram de 4,9 % e 3,6 % respectivamente.

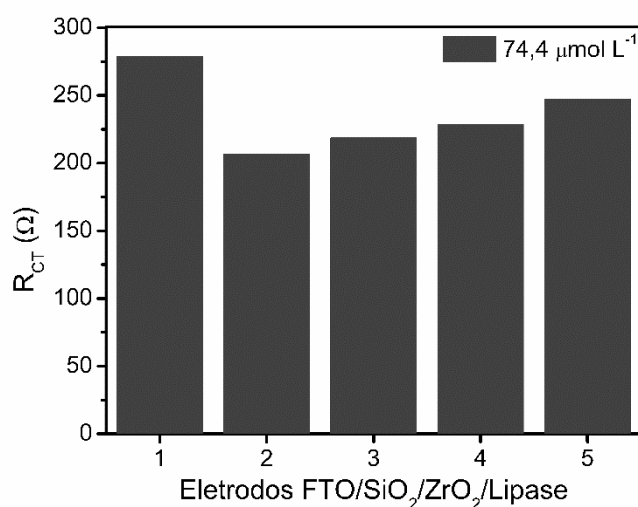


Figura 55: Reprodutibilidade do biossensor FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase na presença de $74,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de TB.

4.2.5 Michaelis–Menten

Para verificar a interação da enzima lipase (*Candida Rugosa*) pelo substrato (tributirina), foram obtidos os parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{app}) e a velocidade máxima de formação de produto aparente (V_{max}^{app}). K_M está relacionada ao valor de concentração do substrato que corresponde à metade da velocidade máxima da reação biocatalizada, quanto menor o valor de K_M , maior é a interação.

Usando a técnica de EIE, os parâmetros K_M^{app} e V_{max}^{app} foram calculados. Inicialmente, utilizou-se a equação da reta obtida a partir de uma curva padrão de ácido butírico. A curva foi resultado da relação dos valores de R_{CT} vs [ácido butírico] conforme mostrado na Figura 56 (a). Usou-se a curva para relacionar os valores de R_{CT} de cada concentração de tributirina e encontrar os valores de concentração de ácido butírico liberado equivalentes. A velocidade da reação (v) foi determinada substituindo o y da equação da curva padrão de ácido butírico pelo valor de R_{CT} encontrados na reação de cada concentração de TB. Os valores resultantes foram divididos pelo tempo da reação (2 minutos). Em seguida os parâmetros K_M^{app} e V_{max}^{app} foram calculados usando o gráfico Lineweaver-Burk. Foi utilizada a relação $1/v$ vs $1/[S]$, representada pela equação 25:

$$1/v = K_M/V_{max} \times 1/[S] + 1/V_{max} \quad \text{Equação 25}$$

Da equação reta, $y=ax+b$, temos que $a= K_M^{app}/V_{max}^{app}$ e $b= 1/V_{max}^{app}$.

A Figura 56 (a) mostra a variação nos valores de R_{CT} com o aumento da concentração de ácido butírico. A curva padrão obtida é mostrada na inserção da Figura 56 (a) e possui equação representada pela Equação 26:

$$R_{CT} (\Omega) = -5,0 \times 10^6 [\text{ácido butírico}] (mOLL^{-1}) + 953,52 (\Omega) \quad R^2 = 0,962 \quad \text{Equação 26}$$

O gráfico da relação entre $1/v$ e $1/[TB]$ visto na Figura 56 (b) revela uma linearidade representada pela Equação 27.

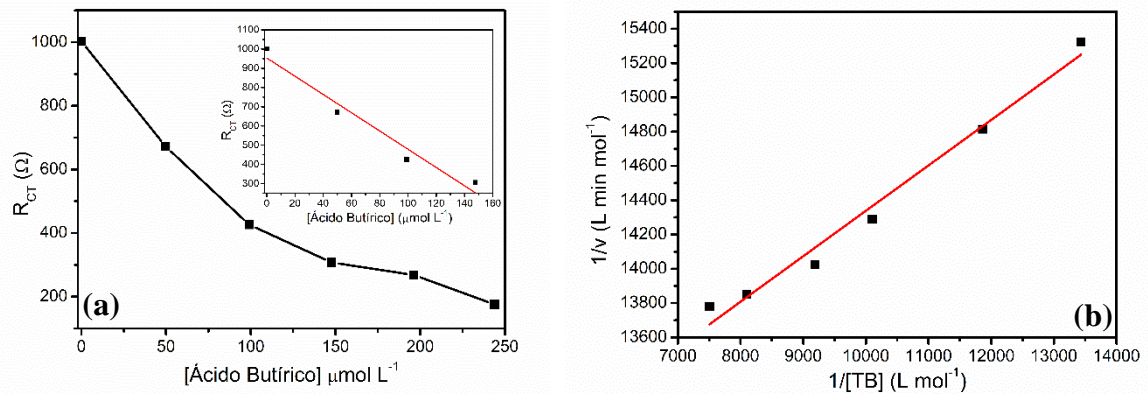


Figura 56: Resposta impedimétrica do eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/lipase em função da adição de ácido butírico. Figura inserida: Relação linear entre R_{CT} e concentração de ácido butírico (a). Gráfico Lineweaver-Burk (b).

$$1/v = 0,26522 \left(\frac{1}{[S]} \right) + 11686,2712 \left(\frac{1}{v} \right) \text{ com } R^2 = 0,978 \quad \text{Equação 27}$$

Dessa forma, foi encontrado o valor de K_M^{app} de $22,69 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e o valor de V_{max}^{app} de $85,57 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. K_M^{app} está representado em termos de [TB] e V_{max}^{app} em termos [Ac.but] t⁻¹.

O valor de K_M^{app} encontrado é menor que todos valores reportados na Tabela 8. Baixos valores de K_M^{app} sugerem que a matriz SiO₂/ZrO₂/AuNP facilita a reação da lipase com a tributirina. Isso contribui para que a enzima imobilizada alcance uma melhor conformação para uma reação enzimática mais rápida, resultando em atividade enzimática aumentada. Os experimentos foram realizados em triplicata com diferentes eletrodos na presença de TB e em condições semelhantes. Foi obtido um K_M^{app} médio de $31,88 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com desvio padrão de 9,75 e um V_{max}^{app} médio de $90,70 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ com desvio padrão de 7,79.

Tabela 8: Valores de constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{app}) para diferentes biossensores de tributirina

Eletrodo	K_M^{app} (mol L ⁻¹)	Ref.
LIP/Glu/PANI-NT/ITO	$0,62 \times 10^{-3}$	[183]
Lipase/NPG/GCE	$0,35 \times 10^{-3}$	[106]
Lip-GLDH/CNF e Lip-GLDH/AgCNF	56,1 e 109×10^{-6}	[132]
Lipase/nano-CeO ₂ /ITO	$1,08 \times 10^{-3}$	[189]
Cellulose acetate	$8,76 \times 10^{-3}$	[190]

Eletrodo	K_M^{app} (mol L⁻¹)	Ref.
FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase	22,69×10⁻⁶	Este trabalho

Lip: Lipase
 Glu: Glutaraldeído
 PANI-NT: nanopartículas de polianilina
 ITO: Óxido de índio dopado com estanho
 NPG: ouro nanoporoso
 GCE: Eletrodo de Carbono Vítreo
 GLDH: glicerol desidrogenase
 CNF: Nanofibras de carbono
 AgCNF: Nanofibras de carbono impregnadas com prata
 nano-CeO₂: nanopartículas de óxido de cério
 Cellulose acetate: Acetato de celulose
 SiO₂: Sílica
 ZrO₂: Zircônia
 AuNP: Nanopartículas de ouro
 FTO: Óxido de Estanho Dopado com Flúor

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidos materiais nanoestruturados a partir de uma matriz de zircônia: os compósitos NTCPM60%/ZrO₂ e NTCPM40%/ZrO₂. Esses compósitos foram utilizados para obtenção de eletrodos de pasta de carbono e usados como sensores de metil paration (MP). Os compósitos foram caracterizados em relação às suas propriedades estruturais, morfológicas e texturais. De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os NTCPM mantiveram suas características típicas, e que os compósitos têm um alto teor de NTCPM. Todos os compósitos apresentaram áreas superficiais maiores que 100 m² g⁻¹, sendo essa, uma boa característica para aplicação dos compósitos como eletrodos.

