Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

***“Materiais Híbridos Baseados em Compostos Lamelares
e Moléculas Redox Ativas”***

Ana Cláudia Bordonal

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

**Versão Corrigida da Tese de Doutorado. A versão original encontra-se
disponível na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP.**

**RIBEIRÃO PRETO-SP
2016**

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

***“Materiais Híbridos Baseados em Compostos Lamelares
e Moléculas Redox Ativas”***

Ana Cláudia Bordonal
Tese de Doutorado

Prof. Dr. Zeki Naal
Orientador

Prof. Dr. João Barros Valim
Co-Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO-SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Bordonal, Ana Cláudia

Materiais Híbridos Baseados em Compostos Lamelares e Moléculas Redox Ativas. Ribeirão Preto, 2016.

131 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientador: Naal, Zeki.

Co-Orientador: Valim, João Barros.

1. Hidróxidos Duplos Lamelares. 2. Compósitos e/ou Réplicas de carbono. 3. Compósitos de HDL/óxido de grafeno. 4. Enzima Glucose Oxidase.

*Este trabalho pôde ser realizado
graças ao apoio financeiro da*

A minha família, em especial a minha querida irmã,
por minha educação,
e incentivo em todos estes anos de estudo.

Aos Professores Dr. João Barros Valim e
Dr. Zeki Naal pela co-orientação e orientação;
e ajuda ao longo destes anos de trabalho.

Agradecimentos

Ao Departamento de Química da FFCLRP-USP e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- FCFRP por permitir a execução desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida.

Aos professores do Departamento de Química, pela contribuição em minha formação acadêmica.

Agradeço aos funcionários Lourivaldo, Rodrigo, Djalma, Zanatto, pela ajuda nas análises.

À técnica do laboratório Ms. Laila pela ajuda nos experimentos de Voltametria Cíclica e nas discussões.

Ao Prof. Dr. Roberto Santana e ao técnico Clóvis pelas análises de IV-TF.

À Prof. Dr^a. Ana Paula Ramos e ao técnico Lourivaldo pelas análises de potencial Zeta e tamanho de partícula.

Ao Prof. Dr. João Barros Valim, pela orientação e co-orientação, e por toda experiência adquirida nesse período, e ainda pelas oportunidades dos estágios PAE.

Ao Prof. Dr. Zeki Naal pela co-orientação e orientação, também pela ajuda e experiência adquirida nesse período.

Ao Prof. Dr. Jairo Tronto pela colaboração nestes anos de pesquisa.

À Prof. Dr^a. Rose Naal pelo acolhimento no grupo de pesquisa.

Aos funcionários do DQ e da seção de pós-graduação.

Agradeço aos amigos de trabalho do Laboratório de Biossensores e Sistemas Nanoestruturados: Pâmela, Miquéias, David, Marcinha, Bruna, Bianca, Laila, Perpétua e aos ex-colegas do Laboratório de Compostos Intercalados: Leonardo e Felipe, pela ajuda durante a pesquisa, e aos meus amigos do Departamento de Química e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-RP.

As minhas amigas Simone, Marcella, Maira, Anny, pela companhia e ajuda.

Sumário

Sumário.....	i
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	ix
Abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract.....	xiv
1.Introdução.....	2
1.1-Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL).....	3
1.1.1- Propriedades dos HDL.....	6
1.1.2-Aplicações dos HDL.....	7
1.1.3-Métodos de Preparação dos HDL.....	10
1.1.3.1-Métodos Diretos.....	10
1.1.3.2-Métodos Indiretos.....	12
1.2- Compósitos e/ou Réplicas de Carbono derivados de HDL.....	15
1.3- Compósitos de HDL/grafeno.....	17
1.4- Sensores e Biossensores.....	19
1.5- A Enzima Glicose Oxidase (GOx).....	21
1.5.1-Biossensores de Glicose.....	24
1.5.2- Métodos de Imobilização de Enzimas.....	26
1.6- Materiais híbridos entre HDL/biomoléculas.....	27
1.6.1- Utilização dos HDL e derivados/biomoléculas na área eletroquímica como biossensores.....	29
1.6.1.1- Exemplos da utilização de HDL e derivados na área eletroquímica para a preparação de sensores e biossensores.....	31
1.6.1.2- Exemplos de Biossensores e Sensores entre compósitos de HDL/ Grafeno.....	32
1.6.1.3- Exemplos de Biossensores entre HDL e a enzima GOx.....	32
2.Objetivos.....	38
3.Parte Experimental.....	40
3.1-Materiais.....	40
3.2- Métodos de preparação dos materiais.....	40
3.2.1-Preparação dos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL).....	40
3.2.2-Preparação de Compósitos e/ou Réplicas de carbono derivadas de HDL.....	41
3.2.3-Preparação de Compósitos de HDL/óxido de grafeno.....	42
3.3- Experimentos de Voltametria Cíclica.....	42

3.3.1- Preparação de eletrodos modificados com Mg-Al-CO ₃ /GOx e Zn-Al-CO ₃ /GOx	43
3.3.1.1- Preparação de eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al-CO ₃ /GOx	43
3.3.1.2- Preparação de eletrodos de Pasta de Carbono modificados com Mg-Al-CO ₃ /GOx	44
3.3.1.3- Preparação de eletrodos de Pasta de Carbono modificados com Zn-Al-CO ₃ /GOx	44
3.3.2- Preparação de eletrodos modificados com compósito de carbono derivado do HDL de Mg-Al-VBS e GOx	44
3.3.3- Preparação de eletrodos modificados com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno e GOx	44
3.4- Caracterização dos materiais e forma de análise dos resultados	45
3.4.1-Difração de raios X- método do pó	45
3.4.2-Análise Termogravimétrica e Térmica Diferencial	46
3.4.3-Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier	49
3.4.4-Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X	49
3.4.5- Medidas de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta.....	49
3.4.6-Medidas de Voltametria Cíclica	50
4.Resultados e Discussão	52
4.1- HDL intercalados com o ânion carbonato	52
4.2- Compósitos e/ou Réplicas de carbono derivados de HDL	58
4.3- Compósitos de HDL/óxido de grafeno.....	65
4.4- Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com HDL e derivados e a enzima GOx	72
4.4.1- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com Mg-Al-CO ₃ e Zn-Al-CO ₃ e aplicação para medidas de glicose	73
4.4.1.1- Comportamento eletroquímico dos eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al-CO ₃ e a enzima GOx	73
4.4.1.2- Comportamento eletroquímico do eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-CO ₃ e a enzima GOx	81
4.4.1.3- Comportamento eletroquímico do eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO ₃ e a enzima GOx	85
4.4.2- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com compósito de carbono derivados de HDL de Mg-Al-VBS e aplicação para medidas de glicose.....	88
4.4.3- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com compósito de Mg-Al/óxido de grafeno e aplicação para medidas de glicose.....	95
5.Conclusões	105