Em relação à caracterização eletroquímica dos eletrodos de pasta de carbono (EPC) NTCPM/ZrO₂, foi possível concluir que o EPC NTCPM60%/ZrO₂ possui características eletroquímicas desejáveis para medidas quantitativas. O sensor para MP foi então obtido com o compósito NTCPM60%/ZrO₂, apresentando baixo limite de detecção (9,0×10⁻⁹ mol L⁻¹), boa reprodutibilidade (14,2%) e também boa repetibilidade, com um desvio padrão relativo de 0,91% quando utilizamos o mesmo eletrodo para realizar 13 medições do MP. O eletrodo mostrou-se seletivo, visto que apenas os íons de Mg²⁺ e SO₂⁻⁴ diminuíram em 7,8% a intensidade do pico de redução irreversível do MP.

Em conclusão, foi desenvolvido um sensor promissor para detecção de MP em alimentos, visto que quando aplicado em extrato etanólico de soja apresentou recuperação e repetibilidade satisfatórias. O sensor também possui resposta rápida se comparado a outros apresentados na literatura.

Este desempenho foi atribuído ao compósito mesoporoso baseado em cerca de 45% em massa de NTCPM altamente disperso em uma matriz de zircônia, sintetizado pelo método sol-gel. Nesse sentido, a zircônia desempenha um papel de potencializar a resposta do eletrodo devido a sua afinidade pelo MP, além de atuar como suporte para a dispersão do NTCPM. Devido às suas importantes características físico-químicas, o compósito é promissor para aplicação na determinação de outros analitos com propriedades redox. Além disso, ao utilizar as propriedades químicas da zircônia, o compósito pode atuar como suporte para espécies eletroativas no estudo de analitos específicos.

Também utilizando o método sol-gel, foi desenvolvido um biossensor para triglicerídeos (TG). Os eletrodos foram construídos a partir da deposição de filmes sobre a superfície do vidro condutor FTO por *dip coating*. De acordo com medidas eletroquímicas por voltametria cíclica, desses eletrodos, foi possível concluir que o sol-sílica/zircônia contendo 10 % mol de sílica mostrou-se mais adequado. O eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂ com 5 mergulhos na dispersão de nanopartículas de ouro/DABCOSIL resultou em melhor desempenho. Assim, este eletrodo foi considerado ideal para imobilizar a enzima lipase, sendo que na concentração 5,4 mg mL⁻¹ de lipase o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase respondeu às adições de *p*NPP por voltametria cíclica. Concluímos dessa forma, que nesta concentração a enzima apresentou atividade e este eletrodo foi utilizado como biossensor para detecção de tributirina.

Através dos espectros de UV-Vis dos filmes de SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP, se comprovou que houve a formação de filmes de nanopartículas de ouro, sendo essa modificação importante para a imobilização das enzimas. Pelas imagens de MEV, podemos comprovar que a metodologia empregada na formação dos filmes foi satisfatória, uma vez que os filmes se apresentam homogêneos e sem defeitos. Os filmes SiO₂/ZrO₂/AuNP e SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase apresentaram-se hidrofílicos. A espessura média dos filmes de SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/ZrO₂/AuNP foi menor que 1 µm, sendo então considerados filmes finos.

O biossensor obtido com o eletrodo FTO/SiO₂/ZrO₂/AuNP/Lipase foi avaliado em relação às adições de tributirina por EIE. O mesmo apresentou duas faixas lineares, assim foi calculado dois limites de detecção: 1,86×10⁻⁶ mol L⁻¹ e 5,73×10⁻⁶ mol L⁻¹. A sensibilidade foi de 5,37×10⁻⁶ Ω mol⁻¹ L e 1,75×10⁻⁶ Ω mol⁻¹ L. Diante desses valores podemos concluir que o eletrodo é altamente sensível, sendo promissor para detecção de TG em amostras reais, tanto em alimentos como em fluidos humanos.

Dessa forma pode-se concluir que as metodologias desenvolvidas e empregadas na construção deste biossensor foram apropriadas e eficientes. Portanto, podem ser utilizadas para

futuros trabalhos na imobilização de outras enzimas em variados substratos que permitam a modificação pela tecnologia de formação de filmes.

Em conclusão geral, nota-se a versatilidade do método sol-gel no desenvolvimento de materiais para construção de sensores e biossensores. Utilizando este método foi possível também elaborar novas metodologias apropriadas na obtenção das dispersões do tipo sol para formação de filmes finos em substrato vítreo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. C.M. Ribeiro, E.M. Miguel, J.D. Silva, C.B. da Silva, M.O.F. Goulart, L.T. Kubota, F.B. Gonzaga, W.J.R. Santos, P.R. Lima, Application of a nanostructured platform and imprinted sol-gel film for determination of chlorogenic acid in food samples, *Talanta*. 156 **2016** 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.05.020>.
2. V. Suryanarayanan, C. Wu, K. Ho, Molecularly Imprinted Electrochemical Sensors, *Electroanalysis*. 22 **2010** 1795–1811. 10.1002/elan.200900616.
3. D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1, *Biosens. Bioelectron.* 16 **2001** 121–131. 10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
4. N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 **2003** 159–173. 10.1590/s0103-50532003000200003.
5. Q.G. Yang, N. Li, Q. Li, S.Q. Chen, H.L. Wang, H.P. Yang, Amperometric sarcosine biosensor based on hollow magnetic Pt-Fe₃O₄@C nanospheres, *Anal. Chim. Acta.* 1078 **2019** 161–167. 10.1016/j.aca.2019.06.031.
6. Y. Cao, L.N. Wang, C.Y. Wang, X.Y. Hu, Y.L. Liu, G.X. Wang, Sensitive detection of glyphosate based on a Cu-BTC MOF/g-C₃N₄ nanosheet photoelectrochemical sensor, *Electrochim. Acta.* 317 **2019** 341–347. 10.1016/j.electacta.2019.06.004.
7. P. Naderi Asrami, S.A. Mozaffari, M. Saber Tehrani, P. Aberoomand Azar, A novel impedimetric glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on a CuO-Chitosan nanobiocomposite modified FTO electrode, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 **2018** 649–660. 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.228.
8. Y. Zeng, D. Yu, Y. Yu, T. Zhou, G. Shi, Differential pulse voltammetric determination of methyl parathion based on multiwalled carbon nanotubes–poly(acrylamide) nanocomposite film modified electrode, *J. Hazard. Mater.* 217–218 **2012** 315–322. 10.1016/j.jhazmat.2012.03.033.
9. P. Mehrotra, Biosensors and their applications – A review, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 6 **2016** 153–159. 10.1016/j.jobcr.2015.12.002.
10. E.W. de Menezes, M.R. Nunes, L.T. Arenas, S.L.P. Dias, I.T.S. Garcia, Y. Gushikem, T.M.H. Costa, E. V Benvenuti, Gold nanoparticle/charged silsesquioxane films immobilized onto Al/SiO₂ surface applied on the electrooxidation of nitrite, *J. Solid State Electrochem.* 16 **2012** 3703–3713. 10.1007/s10008-012-1782-8.
11. B.D. Malhotra, M.A. Ali, Chapter 1 - Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications, *Nanomater. Biosens.*, William Andrew Publishing, **2018**: pp. 1–74. 10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7.
12. G.-P. Nikoleli, C.G. Siontorou, D.P. Nikolelis, S. Karapetis, S. Bratakou, Chapter 1 - Prototype Biosensing Devices: Design and Microfabrication Based on Nanotechnological Tools for the Rapid in the Field Detection of Food Toxicants and Environmental Pollutants, in: D.P. Nikolelis, G.-P. Nikoleli (Eds.), *Nanotechnol. Biosens.*, Elsevier, **2018**: pp. 1–28. 10.1016/B978-0-12-813855-7.00001-5.
13. O.S. Tkachenko, L. V Souza, M. Deon, E.M. Becker, E.W. de Menezes, L.T. Arenas, E.

- V Benvenuti, AgNP-decorated SBA-15 for MWCNT Paste Modified Electrode: A Sensor for Simultaneous Voltammetric Determination of Paracetamol and Sulfamethoxazole, *Electroanalysis*. 33 **2021** 29–37. 10.1002/elan.202060090.
14. J. Argüello, V.L. Leidens, H.A. Magosso, R.R. Ramos, Y. Gushikem, Simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid by methylene blue adsorbed on a phosphorylated zirconia–silica composite electrode, *Electrochim. Acta*. 54 **2008** 560–565. 10.1016/j.electacta.2008.07.021.
 15. G.J. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C.-M. Han, C. Mahapatra, H.-W. Kim, J.C. Knowles, Sol–gel based materials for biomedical applications, *Prog. Mater. Sci.* 77 **2016** 1–79. 10.1016/j.pmatsci.2015.12.001.
 16. U. Narang, P. Prasad, F. Bright, K. Ramanathan, Glucose biosensor based on a sol- gel-derived platform, *Anal. Chem.* 66 **1994** 3139. 10.1021/ac00091a023.
 17. N. Nuchtavorn, J. Leanpolchareanchai, L. Suntornsuk, M. Macka, Paper-based sol-gel thin films immobilized cytochrome P450 for enzyme activity measurement, *Anal. Chim. Acta*. 1098 **2020** 86–93. 10.1016/j.aca.2019.11.031.
 18. B. Yuce-Dursun, A.B. Cigil, D. Dongez, M.V. Kahraman, A. Ogan, S. Demir, Preparation and characterization of sol–gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme, *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 127 **2016** 18–25. 10.1016/j.molcatb.2016.02.007.
 19. F. Rey-García, Sol–gel coatings: An alternative route for producing planar optical waveguides, *Thin Solid Films*. 519 **2011** 7982–7987. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2011.05.054>.
 20. T. Andersen, Q.-N.T. Nguyen, R. Trones, T. Greibrokk, Mesoporous polybutadiene-modified zirconia for high-temperature packed capillary liquid chromatography: column preparation and temperature programming stability, *J. Chromatogr. A*. 1018 **2003** 7–18. 10.1016/j.chroma.2003.08.045.
 21. V. Idakiev, T. Tabakova, A. Naydenov, Z.-Y. Yuan, B.-L. Su, Gold catalysts supported on mesoporous zirconia for low-temperature water–gas shift reaction, *Appl. Catal. B Environ.* 63 (2006) 178–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2005.10.007>.
 22. B. Liu, Y. Cao, D. Chen, J. Kong, J. Deng, Amperometric biosensor based on a nanoporous ZrO₂ matrix, *Anal. Chim. Acta*. 478 **2003** 59–66. 10.1016/S0003-2670(02)01480-0.
 23. Q. Yuan, Y. Liu, L.-L. Li, Z.-X. Li, C.-J. Fang, W.-T. Duan, X.-G. Li, C.-H. Yan, Highly ordered mesoporous titania–zirconia photocatalyst for applications in degradation of rhodamine-B and hydrogen evolution, *Microporous Mesoporous Mater.* 124 **2009** 169–178. 10.1016/j.micromeso.2009.05.006.
 24. Z. Wang, J. Xia, Y. Xia, C. Lu, G. Shi, F. Zhang, F. Zhu, Y. Li, L. Xia, J. Tang, Fabrication and characterization of a zirconia/multi-walled carbon nanotube mesoporous composite, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 **2013** 3931–3934. 10.1016/j.msec.2013.05.031.
 25. M.J. Rozenberg, M.J. Sánchez, R. Weht, C. Acha, F. Gomez-Marlasca, P. Levy, Mechanism for bipolar resistive switching in transition-metal oxides, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 81 **2010**. 10.1103/PhysRevB.81.115101.

26. S. Balaji, Y. Djaoued, A.-S. Albert, R.Z. Ferguson, R. Brüning, B.-L. Su, Construction and characterization of tunable meso-/macroporous tungsten oxide-based transmissive electrochromic devices, *J. Mater. Sci.* 44 **2009** 6608–6616. 10.1007/s10853-009-3575-8.
27. P.-C. Chen, G. Shen, Y. Shi, H. Chen, C. Zhou, Preparation and Characterization of Flexible Asymmetric Supercapacitors Based on Transition-Metal-Oxide Nanowire/Single-Walled Carbon Nanotube Hybrid Thin-Film Electrodes, *ACS Nano*. 4 **2010** 4403–4411. 10.1021/nn100856y.
28. K. Byrappa, A.S. Dayananda, C.P. Sajan, B. Basavalingu, M.B. Shayan, K. Soga, M. Yoshimura, Hydrothermal preparation of ZnO:CNT and TiO₂:CNT composites and their photocatalytic applications, *J. Mater. Sci.* 43 **2008** 2348–2355. 10.1007/s10853-007-1989-8.
29. K. Pal, D.J. Kang, Z.X. Zhang, J.K. Kim, Synergistic Effects of Zirconia-Coated Carbon Nanotube on Crystalline Structure of Polyvinylidene Fluoride Nanocomposites: Electrical Properties and Flame-Retardant Behavior, *Langmuir*. 26 **2010** 3609–3614. 10.1021/la903022j.
30. E. Murugan, A.R.J. Priya, K.J. Raman, K. Kalpana, C.R. Akshata, S.S. Kumar, S. Govindaraju, Multiwalled Carbon Nanotubes/Gold Nanoparticles Hybrid Electrodes for Enzyme-Free Electrochemical Glucose Sensor, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 19 **2019** 7596–7604. 10.1166/jnn.2019.16743.
31. M. Khairy, H.A. Ayoub, C.E. Banks, Non-enzymatic electrochemical platform for parathion pesticide sensing based on nanometer-sized nickel oxide modified screen-printed electrodes, *Food Chem.* 255 **2018** 104–111. 10.1016/j.foodchem.2018.02.004.
32. G.X. Tong, Y. Li, F. Wang, Y.Z. Huang, B.Y. Fang, X.H. Wang, H.Q. Zhu, L. Li, Y.J. Shen, Q.X. Zheng, Q. Liang, M. Yan, Y. Qin, J. Ding, Thermal oxidation-grown vanadium dioxide thin films on FTO (Fluorine-doped tin oxide) substrates, *Infrared Phys. Technol.* 61 **2013** 37–41. 10.1016/j.infrared.2013.07.003.
33. S. Abdullahi, A.U. Moreh, B. Hamza, U. Sadiya, Z. Abdullahi, M.A. Wara, H. Kamaluddeen, M.A. Kebbe, U.F. Monsurat, Optical Characterization of Fluorine doped Tin Oxide (FTO) thin films deposited by spray pyrolysis technique and annealed under Nitrogen atmosphere, *Int. J. Innov. Appl. Stud.* 9 **2014** 947.
34. C.S. Pundir, J. Narang, Determination of triglycerides with special emphasis on biosensors: A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 61 **2013** 379–389. 10.1016/j.ijbiomac.2013.07.026.
35. T.H.V. Kumar, A.K. Sundramoorthy, Electrochemical biosensor for methyl parathion based on single-walled carbon nanotube/glutaraldehyde crosslinked acetylcholinesterase-wrapped bovine serum albumin nanocomposites, *Anal. Chim. Acta.* 1074 **2019** 131–141. 10.1016/j.aca.2019.05.011.
36. B. Wu, L. Hou, M. Du, T. Zhang, Z. Wang, Z. Xue, X. Lu, A molecularly imprinted electrochemical enzymeless sensor based on functionalized gold nanoparticle decorated carbon nanotubes for methyl-parathion detection, *Rsc Adv.* 4 **2014** 53701–53710. 10.1039/C4RA06210H.
37. B. Huang, W.-D. Zhang, C.-H. Chen, Y.-X. Yu, Electrochemical determination of