6.Perspectivas	108
7.Referências Bibliográficas	110
<i>Anexo 1</i>	122
<i>Anexo 2</i>	123
<i>Anexo 3</i>	124
<i>Anexo 4</i>	125
<i>Anexo 5</i>	126
<i>Anexo 6</i>	127
<i>Anexo 7</i>	128
<i>Anexo 8</i>	129
<i>Anexo 9</i>	130
<i>Anexo 10</i>	131

Lista de Figuras

Figura 1: Representação Esquemática da estrutura da Esmeclita 2:1.	2
Figura 2: Representação Esquemática da Estrutura de um HDL.	4
Figura 3: Representação esquemática dos diferentes politipos para os HDL	5
Figura 4: Aplicações dos HDL.	7
Figura 5: (A): Representação esquemática do método de substituição em fase dupla; (B): DRXP para o HDL precursor intercalado com DS e para os produtos de substituição, mostrando a diferença no espaçamento basal: a) HDL-DS; b) HDL-carbonato; c) HDL-decavanadato; d) HDL-tereftalato; HDL-colato; e f) HDL- Cu(II) ftalocianina tetrasulfonato	14
Figura 6: Representação esquemática experimental da preparação da réplica de carbono	16
Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) compósito Mg-Al-VBS HDL; b) Mg-Al-VBS-HDL após carbonização; e c) Mg-Al-VBS HDL após lavagem ácida; d) Representação Esquemática do processo de carbonização de HDL.....	16
Figura 8: Preparação de compósitos HDL/grafeno: a) intercalação de camadas de grafeno em HDL, b) crescimento <i>in situ</i> de HDL paralelo às camadas de grafeno, c) crescimento <i>in situ</i> de HDL verticalmente às camadas de grafeno, d) crescimento <i>in situ</i> de grafeno na superfície dos HDL.	18
Figura 9: Representação esquemática do compósito HDL/óxido de grafeno	19
Figura 10: Representação Esquemática de um biossensor.	20
Figura 11: Representação esquemática de um biossensor eletroquímico.	21
Figura 12: Representação da estrutura cristalina da enzima Glicose Oxidase de <i>Aspergillus niger</i> , destacando o cofator FAD.	22
Figura 13: Representação das reações da GOx.	23
Figura 14: Representação esquemática de: a) TEM; e b) TED.	24
Figura 15: Representação Esquemática dos tipos de biossensores de glicose.	26
Figura 16: Métodos de Imobilização de Enzimas.	27
Figura 17: Métodos de preparação de biohíbridos entre HDL e enzimas.	28
Figura 18: Métodos mais comuns de imobilização de enzimas na superfície do eletrodo ..	30

Figura 19: Voltamograma Cíclico para: a) GOx/ECV; b) GOx/HDL/ECV; c)GOx/HDL exfoliado/ECV	36
Figura 20: Representação esquemática das etapas de preparação da réplica de carbono derivada de HDL.	42
Figura 21: Difratoograma de raios X para HDL de Zn-Al-NO ₃	46
Figura 22: Representação da decomposição térmica de um HDL de Mg-Al-CO ₃	47
Figura 23: Representação da evolução térmica do HDL de Mg-Al-CO ₃ em função da temperatura.	48
Figura 24: Voltamograma Cíclico para IrCl ₆ ²⁻ , 2 mmol L ⁻¹ , a 40 mVs ⁻¹	50
Figura 25: Difratoogramas de raios X no pó para: a) Mg-Al-CO ₃ preparado a pH variável; e b) Zn-Al-CO ₃ preparado a pH variável. ° fase identificada como ZnO.....	53
Figura 26: Esquema de intercalação das moléculas de carbonato entre as lamelas do HDL.	54
Figura 27: Curvas de ATG e de ATD para: a) Mg-Al-CO ₃ preparado a pH variável; e b) Zn-Al-CO ₃ preparado a pH variável.....	55
Figura 28: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para: Mg-Al-CO ₃ ; e b) Zn-Al-CO ₃ ...	57
Figura 29: Imagens representativas de MEV para: a) e b) Mg-Al-CO ₃ em diferentes escalas; c) e d) Zn-Al-CO ₃ em diferentes escalas.....	58
Figura 30: Difratoogramas de raios X no pó para: a) Mg-Al-VBS preparado a pH constante; b) Mg-Al-VBS após a calcinação; c) Mg-Al-VBS carbonizado; e d)Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.....	60
Figura 31: Esquema de intercalação das moléculas do 4-vinil benzeno sulfonato entre as lamelas do HDL.	61
Figura 32: Curvas de ATG e de ATD para: Mg-Al-VBS.	62
Figura 33: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para a) Mg-Al-VBS; b) Mg-Al-VBS calcinado; c) Mg-Al-VBS carbonizado; d) Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.63	
Figura 34: Imagens representativas de MEV para: a) e b) Mg-Al-VBS; c) e d) Mg-Al-VBS calcinado; e) e f) Mg-Al-VBS carbonizado; g) e h) Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.	64
Figura 35: Difratoogramas de raios X no pó para: a) óxido de grafeno puro; e b) Mg-Al/óxido de grafeno.	67

Figura 36: Curvas de ATG e de ATD para: a) óxido de grafeno puro; e b) Mg-Al/óxido de grafeno.	68
Figura 37: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para a) óxido de grafeno; b) composto Mg-Al/óxido de grafeno.	70
Figura 38: Imagens representativas de MEV para: a) e b) óxido de grafeno puro; e c) e d) Mg-Al/óxido de grafeno.....	72
Figura 39: Processos de oxidação/redução do FAD.....	73
Figura 40: Voltamograma Cíclico para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx saturado com argônio e velocidade de varredura de 100 mVs ⁻¹	74
Figura 41: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx saturado com ar sintético: — sem glicose; e — com 1,75 mmol L ⁻¹ de glicose 0,1 mol L ⁻¹ à 10 mVs ⁻¹	75
Figura 42: Voltamogramas Cíclicos: Resposta da GOx imobilizada em eletrodos de CV com Mg-Al-CO ₃ /GOx com as sucessivas adições de glicose, saturado com ar sintético.	76
Figura 43: a) Curva I vs C glicose para os eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al-CO ₃ /GOx; e b) Curva Analítica.....	77
Figura 44: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx.....	79
Figura 45: Estabilidade dos eletrodos de CV modificados com Mg-Al-CO ₃ /GOx após período de 15 dias: a) sem glicose; e b) com adição de 1,75 mM glicose.	80
Figura 46: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-CO ₃ /grafite/GOx: a) em Argônio à 100mVs ⁻¹ ; e b) saturado com ar sintético: — sem glicose e — com 1,375 m mol L ⁻¹ of glicose à 10 mVs ⁻¹	82
Figura 47: a) Curva I vs C glicose para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado Mg-Al-CO ₃ /grafite/GOx; e b) Curva Analítica.	84
Figura 48: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO ₃ / grafite/GOx: a) em Argônio à 100mVs ⁻¹ ; e b) saturado com ar sintético : — sem glicose e — com 1,5 mmol L ⁻¹ de glicose à 10 mVs ⁻¹	86
Figura 49: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO ₃ / grafite/GOx, com as sucessivas adições de solução de glicose 0,1 mol L ⁻¹ , em ar sintético à 10 mVs ⁻¹	87
Figura 50: a) Curva I vs C glicose para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado Zn-Al-CO ₃ /grafite/GOx.	88

Figura 51: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/GOx: a) em Argônio à 100 mVs ⁻¹ ; e b) saturado com ar sintético: — sem glicose e — com 1 mmol L ⁻¹ de glicose à 10 mVs ⁻¹	90
Figura 52: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx: a) em Argônio à 10 0mVs ⁻¹ ; e b) em ar sintético: — sem glicose, — com 0,125 mmol L ⁻¹ de glicose, e — 0,25 m mol L ⁻¹ de glicose, à 10 mVs ⁻¹	92
Figura 53: a) Curva I vs [glicose] para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx; e b) Curva Analítica.	94
Figura 54: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno/GOx, saturado com Argônio: — à 100 mVs ⁻¹ ; e — à 400 mVs ⁻¹	96
Figura 55: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno/GOx: saturado com ar sintético: — sem glicose, — com 1,5 mmol L ⁻¹ de glicose 0,1 mol L ⁻¹ à 10 mVs ⁻¹	97
Figura 56: a) Curva I vs [glicose] para os eletrodos de CV modificados com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno/GOx; e b) Curva Analítica.	98
Figura 57: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx saturado com O ₂ à 10 mVs ⁻¹ com as sucessivas adições de glicose 0,1 mol L ⁻¹	100
Figura 58: a) Curva I vs [glicose] para o eletrodo de CV modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx, saturado com O ₂ ; e b) Ajuste linear.	101
Figura A1: DRXP para Zn-Al-CO ₃ com indexação dos picos de ZnO.	122
Figura A2: Gráfico para obtenção de ponto de carga Zero da enzima GOx.	123
Figura A3: Espectros de EDX para o material Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.	124
Figura A4: Espectros de EDX para o material Mg-Al-VBS carbonizado.	125
Figura A5: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx, saturado com Argônio à 100 mVs ⁻¹	126
Figura A6: Curva Analítica da corrente catódica O ₂ com a variação da concentração de glicose para o eletrodo de CV modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx.	127
Figura A7: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO ₃ /GOx saturado com ar sintético à 10 mVs ⁻¹ : a) com as sucessivas adições de glicose 0,1 mol L ⁻¹ ; e b) Curva I vs C glicose.	128

Figura A8: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO₃/grafite/GOx: a) em Argônio à 10 mVs⁻¹; e b) saturado com O₂ : — com 0,25 mmol L⁻¹ de glicose e — com 1,125 mmol L⁻¹ de glicose à 10 mVs⁻¹..... 129

Figura A9: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx..... 130

Figura A10: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx com saturação de O₂. 131

Lista de Tabelas

Tabela 1: Representação de algumas argilas aniônicas naturais, com especificações do sistema cristalino e grupo espacial.	3
Tabela 2: Fatores que influenciam na síntese de HDL.	5
Tabela 3: Exemplos de biossensores enzimáticos de glicose entre HDL/GOx.	35
Tabela 4: Parâmetros obtidos para os materiais intercalados com carbonato.	52
Tabela 5: Etapas de decomposição dos materiais intercalados com carbonato.	56
Tabela 6: Atribuição das bandas de IV-TF para os HDL intercalados com carbonato.	56
Tabela 7: Parâmetros obtidos para o material intercalado com o VBS e seus derivados.	60
Tabela 8: Etapas de decomposição para o HDL Mg-Al-VBS.	62
Tabela 9: Valores médios de potencial Zeta para o HDL de Mg-Al-VBS e os compósitos derivados.	65
Tabela 10: Parâmetros obtidos para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.	66
Tabela 11: Etapas de decomposição para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.	69
Tabela 12: Características Analíticas dos eletrodos modificados com HDL e derivados/GOx.	103

Abreviaturas

ATD- Análise térmica diferencial

ATG- Análise termogravimétrica

ATP- Adenosina trifosfato

AuNPs- Nanopartículas de ouro

CTAB- Brometo de N-cetil-N, N, N – trimetilamônio

CV- Carbono vítreo

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DTG- Curva derivada da análise termogravimétrica