- methyl parathion at a Pd/MWCNTs-modified electrode, *Microchim. Acta.* 171 **2010** 57–62. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0408-z>.
38. D. Zhang, D. Yu, W. Zhao, Q. Yang, H. Kajiura, Y. Li, T. Zhou, G. Shi, A molecularly imprinted polymer based on functionalized multiwalled carbon nanotubes for the electrochemical detection of parathion-methyl, *Analyst.* 137 **2012** 2629–2636. 10.1039/C2AN35338E.
 39. X. Yue, P. Han, W. Zhu, J. Wang, L. Zhang, Facile and sensitive electrochemical detection of methyl parathion based on a sensing platform constructed by the direct growth of carbon nanotubes on carbon paper, *RSC Adv.* 6 **2016** 58771–58779. 10.1039/C6RA09335C.
 40. J. Dong, X. Wang, F. Qiao, P. Liu, S. Ai, Highly sensitive electrochemical stripping analysis of methyl parathion at MWCNTs–CeO₂–Au nanocomposite modified electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 186 **2013** 774–780. 10.1016/j.snb.2013.06.068.
 41. L.C. Clark Jr., C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 **1962** 29–45. 10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
 42. E.B. Bahadır, M.K. Sezgentürk, Biosensor technologies for analyses of food contaminants, in: A.M. Grumezescu (Ed.), *Nanobiosensors*, Academic Press, **2017**: pp. 289–337. 10.1016/B978-0-12-804301-1.00008-4.
 43. S.J. Updike, G.P. Hicks, The Enzyme Electrode, *Nature.* 214 **1967** 986–988. 10.1038/214986a0.
 44. M. Zhu, Z. Yang, Y.X. Cheng, Y.B. Sun, J. Xing, J.R. Wei, J.P. Sun, H. Liu, X.D. Song, Development of Triglyceride Biosensor Based on the Polydopamine-Gold Nanocomposite, *Int. J. Electrochem. Sci.* 12 (2017) 6863–6873. 10.20964/2017.07.67.
 45. M. Rezvani, G.D. Najafpour, M. Mohammadi, H. Zare, Amperometric biosensor for detection of triglyceride tributyrin based on zero point charge of activated carbon, *Turkish J. Biol.* 41 **2017** 268–277. 10.3906/biy-1607-24.
 46. S. Solanki, C.M. Pandey, A. Soni, G. Sumana, A.M. Biradar, An amperometric bienzymatic biosensor for the triglyceride tributyrin using an indium tin oxide electrode coated with electrophoretically deposited chitosan-wrapped nanozirconia, *Microchim. Acta.* 183 **2016** 167–176. 10.1007/s00604-015-1618-1.
 47. N.H. Rosli, Z.M. Zain, N.M. Ahmad, Lipase Based Biosensors for Triglyceride Determination, in: H.F. Abdul Amir, A.M. Korsunsky, Z. Guo (Eds.), **2016** *Int. Conf. Front. Sensors Technol.*, E D P Sciences, Cedex A, 10.1051/mateconf/20165901012.
 48. F. Kartal, A. Kilinc, S. Timur, Lipase biosensor for tributyrin and pesticide detection, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87 **2007** 715–722. 10.1080/03067310701327741.
 49. A. Yücel, H.M. Özcan, A. Sairoğlu, A new multienzyme-type biosensor for triglyceride determination, *Prep. Biochem. Biotechnol.* 46 **2016** 78–84. 10.1080/10826068.2014.985833.
 50. L.C. Klein, A review of: “ Sol- Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol- Gel Processing ” Edited by C. Jeffrey Brinker and George W. Scherer, *Mater. Manuf. Process.* 9 **1994** 1007–1008. 10.1080/10426919408934968.
 51. E. V Benvenuti, C.C. Moro, T.M.H. Costa, M.R. Gallas, Materiais híbridos à base de

- sílica obtidos pelo método sol-gel, *Química Nova*. 32 **2009** 1926–1933. 10.1590/S0100-40422009000700039
52. J.M. Nedelec, Sol- Gel Processing of Nanostructured Inorganic Scintillating Materials, *J. Nanomater.* 2007 **2007**. 10.1155/2007/36392.
 53. M. Barczak, C. McDonagh, D. Wencel, Micro- and nanostructured sol- gel- based materials for optical chemical sensing, *Microchim. Acta.* 183 **2016** 2085–2109. 10.1007/s00604-016-1863-y.
 54. J. Zha, H. Roggendorf, Sol-gel science, the physics and chemistry of sol-gel processing, Ed. by C. J. Brinker and G. W. Scherer, Academic Press, Boston 1990, xiv, 908 pp., bound—ISBN 0-12-134970-5, *Adv. Mater.* 3 **1991** 522. 10.1002/adma.19910031025.
 55. C. Petcu, V. Purcar, R. Ianchis, C.I. Spataru, M. Ghiurea, C.A. Nicolae, H. Stroescu, L.I. Atanase, A.N. Frone, B. Trica, D. Donescu, Synthesis and characterization of polymer-silica hybrid latexes and sol-gel-derived films, *Appl. Surf. Sci.* 389 **2016** 666–672. 10.1016/j.apsusc.2016.07.076.
 56. K.K.U. J. Rouquerol. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, K. K. Unger D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, Recommendation for the characterization of porous solids, *Pure & Appl. Chem.* 66 **1994** 1739-58. 10.1351/pac199466081739.
 57. R. Sinha, M. Ganesana, S. Andreescu, L. Stanciu, AChE biosensor based on zinc oxide sol-gel for the detection of pesticides, *Anal. Chim. Acta.* 661 **2010** 195–199. 10.1016/j.aca.2009.12.020.
 58. D. Du, S. Chen, J. Cai, A. Zhang, Electrochemical pesticide sensitivity test using acetylcholinesterase biosensor based on colloidal gold nanoparticle modified sol-gel interface, *Talanta.* 74 **2008** 766–772. 10.1016/j.talanta.2007.07.014.
 59. P. Raghu, B.E.K. Swamy, T.M. Reddy, B.N. Chandrashekar, K. Reddaiah, Sol-gel immobilized biosensor for the detection of organophosphorous pesticides: A voltammetric method, *Bioelectrochemistry.* 83 **2012** 19–24. 10.1016/j.bioelechem.2011.08.002.
 60. J. Lillo-Ramiro, J.M. Guerrero-Villalba, M. de L. Mota-González, F.S.A.- Tostado, G. Gutiérrez-Heredia, I. Mejía-Silva, A.C.- Castillo, Optical and microstructural characteristics of CuO thin films by sol gel process and introducing in non-enzymatic glucose biosensor applications, *Optik (Stuttg).* 229 **2021** 166238. 10.1016/j.ijleo.2020.166238.
 61. M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, A. Jorio, Unusual Properties and Structure of Carbon Nanotubes, *Annual Review of Materials Research.* 34 **2004** 247–278. 10.1146/annurev.matsci.34.040203.114607.
 62. C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton, Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules, *Anal. Chim. Acta.* 662 **2010** 105–127. 10.1016/j.aca.2010.01.009.
 63. S. Iijima, Helical microtuules of graphitic carbon, *Nature.* 354 **1991** 56–58. 10.5772/17277.

64. L.Z. Zhao, L. Zhao, Y.Q. Miao, C.X. Zhang, Gold Nanoparticle-Decorated Single-Walled Carbon Nanotubes as a Catalytic Amplification Platform for the Electrochemical Detection of Alkaline Phosphatase Activity, *Int. J. Electrochem. Sci.* 13 **2018** 1293–1307. 10.20964/2018.02.04.
65. N.Z. Prlainovic, D.I. Bezbradica, Z.D. Knezevic-Jugovic, S.I. Stevanovic, M.L.A. Ivic, P.S. Uskokovic, D.Z. Mijin, Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on multi walled carbon nanotubes, *J. Ind. Eng. Chem.* 19 **2013** 279–285. 10.1016/j.jiec.2012.08.012.
66. W. da Silva, M.E. Ghica, C.M.A. Brett, Gold nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotube modified electrodes for the electrochemical determination of theophylline, *Anal. Methods.* 10 **2018** 5634–5642. 10.1039/c8ay02150c.
67. S.S. Upadhyay, A.K. Srivastava, Hydroxypropyl beta-cyclodextrin cross-linked multiwalled carbon nanotube-based chiral nanocomposite electrochemical sensors for the discrimination of multichiral drug atorvastatin isomers, *New J. Chem.* 43 **2019** 11178–11188. 10.1039/c9nj02508a.
68. Y.-R. Wang, P. Hu, Q.-L. Liang, G.-A. Luo, Y.-M. Wang, Application of Carbon Nanotube Modified Electrode in Bioelectroanalysis, *Chinese J. Anal. Chem.* 36 **2008** 1011–1016. 10.1016/S1872-2040(08)60052-3.
69. L. Qu, S. Yang, Application of Carbon Nanotubes Modified Electrode in Pharmaceutical Analysis, in *Carbon Nanotubes – Growth and Applications: 2011*. 10.5772/17277.
70. V.O. Almeida, N.M. Balzaretto, T.M.H. Costa, G.B. Machado, M.R. Gallas, Surfactants for CNTs dispersion in zirconia-based ceramic matrix by sol-gel method, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 65 **2013** 143–149. 10.1007/s10971-012-2918-0.
71. P. A. M. dos Santos, V. O. Almeida, E.V. Benvenuti, N.M. Balzaretto, M.R. Gallas, T.M.H. Costa, High-grade MWCNT/ZrO₂ composites prepared by sol-gel method and high-pressure technique (4.0 GPa): mechanically resistant, porous, and conductive, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 90 **2019** 348–358. 10.1007/s10971-019-04945-0.
72. M.A. Rodriguez, O.A. Anunziata, A.R. Beltramone, M.L. Martínez, Multiple-wall carbon nanotubes obtained with mesoporous material decorated with ceria-zirconia, *Mater. Lett.* 283 **2021** 128900. 10.1016/j.matlet.2020.128900.
73. Q. Dong, S. Shi, Y. Xie, Y. Wang, X. Zhang, X. Wang, S. Guo, L. Zhu, G. Zhang, D. Xu, Preparation of mesoporous zirconia ceramic fibers modified by dual surfactants and their phosphate adsorption characteristics, *Ceram. Int.* 46 **2020** 14019–14029. 10.1016/j.ceramint.2020.02.201.
74. Y.-J. Chang, A.P. Periasamy, S.-M. Chen, Poly (Toluidine Blue) and Zirconia Nanoparticles Electrochemically Deposited at Gelatin-Multiwalled Carbon Nanotube Film for Amperometric H₂O₂ Sensor, *Int. J. Electrochem. Sci.* 6 **2011** 4188–4203. Corpus ID: 138946889
75. M.A.F.E. Santos, I.P. Lôbo, R.S. Da Cruz, Synthesis and characterization of novel ZrO₂-SiO₂ mixed oxides, *Mater. Res.* 17 **2014** 700–707. 10.1590/S1516-14392014005000046.
76. M. Eriksson, L.C. Klein, E. Lidén, K. Lindqvist, Preparation of nanoporous silica-zirconia layers by in situ sol-gel method, *Mater. Sci. Technol.* 22 **2006** 611–614. 10.1179/174328406X84076.