DS- Ânion dodecil sulfato

DRXP- Difração de raios X no pó

ECV- Eletrodo de carbono vítreo

EDX- Espectroscopia de dispersão de energia de raios X

EPC- Eletrodo de pasta de carbono

FAD- Flavina adenina dinucleotídeo

Fc- Ferroceno

GOx- Glicose Oxidase

Hb- Hemoglobina

HDL- Hidróxidos duplos lamelares

I_{max}- Corrente Máxima

IV-TF- Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

kDa- quilo-Dalton

K_M^{app}- Constante de Michaelis-Menten

Med- Mediador

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

pI- Ponto isoelétrico

PSS- Poli estireno sulfonato

PVC- Poli cloreto de vinila

PVS- Poli vinil sulfonato

SDBS- dodecil benzeno sulfonato

TED- Transferência de Elétrons Direta

TEM- Transferência de Elétrons Mediada

T.T- Tratamento térmico

VC- Voltametria cíclica

VBS- 4-vinil benzeno sulfonato

RESUMO

Bordonal, A. C. **“Materiais Híbridos Baseados em Compostos Lamelares e Moléculas Redox Ativas”**. 131 p. Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) constituem uma classe de materiais que apresentam estrutura lamelar, consistindo de camadas positivamente carregadas de um hidróxido duplo, intercaladas com ânions hidratados no domínio interlamelar. Estes materiais têm recebido bastante atenção nos últimos tempos, devido ao baixo custo e relativa simplicidade de preparação, a possibilidade de combinação de uma variedade de cátions e ânions, aliados às propriedades que os HDL podem apresentar como: propriedades ácidas e básicas, “efeito memória”, elevada área superficial, etc. Os HDL também podem ser utilizados em combinação com outros materiais, como por exemplo, óxido de grafeno, formando compósitos, com a finalidade melhorar as propriedades destes materiais. Podem ainda serem utilizados para a preparação de outros compósitos e/ou réplicas de carbono, por tratamento térmico de um HDL intercalado com um monômero, por exemplo, 4-vinil benzeno sulfonato (VBS), que pode ser polimerizado “*in situ*” e posteriormente carbonizado produzindo a réplica de carbono. A utilização dos materiais descritos anteriormente como suporte para imobilização de enzimas pode proporcionar uma plataforma alternativa para construção de dispositivos biossensores. O objetivo geral do trabalho foi a preparação e caracterização de materiais como HDL, Compósitos e/ou Réplicas de Carbono derivadas de HDL ou compósitos de HDL/ óxido de grafeno, como suporte da enzima Glicose Oxidase, estudando suas propriedades eletroquímicas, visando as potenciais aplicações destes materiais como biossensores.

Para isto, foram preparados e caracterizados HDL de Mg-Al e Zn-Al intercalados com o ânion carbonato, pelo método de coprecipitação a pH variável; compósitos e/ou réplicas de carbono derivadas de um HDL precursor de Mg-Al-VBS, preparados, por coprecipitação a pH constante e compósitos de Mg-Al/óxido de grafeno que também foram preparados por coprecipitação a pH constante. Estes materiais foram utilizados na imobilização da enzima Glicose Oxidase (GOx), em eletrodos modificados e foi realizado o estudo eletroquímico dos mesmos e de suas potenciais aplicações. Foi possível observar que os HDL de Mg-Al-CO₃, Zn-Al-CO₃, Mg-Al-VBS e o compósito Mg-Al/óxido de grafeno exibiram boa cristalinidade, estabilidade térmica, e outras características como porosidade e superfícies positivamente carregadas, viabilizando a

utilização dos mesmos para a imobilização e estudo eletroquímico da enzima Glicose Oxidase. O estudo eletroquímico dos eletrodos modificados com estes materiais e a enzima Glicose Oxidase mostrou que os mesmos apresentam boa resposta catalítica frente ao substrato glicose e a importância destes materiais na atividade desta enzima. Os eletrodos modificados apresentaram boa sensibilidade, estabilidade à longo prazo e reprodutibilidade do método, podendo estes serem aplicados para a preparação de biossensores.

Palavras-chave: Hidróxidos Duplos Lamelares, Compósitos e/ou Réplicas de carbono, Compósitos de HDL/óxido de grafeno, enzima Glicose Oxidase.

ABSTRACT

Bordonal, A. C. “ **Hybrid Materials Based on Layered Compounds and Active Redox Molecules**”. 131 p. Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Layered Double Hydroxides (LDH) constitute a class of materials with a layered structure consisting of positively charged layers of a double hydroxide and hydrated anions intercalated in the interlayer domain. These materials have received much attention lately because they offer many advantages: they display acidic and basic properties, “memory effect”, and high surface area; are inexpensive and easy to prepare; and can combine with a variety of cations and anions. Combination of LDH with materials like graphene oxide affords composites with improved properties as compared to the starting organic component. Heat treatment of LDH intercalated with a monomer such as 4-vinyl-benzene sulfonate (VBS), followed by “*in situ*” polymerization and carbonization, produces composites and/or carbon replica. The materials described above could be applied as support to immobilize enzymes and may provide an alternative platform for biosensor devices. In this study, we aimed to prepare and characterize LDH, composites and/or carbon replica derived from LDH, and LDH/graphene oxide composites and support glucose oxidase enzyme (GOx) on these matrixes. We investigated the electrochemical properties of the resulting materials and evaluated their potential application as biosensors. More specifically, we prepared and characterized Mg-Al and Zn-Al LDH systems intercalated with carbonate ion by the coprecipitation method; composites and/or carbon replica derived from a precursor LDH Mg-Al-VBS by coprecipitation at constant pH; and Mg-Al/graphene composites by coprecipitation at constant pH. We used these materials to immobilize GOx on modified electrodes and assessed the electrochemical activity and potential application of the immobilized enzyme as biosensor. Mg-Al-CO₃, Zn-Al-CO₃, Mg-Al-VBS LDH and Mg-Al/graphene oxide composite were crystalline, thermally stable, and porous and exhibited positively charged surface, which favored immobilization and electrochemical investigation of the GOx enzyme. The modified electrodes displayed good catalytic response to glucose, as substrate, and improved the activity of the enzyme as compared to GOx alone. Additionally, the modified electrodes were sensitive, stable, and reproducible, paving the way for their use in the design of biosensors.

Keywords: Layered Double Hydroxides, Composites and/or Carbon Replica, LDH/graphene oxide Composites, Glucose Oxidase enzyme.

1. Introdução

1.Introdução

Argilas são materiais que são utilizados há séculos e podem ser aplicados em diferentes áreas, inclusive em nosso cotidiano, na área de materiais de construção, produtos farmacêuticos, na agricultura. Estes materiais ainda podem ser utilizados como catalisadores, suporte para catalisadores, adsorventes, trocadores de íons, agentes de descoloração^{1,2}. As argilas podem ser divididas em duas classes: as argilas catiônicas, geralmente encontradas na natureza; e as argilas aniônicas, que não são tão facilmente encontradas na natureza, porém são relativamente fáceis de serem preparadas^{1,2}.

As argilas catiônicas são constituídas de camadas carregadas negativamente de hidróxidos de metais e de não metais, como por exemplo, aluminossilicatos ($\text{Al}_4\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$) ou magnésiosilicatos ($\text{Mg}_6\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$), e possuem cátions intercalados entre as camadas para manter a eletroneutralidade do sistema^{3,4}, como representado na *Figura 1*.

Figura 1: Representação Esquemática da estrutura da Esmectita 2:1 (*Adaptada da Referência 5*).

Já as argilas aniônicas são constituídas de camadas de um hidróxido metálico carregadas positivamente, com ânions intercalados entre as camadas, para que a eletroneutralidade do sistema também seja mantida³. Um exemplo de argila aniônica é a

hidrotalcita, um mineral natural constituído de cátions Mg^{2+} e Al^{3+} e de ânions CO_3^{2-} descrito pela fórmula: $[Mg_6Al_2(OH)_{16}]CO_3 \cdot 4H_2O$ ⁶. Na *Tabela 1* estão representados alguns outros exemplos de argilas aniônicas naturais.

Tabela 1: Representação de algumas argilas aniônicas naturais, com especificações do sistema cristalino e grupo espacial⁷.

Composição			Nome do Mineral	
<i>M(II)</i>	<i>M(III)</i>	<i>A^{m-}</i>	<i>Romboédrico</i> <i>(3R), R3m</i>	<i>Hexagonal</i> <i>(2H), P6₃mmc</i>
Mg	Al	CO_3^{2-}	Hidrotalcita	Manasseíta
Mg	Cr	CO_3^{2-}	Estictita	Barbetonita
Mg	Fe	CO_3^{2-}	Piroaurita	Esjogrenita
Ca	Al	OH^-	---	Hidrocalumita
Ni	Al	CO_3^{2-}	---	Tacovita
Ni	Fe	CO_3^{2-}	Reevesita	---
Ni	Fe	SO_4^{2-}	Honessita	---

1.1-Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL)

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL), são compostos que possuem estrutura similar a da hidrotalcita, e na literatura são conhecidos como compostos do tipo da hidrotalcita, ou do inglês, “*hydrotalcite-like compounds*”^{6,7}.

A estrutura dos HDL, pode ser entendida a partir da estrutura do mineral brucita, $Mg(OH)_2$, que é constituído de camadas bidimensionais infinitas, e cada camada possui cátions Mg^{2+} coordenados octaédricamente por íons OH^- . Nesta estrutura as lamelas são empilhadas através de interações de Van de Walls e ligações de hidrogênio. Se nesta estrutura houvesse uma substituição de parte dos cátions Mg^{2+} por cátions Al^{3+} resultaria em uma carga residual positiva nas lamelas, que precisa ser balanceada por ânions entre as lamelas. Quando balanceada por ânions carbonato resultaria na estrutura da hidrotalcita, característica dos HDL. Entre as lamelas destes compostos há moléculas de água que interagem por ligação de hidrogênio com os íons hidroxila das lamelas e/ou com os ânions interlamelares^{2,8}. Na *Figura 2* está representado um esquema da estrutura geral de um HDL.

Figura 2: Representação Esquemática da Estrutura de um HDL (*Adaptada da Referência 9*).

Os HDL podem ser representados pela fórmula geral descrita a seguir⁷:

onde: M²⁺ representa o cátion divalente

M³⁺ representa o cátion trivalente

A^{m-} representa um ânion intercalado com carga m⁻.

A água e os ânions que estão intercalados possuem propriedades físicas e estruturais que se assemelham a de um estado quase líquido².

As camadas de hidroxilas podem exibir duas sequências de empilhamento, sendo elas romboédrica e hexagonal, que são distinguíveis apenas pela técnica de difração de raios X. A hidrotalcita possui uma sequência de empilhamento romboédrica 3R, com parâmetro de cela unitária a , e $c = 3c'$ (onde c' é a espessura de uma camada de brucita), por exemplo, o politipo manasseíta cristaliza em uma sequência hexagonal 2H, onde $c = 2c'$, e uma terceira sequência descrita na literatura como 1H está relacionada à HDL altamente hidratados contendo sulfato^{1,7}. Estes modelos das sequências de empilhamento podem ser observados na *Figura 3*.

Figura 3: Representação esquemática dos diferentes politipos para os HDL (Adaptada das Referências 7,10).

Foi em 1930, que apareceu na literatura o primeiro relato da síntese de um HDL em pequena quantidade, quando Feitknecht^{11,12} fez reagir soluções diluídas de sais metálicos com base. Décadas depois, surgiu um grande interesse por parte dos pesquisadores em estudar os aspectos relacionados à síntese desses materiais³.

É possível preparar uma grande variedade de HDL devido a possibilidade de combinação de diversos cátions e ânions; esses cátions bivalentes e trivalentes devem possuir raio iônico próximo ao raio do cátion Mg^{2+} , que podem ser acomodados em sítios octaédricos, formando camadas².

Porém para a obtenção de materiais com pureza de fase é necessário o controle de alguns parâmetros como a razão entre os cátions bivalente e trivalente $M(II)/M(III)$, o pH, a temperatura de cristalização, etc³. Essas e outras variáveis relacionadas com a preparação de HDL estão sumarizadas na *Tabela 2*.

Tabela 2: Fatores que influenciam na síntese de HDL².