77. A. Adamczyk, The influence of ZrO₂ precursor type on the structure of ZrO₂-TiO₂-SiO₂ gels and selected thin films, *J. Mol. Struct.* 1171 **2018** 706–716. 10.1016/j.molstruc.2018.06.068.
78. M.J. Paterson, B. Ben-Nissan, Multilayer sol-gel zirconia coatings on 316 stainless steel, *Surf. Coatings Technol.* 86–87 (1996) 153–158. 10.1016/S0257-8972(96)03029-0.
79. P. Sánchez-Soto, M. Macías, M. Avilés, G. Colón, J. Navío, Kinetic study of zirconia crystallization from amorphous ZrO₂-SiO₂ composite precursors processed by sol-gel chemistry, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2 **1994** 353–357. 10.1007/BF00486269.
80. M.F. Mohd Yusoff, M.R. Abdul Kadir, N. Iqbal, M.A. Hassan, R. Hussain, Dipcoating of poly (ϵ -caprolactone)/hydroxyapatite composite coating on Ti6Al4V for enhanced corrosion protection, *Surf. Coatings Technol.* 245 **2014** 102–107. 10.1016/j.surfcoat.2014.02.048.
81. D. Grosso, How to exploit the full potential of the dip-coating process to better control film formation, *J. Mater. Chem.* 21 **2011** 17033–17038. 10.1039/c1jm12837j.
82. G.J.A.A. Soler-Illia, E.L. Crepaldi, D. Grosso, C. Sanchez, Designed synthesis of large-pore mesoporous silica–zirconia thin films with high mixing degree and tunable cubic or 2D-hexagonal mesostructure, *J. Mater. Chem.* 14 **2004** 1879–1886. 10.1039/B316033E.
83. Y.-S. Ko, Y.-U. Kwon, Mesoporous Zirconia Thin Films with Three-Dimensional Pore Structures and Their Application to Electrochemical Glucose Detection, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 5 **2013** 3599–3606. 10.1021/am303248p.
84. M. Kumar, G.B. Reddy, Effect of sol-age on the surface and optical properties of sol-gel derived mesoporous zirconia thin films, *AIP Adv.* 1 **2011** 22111. 10.1063/1.3590744.
85. J.C.-S. Wu, L.-C. Cheng, An improved synthesis of ultrafiltration zirconia membranes via the sol-gel route using alkoxide precursor, *J. Memb. Sci.* 167 **2000** 253–261. 10.1016/S0376-7388(99)00294-X.
86. B. Batra, S. Lata, Sunny, J.S. Rana, C.S. Pundir, Construction of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles/chitosan hybrid film, *Biosens. Bioelectron.* 44 **2013** 64–69. 10.1016/j.bios.2012.12.034.
87. I. Uhlmann, D. Hawelka, E. Hildebrandt, J. Pradella, J. Rödel, Structure and mechanical properties of silica doped zirconia thin films, *Thin Solid Films.* 527 **2013** 200–204. 10.1016/j.tsf.2012.08.007.
88. A. Adamczyk, The influence of ZrO₂ precursor type on the structure of ZrO₂-TiO₂-SiO₂ gels and selected thin films, *J. Mol. Struct.* 1171 **2018** 706–716. 10.1016/j.molstruc.2018.06.068.
89. M. He, J. Bu, X. Yuan, Thick hybrid silica-zirconia sol-gel film for single-step fabrication of channel waveguide, *Integr. Opt. Devices, Mater. Technol.* X. 6123 **2006**. 61230H10.1117/12.643640.
90. H. Hosseini, M. Behbahani, M. Mahyari, H. Kazerooni, A. Bagheri, A. Shaabani, Ordered carbohydrate-derived porous carbons immobilized gold nanoparticles as a new electrode material for electrocatalytical oxidation and determination of nicotinamide adenine dinucleotide, *Biosens. Bioelectron.* 59 **2014** 412–417.

- 10.1016/j.bios.2014.02.046.
91. Y. Zhang, Q. Wei, The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review, *J. Electroanal. Chem.* 781 **2016** 401–409. 10.1016/j.jelechem.2016.09.011.
 92. S. Najari, H. Bagheri, Z. Monsef-Khoshhesab, A. Hajian, A. Afkhami, Electrochemical sensor based on gold nanoparticle-multiwall carbon nanotube nanocomposite for the sensitive determination of docetaxel as an anticancer drug, *Ionics (Kiel)*. 24 **2018** 3209–3219. 10.1007/s11581-018-2517-3.
 93. W. Zhang, Y. Tang, J. Liu, Y. Ma, L. Jiang, W. Huang, F. Huo, D. Tian, An electrochemical sensor for detecting triglyceride based on biomimetic polydopamine and gold nanocomposite, *J. Mater. Chem. B*. 2 **2014** 8490–8495. 10.1039/C4TB01439A.
 94. M. Masikini, M.E. Ghica, P.G.L. Baker, E.I. Iwuoha, C.M.A. Brett, Electrochemical Sensor Based on Multi-walled Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode for Detection of Estradiol in Environmental Samples, *Electroanalysis*. 31 **2019** 1925–1933. 10.1002/elan.201900190.
 95. M.R. Nunes, Y. Gushikem, R. Landers, J. Dupont, T.M.H. Costa, E. V. Benvenutti, Charged silsesquioxane used as a vehicle for gold nanoparticles to perform the synthesis of catalyst xerogels, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, Springer, **2012** 258–265. 10.1007/s10971-012-2696-8.
 96. Y. Gushikem, E. V Benvenutti, Y. V Kholin, Synthesis and applications of functionalized silsesquioxane polymers attached to organic and inorganic matrices, *Pure Appl. Chem.* 80 **2008** 1593–1611. 10.1351/pac200880071593.
 97. L.T. Arenas, A. Langaro, Y. Gushikem, C.C. Moro, E. V Benvenutti, T.M.H. Costa, 3-n-Propyl-1-azonia-4-azabicyclo[2.2.2]octanechloride Silsesquioxane: A New Water Soluble Polymer, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 28 **2003** 51–56. <https://doi.org/10.1023/A:1025633002831>.
 98. L.T. Arenas, S.L.P. Dias, C.C. Moro, T.M.H. Costa, E. V Benvenutti, A.M.S. Lucho, Y. Gushikem, Structure and property studies of hybrid xerogels containing bridged positively charged 1,4-diazoniabi cycle 2.2.2 octane dichloride, *J. Colloid Interface Sci.* 297 **2006** 244–250. 10.1016/j.jcis.2005.10.007.
 99. K. Pielichowski, J. Njuguna, B. Janowski, J. Pielichowski, Supramolecular Polymers Polymeric Betains Oligomers, *Adv. Polym. Sci.* , 201 **2006** 225-296. 10.1007/12_077
 100. S.T. Fujiwara, Y. Gushikem, R.V.S. Alfaya, Adsorption of FeCl₃, CuCl₂ and ZnCl₂ on silsesquioxane 3-n-propylpyridiniumchloride polymer film adsorbed on Al₂O₃ coated silica gel, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 178 **2001** 135–141. 10.1016/S0927-7757(00)00685-3.
 101. D.S.F. Gay, T.H.M. Fernandes, C. V Amavisca, N.F. Cardoso, E. V Benvenutti, T.M.H. Costa, E.C. Lima, Silica grafted with a silsesquioxane containing the positively charged 1,4-diazoniabicyclo[2.2.2]octane group used as adsorbent for anionic dye removal, *Desalination*. 258 **2010** 128–135. 10.1016/j.desal.2010.03.026.
 102. S. Yuasa, Y. Sato, H. Imoto, K. Naka, Fabrication of composite films with poly(methyl methacrylate) and incompletely condensed cage-silsesquioxane fillers, *J. Appl. Polym. Sci.* 135 **2018** 46033. 10.1002/app.46033.