Variáveis estruturais	Variáveis na preparação
Tamanho do cátion	pH
Valor de x (razão $M(III)/(M(III) + M(II))$)	Método de precipitação
Estequiometria de cátions	Temperatura de precipitação
Mistura de Cátions	Concentração dos reagentes
Balanceamento de ânions	Envelhecimento
Quantidade de água intercalada	Lavagem e secagem
Tamanho e morfologia do cristal	Presença de impurezas

Um parâmetro importante na preparação de HDL é o valor de x , que representada a densidade de carga da lamela, que é dado pela razão: $M(III)/(M(III) + M(II))$, este valor tem influência sobre as propriedades do material, como por exemplo, cristalinidade e capacidade de troca iônica⁷. É possível preparar HDL com valores de x que variam entre 0,1-0,5; porém há estudos, que sugerem que este valor deva estar entre 0,20 e 0,34 para formar materiais com pureza de fase^{1,2}. Brindley and Kikkawa¹³ reportaram que para altos valores de x , a quantidade de cátions Al aumenta, levando a formação de $Al(OH)_3$, e baixos valores de x causa uma alta densidade de cátions Mg vizinhos, levando a formação de $Mg(OH)_2$ ¹.

Os HDL não são encontrados abundantemente na natureza, mas devido a grande possibilidade de combinações de cátions e ânions, uma variedade de HDL podem ser preparados em laboratório, com facilidade e custo relativamente baixo^{7,14}. Os cátions divalentes mais utilizados são por exemplo: Mg, Ni, Fe, Co, Cu, Zn, Ca, Mn; e os cátions trivalentes são: Al, Cr, Fe, Ni, Co, Sc e Ga⁷. Estes cátions devem apresentar raios em uma faixa entre 0,5 a 0,74 Å e coordenação octaédrica⁷. Os ânions mais utilizados para a preparação de HDL são os haletos (F^- , Cl^- , Br^- , I^-), os oxo-ânions (CO_3^{2-} , NO_3^- , SO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , etc.), complexos de metais de transição aniônicos ($[NiCl_4]^{2-}$, $[Fe(CN)_6]^{4-}$, etc.), ânions orgânicos (carboxilatos, porfirinas, alquil-sulfatos, etc.), polioxo-metalatos ($V_{10}O_{28}^{6-}$, $Mo_7O_{24}^{6-}$, etc.), polímeros aniônicos (PSS, PVS, etc)^{7,15}.

1.1.1- Propriedades dos HDL

Os HDL possuem algumas propriedades interessantes como por exemplo^{1,3,7,16}:

- i) alta área superficial ($100-300m^2/g$)² e porosidade, que estão relacionadas com sua aplicabilidade como adsorventes e catalisadores;
- ii) propriedades básicas: que estão relacionadas aos produtos de decomposição de HDL de $MgAlCO_3$, como por exemplo, espécies MgO possuem sítios básicos¹⁶;
- iii) efeito memória: que é a propriedade de reconstrução da estrutura por contato do material calcinado com uma solução contendo ânion²; especificamente para os HDL de Mg/Al e Zn/Al;
- iv) capacidade de troca iônica: propriedade de troca de ânions interlamelares por outros ânions que é utilizada na preparação de novos materiais¹⁷;

v) propriedades eletroquímicas: alguns HDL podem apresentar condutividade iônica devido a mobilidade dos ânions dentro da lamela⁷;

vi) estabilidade térmica, é uma propriedade importante que os HDL possuem, sendo que as temperaturas de decomposição térmica são dependentes do ânion intercalado, cristalinidade, da razão molar entre os cátions⁷. Por exemplo, quando se intercala ânions orgânicos em HDL é observado um aumento na estabilidade térmica, em comparação com o ânion orgânico não intercalado¹⁸.

1.1.2-Aplicações dos HDL

Devido a essas propriedades os HDL podem ser aplicados em diversas áreas, como catalisadores, suporte para catalisadores, veículos para transporte de moléculas, trocadores de íons, adsorventes, na área industrial, medicinal, na área eletroquímica, etc¹⁶. Algumas destas aplicações estão representadas na *Figura 4* e nos exemplos citados abaixo.

Figura 4: Aplicações dos HDL (*Adaptada da Referência 16*).

Os HDL podem ser aplicados em *catálise* devido ao comportamento catalítico dos seus produtos de decomposição, os óxidos de metais, que podem ser aplicados

como catalisadores heterogêneos devido à superfície básica que apresentam^{7,19}. Velu e colaboradores²⁰ reportaram a utilização de HDL de Ni/Al, CoAl, e seus análogos contendo Sn para oxidação, reforma catalítica e reforma catalítica oxidativa do metanol com aplicação para preparação de biocélulas de H₂¹⁹. Estudos realizados²¹ mostraram a eficiência de HDL de Zn-Co, na oxidação de álcool e água²². Ainda, HDL de Mg-Al ativados exibiram alta atividade catalítica e foram seletivos na condensação aldólica¹⁹, como demonstrado em estudo²³ para a reação de condensação da acetona, em que um HDL de Mg-Al depositado em nanofibras de carbono resultaram numa melhora da atividade catalítica em quatro vezes, devido às combinações de propriedades dos HDL e do material de carbono.

Ainda podem ser utilizados como suporte para catalisadores através da adsorção do catalisador na sua forma aniônica na superfície do HDL ou através da intercalação do catalisador no HDL⁷. Estudos realizados²⁴ demonstraram que a utilização de HDL de Mg-Cr como suporte para Nanopartículas de ouro (AuNPs) foi eficiente para a oxidação aeróbica de álcool, demonstrando que o sinergismo entre as fases, melhora as propriedades de catálise²⁵. Os HDL podem ser utilizados em sua forma exfoliada, formando ‘nanofolhas’, que podem ser utilizadas como suporte para imobilização de espécies catalíticas²². E ainda os HDL podem ser utilizados como suporte para imobilização de biomoléculas, como as enzimas¹⁹.

Os HDL podem ser aplicados como adsorventes devido à sua alta área superficial⁷. Como por exemplo, podem ser aplicados na adsorção de gases, como foi demonstrado²⁶ na adsorção de alguns gases como N₂, CO₂, O₂, H₂ em HDL de MgAl[Fe(CN)⁴⁻], com aplicabilidade na separação de gases do ar liquefeito⁷. Alexandrica e colaboradores²⁷ estudaram a utilização de HDL de Mg-Al intercalado com nitrato, para aplicação na remoção do corante ‘Blue 19’ de soluções aquosas, sendo que este sistema se mostrou eficaz para o proposto. A presença deste tipo de corante em águas residuais se mostra como um problema ambiental, devido a estabilidade e toxicidade destes corantes nos microambientes. Ainda, Bruna e colaboradores²⁸ estudaram uma série de HDL, como por exemplo Mg-Al-Cl, Mg-Fe-Cl, Mg-Al-Fe-Cl e seus produtos de calcinação para a adsorção do herbicida MCPA [(4-cloro-2-metilfenóxi) ácido acético], em função do pH, concentração do herbicida e tempo de contato, e liberação controlada do herbicida, que se mostraram eficientes inclusive para aplicação em condições reais.

Os HDL podem ser aplicados como estabilizadores térmicos, como por exemplo a adição de HDL, principalmente contendo o ânion carbonato intercalado, à polímeros como o PVC, polipropileno; melhora sua estabilidade térmica, resistência à chama⁷. Recentemente, Elbasuney²⁹ utilizou um HDL de Mg-Al-CO₃ e a modificação da superfície com um tensoativo polimérico, poli (etileno-co-ácido acrílico) e um ligante orgânico, ácido dodecanóico, devido as propriedades que estes materiais possuem de diluir os gases da combustão, formando uma barreira de proteção térmica, impedindo uma maior degradação dos materiais orgânicos.

Na área farmacêutica e medicinal, os HDL do sistema Mg-Al-CO₃ podem ser aplicados como antiácido⁷. É possível a intercalação de aminoácidos em HDL, como foi reportado em estudo³⁰, onde os autores descreveram a preparação de HDL intercalados com vários aminoácidos como: Glicina, Alanina, Leucina, Fenilalanina, dentre outros, pelo método de coprecipitação, e a posterior delaminação destes em formamida. Também é possível utilizar HDL em combinação com derivados de ácido fólico para utilização no tratamento contra o câncer³¹. Um estudo reportou³² a intercalação de adenosina trifosfato (ATP) em HDL de Mg-Al para aplicação como sistemas de liberação de fármacos³³. Tronto e colaboradores³⁴ reportaram a intercalação de vários ânions de interesse farmacêutico em HDL como por exemplo: citrato, salicilato, glutamato e aspartato; e ainda reportaram³⁵ a intercalação e o estudo da liberação de aminoácidos em HDL de Mg-Al.

Na área eletroquímica³⁶⁻³⁸, os HDL podem ser utilizados para a preparação de eletrodos modificados para confecção de baterias, obtendo-se melhora nas propriedades, sendo uma possível alternativa aos materiais já utilizados comercialmente⁷. HDL ainda podem ser utilizados para a preparação de sensores e biossensores para detecção de glicose, uréia, colesterol, hemoglobina, etc³³.

Nejati e Asadpour-Zeynali³⁹ utilizaram um HDL de Ni-Fe para a preparação de um eletrodo modificado, que foi eletrodepositado em um eletrodo de carbono vítreo, esse eletrodo modificado foi utilizado para a redução eletrocatalítica e determinação de metronidazol.

Liu e colaboradores⁴⁰ utilizaram um HDL de Ni-Al para co-imobilizar hemoglobina e DNA, o biossensor preparado demonstrou uma rápida transferência de elétrons direta e uma resposta catalítica sensível à H₂O₂ e NO₂⁻.

Gong e colaboradores⁴¹ prepararam um biossensor baseado em acetilcolinesterase imobilizada em HDL para detecção amperométrica de pesticidas

organofosfato. O biossensor preparado apresentou boa sensibilidade, reprodutibilidade e estabilidade.

Chen e colaboradores⁴² prepararam um sensor não enzimático para detecção de glicose baseado em HDL de Ni/Al que foi utilizado para modificar um eletrodo de carbono vítreo, este sensor se mostrou simples e barato de se preparar e com reprodutibilidade, sensibilidade e estabilidade, sendo possível sua utilização para aplicações práticas.

1.1.3-Métodos de Preparação dos HDL

Os HDL podem ser preparados por vários métodos, que estão classificados em dois principais grupos como métodos diretos e indiretos de síntese.

Dentre os métodos diretos de síntese destacam-se os métodos de coprecipitação ou sal-base, sal-óxido, hidrólise, sol-gel, síntese hidrotérmica, síntese eletroquímica^{3,7,16,43,44}.

Dentre os métodos indiretos de síntese destaca-se a troca aniônica em solução, troca aniônica por regeneração do precursor calcinado, troca aniônica por substituição em fase dupla⁴⁵⁻⁴⁷. Estes métodos serão descritos detalhadamente a seguir:

1.1.3.1-Métodos Diretos

i) Coprecipitação ou Sal-base

Este é um dos métodos de síntese mais citados na literatura. A coprecipitação pode ser realizada a pH constante ou pH variável. Para evitar a formação de outras fases como por exemplo, dos hidróxidos simples dos metais e para a obtenção de materiais cristalinos é necessário o controle de algumas variáveis, como por exemplo: a velocidade constante de gotejamento das soluções; a agitação das soluções; o pH durante a precipitação; a temperatura de síntese, que geralmente é utilizada a temperatura ambiente⁷.

A coprecipitação a pH variável, mais utilizada é aquela com decréscimo do valor de pH, que consiste na adição de uma solução contendo os cátions bivalentes e trivalentes à uma solução de base e do ânion que se deseja intercalar⁷.

A coprecipitação a pH constante consiste na adição lenta de uma mistura da solução dos cátions bivalente e trivalente, à solução do ânion de interesse, com adição simultânea de uma solução de base, para que o pH possa ser controlado^{7,48}.

É possível realizar um tratamento hidrotérmico do material precipitado, com a finalidade de melhorar as características da síntese, como por exemplo, aumento do tamanho dos cristais obtidos e melhorias na sua cristalinidade. Este tratamento geralmente é realizado em uma autoclave, sob altas condições de pressão e temperatura utilizando-se o material recentemente precipitado suspenso em uma solução do ânion que foi intercalado (chamada de água-mãe)¹⁶.

ii) Sal-óxido

Este método consiste em fazer reagir uma suspensão de óxido do metal divalente com uma solução do sal formado pelo cátion trivalente e uma solução do ânion a ser intercalado. Este método foi empregado para a síntese de HDL dos sistemas Zn-Cr-Cl, Zn-Cr-NO₃, Zn-Al-Cl, Zn-Al-NO₃, apresentando bons resultados, porém possui limitações, uma vez que o óxido do cátion divalente necessita sofrer hidrólise lenta e o ânion que será intercalado deve formar um sal solúvel com o cátion trivalente e ser estável em meio ácido^{7,18}.

iii) Hidrólise

O método de hidrólise induzida consiste na reação entre uma solução do sal formado pelo cátion divalente, o hidróxido do cátion trivalente e o ânion de interesse. Geralmente se obtém materiais com cristalinidade menor que a obtida por outros métodos de preparação, porém com a vantagem do menor tempo de preparação⁷.