103. F. Lampert, A.B. Christiansen, R.U. Din, Y. Gonzalez-Garcia, P. Møller, Corrosion resistance of AISI 316L coated with an air-cured hydrogen silsesquioxane based spin-on-glass enamel in chloride environment, *Corros. Sci.* 127 **2017** 110–119. 10.1016/j.corsci.2017.08.024.
104. E.M. Caldas, E.W. de Menezes, T.M. Pizzolato, S.L.P. Dias, T.M.H. Costa, L.T. Arenas, E. V Benvenuti, Ionic silsesquioxane film immobilized on silica applied in the development of carbon paste electrode for determination of methyl parathion, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 72 **2014** 282–289. 10.1007/s10971-014-3367-8.
105. A. Phongphut, C. Sriprachuabwong, A. Wisitsoraat, A. Tuantranont, S. Prichanont, P. Sritongkham, A disposable amperometric biosensor based on inkjet-printed Au/PEDOT-PSS nanocomposite for triglyceride determination, *Sensors Actuators B Chem.* 178 **2013** 501–507. 10.1016/j.snb.2013.01.012.
106. C. Wu, X. Liu, Y. Li, X. Du, X. Wang, P. Xu, Lipase-nanoporous gold biocomposite modified electrode for reliable detection of triglycerides, *Biosens. Bioelectron.* 53 **2014** 26–30. 10.1016/j.bios.2013.09.040.
107. V.L. Sirisha, A. Jain, A. Jain, Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes, in: S.-K. Kim, F. Toldrá (Eds.), *Adv. Food Nutr. Res.*, Academic Press, **2016** 179–211. 10.1016/bs.afnr.2016.07.004.
108. S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi, Biochemically active sol-gel glasses: the trapping of enzymes, *Mater. Lett.* 10 **1990** 1–5. 10.1016/0167-577X(90)90002-4.
109. C. Altinkaynak, S. Tavlasoglu, N. Yzdemir, I. Ocsoy, A new generation approach in enzyme immobilization: Organic- inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability, *Enzyme Microb. Technol.* 93–94 **2016** 105–112. 10.1016/j.enzmictec.2016.06.011.
110. J.J.-R. Nicole, E. Nadjla, V.D. Sergei, E. Rochdi, Sensitive impedimetric biosensor for direct detection of diazinon based on lipases, *Front. Chem.* 2 **2014**. 10.3389/fchem.2014.00044.
111. K. Gangadhara Reddy, G. Madhavi, B.E. Kumara Swamy, Mobilized lipase enzymatic biosensor for the determination of Chlorfenvinphos and Malathion in contaminated water samples: A voltammetric study, *J. Mol. Liq.* 198 **2014** 181–186. 10.1016/j.molliq.2014.06.019.
112. V. Califano, F. Bloisi, A. Aronne, S. Federici, L. Nasti, L. Depero, L. Vicari, Biosensor Applications of MAPLE Deposited Lipase, *Biosensors.* 4 **2014** 329–339. 10.3390/bios4040329.
113. B. Yuce-Dursun, A.B. Cigil, D. Dongez, M.V. Kahraman, A. Ogan, S. Demir, Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 127 **2016** 18–25. 10.1016/j.molcatb.2016.02.007.
114. K.G. Reddy, G. Madhavi, B.E.K. Swamy, S. Reddy, A.V.B. Reddy, V. Madhavi, Electrochemical investigations of lipase enzyme activity inhibition by methyl parathion pesticide: Voltammetric studies, *J. Mol. Liq.* 180 **2013** 26–30.

- 10.1016/j.molliq.2012.12.032.
115. J.C. Escamilla-Mejía, J.A. Rodríguez, G.A. Álvarez-Romero, C.A. Galán-Vidal, Monoenzymatic Lipase Potentiometric Biosensor for the Food Analysis Based on a pH Sensitive Graphite-epoxy Composite as Transducer, *J. Mex. Chem. Soc.* 59 **2015** 19–23. 10.29356/jmcs.v59i1.9.
 116. N. Zehani, R. Kherrat, S. V Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault, A microconductometric biosensor based on lipase extracted from *Candida rugosa* for direct and rapid detection of organophosphate pesticides, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 95 **2015** 466–479. 10.1080/03067319.2015.1036864.
 117. B. Russo, G.Z. Cao, Fabrication and characterization of fluorine-doped thin oxide thin films and nanorod arrays via spray pyrolysis, *Appl. Phys. a-Materials Sci. Process.* 90 **2008** 311–315. 10.1007/s00339-007-4274-4.
 118. S. Mahari, A. Roberts, D. Shahdeo, S. Gandhi, eCovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2, *BioRxiv.* **2020**. 10.1101/2020.04.24.059204.
 119. F. Sadat Vajedi, H. Dehghani, A high-sensitive electrochemical DNA biosensor based on a novel ZnAl/layered double hydroxide modified cobalt ferrite-graphene oxide nanocomposite electrophoretically deposited onto FTO substrate for electroanalytical studies of etoposide, *Talanta.* 208 **2020** 120444. 10.1016/j.talanta.2019.120444.
 120. A. Esmaeeli, A. Ghaffarinejad, A. Zahedi, O. Vahidi, Copper oxide-polyaniline nanofiber modified fluorine doped tin oxide (FTO) electrode as non-enzymatic glucose sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 266 **2018** 294–301. 10.1016/j.snb.2018.03.132.
 121. R. Khan, U. Periyayya, G.C. Kim, I.-H. Lee, Fabrication of ultra-sensitive piperidine chemical sensor with a direct grown well-aligned ZnO nanorods on FTO substrate as a working electrode, *Solid State Sci.* 97 **2019** 105986. 10.1016/j.solidstatesciences.2019.105986.
 122. N.S. Dumore, M. Mukhopadhyay, Sensitivity enhanced SeNPs-FTO electrochemical sensor for hydrogen peroxide detection, *J. Electroanal. Chem.* 878 **2020** 114544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114544>.
 123. C.S. Pundir, A. Malik, Preety, Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review, *Biosens. Bioelectron.* 140 **2019** 111348. 10.1016/j.bios.2019.111348.
 124. H.H. Zhou, C.H.N. Wei, J. Fang, L.K. Fu, G. Liu, Q.M. Liu, Poly 3,4-ethylenedioxythiophene and zirconia nanoparticles composite modified sensor for methyl parathion determination, *J. Electroanal. Chem.* 848 **2019** 10. 10.1016/j.jelechem.2019.113282.
 125. H.K. Zhou, N. Gan, J.G. Hou, T.H. Li, Y.T. Cao, Enhanced Electrochemiluminescence Employed for the Selective Detection of Methyl Parathion Based on a Zirconia Nanoparticle Film Modified Electrode, *Anal. Sci.* 28 **2012** 267–273. 10.2116/analsci.28.267.
 126. T.J. Meng, L. Wang, H.X. Jia, T. Gong, Y. Feng, R.X. Li, H. Wang, Y.F. Zhang, Facile synthesis of platinum-embedded zirconia/porous carbons tri-component nanohybrids from metal-organic framework and their application for ultra-sensitively detection of

- methyl parathion, *J. Colloid Interface Sci.* 536 **2019** 424–430. 10.1016/j.jcis.2018.10.076.
127. M.D.L. Higuchi, Diagnosis, Prevention and Treatment of Disorders Characterized by Undesirable Cell Proliferation, **2013**. <https://patents.google.com/patent/US8551940B2>.
128. R. Chauhan, B. Nagar, P.R. Solanki, T. Basu, Development of Triglyceride Biosensor Based on a Platinum Nano Particle and Polypyrrole Nano Composite Electrode, *Mater. Focus.* 2 **2013** 316–323. 10.1166/mat.2013.1096.
129. T. Gaschott, D. Steinhilber, V. Milovic, J. Stein, Tributyrin, a Stable and Rapidly Absorbed Prodrug of Butyric Acid, Enhances Antiproliferative Effects of Dihydroxycholecalciferol in Human Colon Cancer Cells, *J. Nutr.* 131 **2001** 1839–1843. 10.1093/jn/131.6.1839.
130. M. Pohanka, Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review, *Molecules* 24 **2019** 616. 10.3390/molecules24030616.
131. S.K. Bhardwaj, R. Chauhan, P. Yadav, S. Ghosh, A.K. Mahapatro, J. Singh, T. Basu, Bi-enzyme functionalized electro-chemically reduced transparent graphene oxide platform for triglyceride detection, *Biomater. Sci.* 7 **2019** 1598–1606. 10.1039/c8bm01406j.
132. K. Mondal, M.A. Ali, C. Singh, G. Sumana, B.D. Malhotra, A. Sharma, Highly sensitive porous carbon and metal/carbon conducting nanofiber based enzymatic biosensors for triglyceride detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 246 **2017** 202–214. 10.1016/j.snb.2017.02.050.
133. T. Xu, B. Chi, M. Chu, Q. Zhang, S. Zhan, R. Shi, H. Xu, C. Mao, Hemocompatible ϵ -polylysine-heparin microparticles: A platform for detecting triglycerides in whole blood, *Biosens. Bioelectron.* 99 **2018** 571–577. 10.1016/j.bios.2017.08.030.
134. Y. Niu, F. Sun, Y. Xu, Z. Cong, E. Wang, Applications of electrochemical techniques in mineral analysis, *Talanta.* 127 **2014** 211–218. 10.1016/j.talanta.2014.03.072.
135. N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry, *J. Chem. Educ.* 95 **2018** 197–206. 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
136. D. Harvey, Detection Limits, **2021**. <https://chem.libretexts.org/@go/page/127562>.
137. D.A. Armbruster, T. Pry, Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation, *Clin. Biochem. Rev.* 29 Suppl 1 **2008** S49–S52. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18852857>.
138. C.B. Ana Maria Brett, E. Almedina, *Electroquímica Princípios, Métodos e Aplicações, Coimbra*, 1996.
139. D.W. Kimmel, G. LeBlanc, M.E. Meschievitz, D.E. Cliffel, Electrochemical sensors and biosensors, *Anal. Chem.* 84 **2012** 685. 10.1021/ac202878q.
140. A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*, 2001.
141. S.R. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, *Fundamentos da Química Analítica*, 8^o, Cengage Learning, São Paulo, 2010. Disponível em: <https://www.cengage.com.br/lis/fundamentos-da-quimica-analitica-traducao-da-8a-edicao-norte-americana/> (acesso em 12/04/2021).

142. K.F. Drake, R.P. Van Duyne, A.M. Bond, Cyclic differential pulse voltammetry: A versatile instrumental approach using a computerized system, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* 89 **1978** 231–246. 10.1016/S0022-0728(78)80187-9.
143. L. Manoel Aleixo, Voltametria: Conceitos e Técnicas, *ChemKey* 3 **2018** 1-21. 10.20396/chemkeys.v0i3.9609.
144. E. Randviir, C.E. Banks, Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications, *Anal. Methods.* 5 (**013** 1098–1115. 10.1039/c3ay26476a.
145. R. Petrone, Z. Zheng, D. Hissel, M.C. Pera, C. Pianese, M. Sorrentino, M. Becherif, N. Yousfi-Steiner, A review on model-based diagnosis methodologies for PEMFCs, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 **2013** 7077–7091. 10.1016/j.ijhydene.2013.03.106.
146. B. Lindholm-Setthson, J. Nyström, M. Malmsten, L. Ringstad, A. Nelson, Electrochemical impedance spectroscopy in label-free biosensor applications: multivariate data analysis for an objective interpretation, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 **2010** 2341–2349. 10.1007/s00216-010-4027-7.
147. I.O. K’Owino, O.A. Sadik, Impedance Spectroscopy: A Powerful Tool for Rapid Biomolecular Screening and Cell Culture Monitoring, *Electroanalysis.* 17 **2005** 2101–2113. 10.1002/elan.200503371.
148. R. Rahmanian, S.A. Mozaffari, H. Amoli, M. Abedi, Development of sensitive impedimetric urea biosensor using DC sputtered Nano-ZnO on TiO₂ thin film as a novel hierarchical nanostructure transducer, *Sensors Actuators B Chem.* 256 **2017**. 10.1016/j.snb.2017.10.009.
149. S.A. Mozaffari, T. Chang, S.-M. Park, Self-assembled monolayer as a pre-concentrating receptor for selective serotonin sensing, *Biosens. & Bioelectron.* 26 (**010** 74–79. 10.1016/j.bios.2010.05.015.
150. V. More, V. Shivade, P. Bhargava, Effect of Cleaning Process of Substrate on the Efficiency of the DSSC, *Trans. Indian Ceram. Soc.* 75 **2016** 59–62. 10.1080/0371750X.2016.1149100.
151. A.C. Schneid, M.B. Pereira, F. Horowitz, R.S. Mauler, C.R. Matte, M.P. Klein, F.H. Plinho, T.M.H. Costa, E.W.D. De Menezes, E. V. Benvenutti, Silver nanoparticle thin films deposited on glass surface using an ionic silsesquioxane as stabilizer and as crosslinking agent, *J. Braz. Chem. Soc.* 26 **2015** 1004–1012. 10.5935/0103-5053.20150066.
152. U.K. Winkler, M. Stuckmann, Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, *J. Bacteriol.* 138 **1979** 663–670. 10.1128/JB.138.3.663-670.1979.
153. A. Peigney, C. Laurent, E. Flahaut, R.R. Bacsa, A. Rousset, Specific surface area of carbon nanotubes and bundles of carbon nanotubes, *Carbon N. Y.* 39 **2001** 507–514. 10.1016/S0008-6223(00)00155-X.
154. P.A.M. dos Santos, M.R. Gallas, C. Radtke, E. V Benvenutti, A.L. Elias, L.P. Rajukumar, H. Terrones, M. Endo, M. Terrones, T.M.H. Costa, Stable and solid pellets of functionalized multi-walled carbon nanotubes produced under high pressure and temperature, *J. Nanoparticle Res.* 17 (2015) 12. 10.1007/s11051-015-3045-y.

155. J.P. Tessonier, D. Rosenthal, T.W. Hansen, C. Hess, M.E. Schuster, R. Blume, F. Girgsdies, N. Pfander, O. Timpe, D.S. Su, R. Schlogl, Analysis of the structure and chemical properties of some commercial carbon nanostructures, *Carbon N. Y.* 47 **2009** 1779–1798. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.02.032>.
156. L. Bokobza, J. Zhang, Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites, *EXPRESS Polym. Lett.* 6 **2012** 601–608. 10.3144/expresspolymlett.2012.63.
157. Z.Y. Yang, G.Y. Shen, Y.P. He, X.X. Liu, S.J. Yang, Preparation of TiO₂/SiO₂ composite oxide and its photocatalytic degradation of rhodamine B, *J. Porous Mater.* 23 **2016** 589–599. 10.1007/s10934-015-0114-7.
158. S. Hu, Y.H. Wang, X.Z. Wang, L. Xu, J. Xiang, W. Sun, Electrochemical detection of hydroquinone with a gold nanoparticle and graphene modified carbon ionic liquid electrode, *Sensors and Actuators B-Chemical.* 168 **2012** 27–33. 10.1016/j.snb.2011.12.108.
159. Z.H. Wang, J. Liu, Q.L. Liang, Y.M. Wang, G. Luo, Carbon nanotube-modified electrodes for the simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid, *Analyst.* 127 **2002**. 653–658. 10.1039/b201060g.
160. M.T. Laranjo, F.M. Morawski, S.L.P. Dias, E. V Benvenutti, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, Silica/Titania Graphite Composite Modified with Chitosan and Tyrosinase Employed as a Sensitive Biosensor for Phenolic Compounds, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 **2019** 2660–2671. 10.21577/0103-5053.20190190.
161. R. Greef, R. Peat, L.M. Peter, D. Pletcher, J. Robinson, J.W. & Sons, *Instrumental Methods in Electrochemistry*, 1985.
162. A.A. Zainuddin, A.N. Nordin, R. Ab Rahim, W.C. Mak, Modeling of a Novel Biosensor with Integrated Mass and Electrochemical Sensing Capabilities, in: IEEE EMBS Conf. Biomed. Eng. Sci., Ieee, Kuala Lumpur, MALAYSIA, **201** 420–425.
163. Z. Liu, M. Jin, J. Cao, J. Wang, X. Wang, G. Zhou, A. van den Berg, L. Shui, High-sensitive electrochemical sensor for determination of Norfloxacin and its metabolism using MWCNT-CPE/pRGO-ANSA/Au, *Sensors Actuators, B Chem.* 257 **2018** 1065–1075. 10.1016/j.snb.2017.11.052.
164. A. Wong, M. Scontri, E.M. Materon, M.R.V. Lanza, M.D.P.T. Sotomayor, Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline, **J. Electroanal. Chem.** 757 **2015** 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2015.10.001>.
165. C.F. Liu, H.Y. Fu, Y.Y. Pei, J.D. Wu, V. Pisharodi, Y. Hu, G.H. Gao, R.J. Yang, J.H. Yang, G.Z. Cao, Understanding the electrochemical potential and diffusivity of MnO/C nanocomposites at various charge/discharge states, *J. Mater. Chem. A.* 7 **2019** 7831–7842. 10.1039/c9ta00056a.
166. J.J. Wu, W.T. Wang, M. Wang, H. Liu, H.C. Pan, Electrochemical Behavior and Direct Quantitative Determination of Tanshinone IIA in Micro-emulsion, *Int. J. Electrochem. Sci.* 11 **2016** 5165–5179. 10.20964/2016.06.55.
167. L.T. Arenas, P.C.M. Villis, J. Arguello, R. Landers, E. V Benvenutti, Y. Gushikem,

- Niobium oxide dispersed on a carbon-ceramic matrix, SiO₂/C/Nb₂O₅, used as an electrochemical ascorbic acid sensor, *Talanta*. 83 **2010** 241–248. 10.1016/j.talanta.2010.09.014.
168. S.J. Huo, H.B. Zhao, J.P. Dong, J.Q. Xu, Facile Synthesis of Ordered Mesoporous Zirconia for Electrochemical Enrichment and Detection of Organophosphorus Pesticides, *Electroanalysis*. 30 **2018** 2121–2130. 10.1002/elan.201800284.
 169. A.H.A. Hassan, S.L. Moura, F.H.M. Ali, W.A. Moselhy, M.D.P. Taboada Sotomayor, M.I. Pividori, Electrochemical sensing of methyl parathion on magnetic molecularly imprinted polymer, *Biosens. Bioelectron.* 118 **2018** 181–187. 10.1016/j.bios.2018.06.052.
 170. B. Song, W. Cao, Y. Wang, A methyl parathion electrochemical sensor based on Nano-TiO₂, graphene composite film modified electrode, *Fullerenes, Nanotub. Carbon Nanostructures*. 24 **2016** 435–440. 10.1080/1536383X.2016.1174696.
 171. X. Tan, Y. Liu, T. Zhang, S. Luo, X. Liu, H. Tian, Y. Yang, C. Chen, Ultrasensitive electrochemical detection of methyl parathion pesticide based on cationic water-soluble pillar[5]arene and reduced graphene nanocomposite, *Rsc Adv.* 9 **2019** 345–353. 10.1039/C8RA08555B.
 172. M. Govindasamy, V. Mani, S.-M. Chen, T.-W. Chen, A.K. Sundramoorthy, Methyl parathion detection in vegetables and fruits using silver@graphene nanoribbons nanocomposite modified screen printed electrode, *Sci. Rep.* 7 **2017** 46471. 10.1038/srep46471.
 173. W. Yazhen, Q. Hongxin, H. Siqian, X. Junhui, A novel methyl parathion electrochemical sensor based on acetylene black–chitosan composite film modified electrode, *Sensors Actuators B Chem.* 147 **2010** 587–592. 10.1016/j.snb.2010.03.034.
 174. F.R. Wang, G.J. Lee, N. Haridharan, J.J. Wu, Electrochemical Sensor Using Molecular Imprinting Polymerization Modified Electrodes to Detect Methyl Parathion in Environmental Media, *Electrocatalysis*. 9 **2018** 1–9. 10.1007/s12678-017-0411-9.
 175. X. Gao, Y. Gao, C. Bian, H. Ma, H. Liu, Electroactive nanoporous gold driven electrochemical sensor for the simultaneous detection of carbendazim and methyl parathion, *Electrochim. Acta.* 310 **2019** 78–85. 10.1016/j.electacta.2019.04.120.
 176. K. S. Caetano, D.S. da Rosa, T.M. Pizzolato, P.A.M. dos Santos, R. Hinrichs, E.V. Benvenuti, S.L.P. Dias, L.T. Arenas, T.M.H. Costa, MWCNT/zirconia porous composite applied as electrochemical sensor for determination of methyl parathion, *Microporous Mesoporous Mater.* 309 **2020**. 10.1016/j.micromeso.2020.110583.
 177. D.A. Monteiro, Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Günther 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta, Universidade Federal de São Carlos, 2006.
 178. M.R. Machado, E. Fanta, Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*, *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46 **2003** 361–372. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132003000300008>.
 179. C.S. Wu, C.T. Wu, Y.S. Yang, F.H. Ko, An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles, *Chem. Commun.*

- 2008 5327–5329. 10.1039/b810889g.
180. L. de Abreu, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, G. Volpato, M.A.Z. Ayub, Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 99 **2014** 51–55. 10.1016/j.molcatb.2013.10.018.
 181. R.C. Rodrigues, J.J. Virgen-Ortíz, J.C.S. dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A.R. Alcántara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions, *Biotechnol. Adv.* 37 **2019** 746–770. 10.1016/j.biotechadv.2019.04.003.
 182. P.C.A. Jerónimo, A.N. Araújo, M. Conceição, Optical sensors and biosensors based on sol-gel films, *Talanta.* 72 **2007** 13–27. 10.1016/j.talanta.2006.09.029.
 183. C. Dhand, P. Solanki, K.N. Sood, M. Datta, B. Malhotra, Polyaniline nanotubes for impedimetric triglyceride detection, *Electrochem. Commun.* 11 **2009** 1482–1486. 10.1016/j.elecom.2009.05.034.
 184. R. Kaur, S. Rana, K. Lalit, P. Singh, K. Kaur, Electrochemical detection of methyl parathion via a novel biosensor tailored on highly biocompatible electrochemically reduced graphene oxide-chitosan-hemoglobin coatings, *Biosens. Bioelectron.* 167 **2020** 112486. 10.1016/j.bios.2020.112486.
 185. U. Hasanah, N.D. Md Sani, L.Y. Heng, R. Idroes, E. Safitri, Construction of a hydrogel pectin-based triglyceride optical biosensor with immobilized lipase enzymes, *Biosensors.* 9 **2019**. 10.3390/bios9040135
 186. A. Di Tocco, S.N. Robledo, Y. Osuna, J. Sandoval-Cortez, A.M. Granero, N.R. Vettorazzi, J.L. Martínez, E.P. Segura, A. Iliná, M.A. Zon, F.J. Arévalo, H. Fernández, Development of an electrochemical biosensor for the determination of triglycerides in serum samples based on a lipase/magnetite-chitosan/copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite, *Talanta.* 190 **2018** 30–37. 10.1016/j.talanta.2018.07.028.
 187. C.S. Pundir, V. Aggarwal, Amperometric triglyceride bionanosensor based on nanoparticles of lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase, *Anal. Biochem.* 517 **2017** 56–63. 10.1016/j.ab.2016.11.013.
 188. V. Narwal, C.S. Pundir, An improved amperometric triglyceride biosensor based on co-immobilization of nanoparticles of lipase, glycerol kinase and glycerol 3-phosphate oxidase onto pencil graphite electrode, *Enzyme Microb. Technol.* 100 **2017** 11–16. 10.1016/j.enzmictec.2017.01.009.
 189. P.R. Solanki, C. Dhand, A. Kaushik, A.A. Ansari, K.N. Sood, B.D. Malhotra, Nanostructured cerium oxide film for triglyceride sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 141 **2009** 551–556. 10.1016/j.snb.2009.05.034.
 190. Minakshi, C.S. Pundir, Construction of an amperometric enzymic sensor for triglyceride determination, *Sensors Actuators B Chem.* 133 **2008** 251–255. 10.1016/j.snb.2008.02.036.