No método de hidrólise da uréia, a hidrólise ocorre em duas etapas, primeiro com a formação de cianeto de amônio, que é hidrolisado à carbonato de amônio, resultando em um pH igual a 9 que é propício para a precipitação de diversos metais⁴⁸. Como demonstrado por Costantino e colaboradores⁴⁹, que preparou vários HDL intercalados com carbonato por este método: Mg/Zn/Ni-Al-CO₃, obtendo bons resultados com condições ótimas de preparação encontradas por estes pesquisadores⁴⁸.

iv) Sol-gel

Este método consiste na reação de uma solução alcoólica de etóxido de magnésio, com uma solução alcoólica de tri-sec-butoxido de alumínio, preparada por agitação e com aquecimento sob refluxo para a formação do gel⁷. Lopez e colaboradores⁵⁰ prepararam HDL do sistema Mg-Al, intercalados com vários ânions, por este método e obtiveram resultados satisfatórios.

v) Síntese Hidrotérmica

Esta síntese é sempre realizada em altas pressões e altas temperaturas e utiliza os cátions bivalente e trivalente sob a forma dos seus óxidos. São utilizadas as suspensões dos óxidos e uma solução do ácido, ou anidrido, cuja base conjugada se quer intercalar. Porém não é muito empregada, devido a maior simplicidade de preparação de outros métodos⁷.

vi) Síntese Eletroquímica

Este método baseia-se na redução catódica de nitratos de metais, como por exemplo, soluções de nitrato de níquel e de nitrato do metal trivalente são colocadas em contato com um eletrodo de níquel metálico, sendo que o nitrato se reduz a nitrito levando à formação de hidroxila e precipitando o hidróxido duplo lamelar na superfície do eletrodo⁷, como demonstrado pelas seguintes reações eletroquímicas⁵¹:

Indira e colaboradores⁴³ sintetizaram HDL de Ni, com os cátions trivalentes: Al, Cr, Mn, Fe, pelo método eletroquímico e estes materiais se mostraram com aplicabilidade na preparação de baterias.

*1.1.3.2-Métodos Indiretos**i) Troca Aniônica em solução*

Na troca aniônica em solução de um ânion, ocorre a substituição do ânion interlamelar por um ânion que está em solução⁴⁸:

Geralmente é utilizado um HDL precursor contendo cloreto, e uma solução concentrada do ânion que se deseja intercalar. A substituição dependerá de vários fatores como, por exemplo: efeitos cinéticos como a geometria, o tamanho e a carga do ânion⁷, e efeitos termodinâmicos como demonstrado por Miyata¹⁷, sobre a capacidade que alguns ânions possuem de estabilização da estrutura lamelar:

Na troca aniônica em solução de um ânion em meio ácido, neste caso o HDL precursor possui ânions capazes de sofrer ataque ácido, como por exemplo, carbonato ou carboxilato⁴⁸:

Este método foi demonstrado por Bish e colaboradores⁴⁷ que utilizou HDL de Ni-Al-CO₃ e Mg-Al-CO₃ e que foram trocados por ânions dos ácidos HCl, HNO₃⁻ e H₂SO₄²⁻.

ii) Regeneração do precursor calcinado

Neste método, é utilizado um HDL precursor, geralmente contendo o ânion carbonato, e este material é calcinado, até temperatura adequada (determinada por análise termogravimétrica), onde é formado um oxi-hidróxido duplo, que pode regenerar a estrutura lamelar em solução aquosa de um ânion de interesse^{7,48}. O ânion a ser substituído não precisa ser necessariamente o mesmo ânion inicialmente preparado, e este método se mostra bastante eficiente para a preparação de HDL intercalados com vários ânions orgânicos ou inorgânicos, como por exemplo, cromóforos, surfactantes, aminoácidos, complexos metálicos, podem ser incorporados por este método de

síntese⁴⁸. Este método funciona especificamente para os HDL de Mg/Al e Zn/Al, por apresentarem a propriedade de “efeito memória”⁵².

iii) Troca aniônica por substituição em fase dupla

Este método baseia-se na formação de um sal entre um surfactante aniônico (geralmente sulfato ou sulfonado), como por exemplo dodecil sulfato de sódio (DS), e um catiônico, como por exemplo, brometo de *N*-cetil-*N,N,N*-trimetil amônio, CTAB; que é removido do meio aquoso em uma fase orgânica como por exemplo, clorofórmio. Para isto é utilizado um HDL precursor intercalado com dodecil sulfato de sódio⁴⁵, como mostrado na *Figura 5*.

Figura 5: (A): Representação esquemática do método de substituição em fase dupla; (B): DRXP para o HDL precursor intercalado com DS e para os produtos de substituição, mostrando a diferença no espaçamento basal: a) HDL-DS; b) HDL-carbonato; c) HDL-decavanadato; d) HDL-tereftalato; HDL-colato; e f) HDL- Cu(II) ftalocianina tetrasulfonato (*Adaptada da Referência 45*).

1.2- Compósitos e/ou Réplicas de Carbono derivados de HDL

Os carbonos porosos nanoestruturados têm recebido grande atenção ultimamente devido a algumas propriedades que estes apresentam como, resistência mecânica e térmica e elevada condutividade elétrica⁵³, o que os possibilita serem aplicados em diversas áreas, em particular, na área eletroquímica, como material para fabricação de eletrodos⁵⁴ (baterias de íon-lítio, células a combustível, capacitores), supercapacitores para aplicações em telecomunicações^{55,56}, sensores e biossensores⁵⁷, como adsorventes, como suporte para catalisadores⁵⁴, etc.

Vários métodos para se preparar carbonos porosos, vêm sendo reportados na literatura, dentre eles o mais comumente utilizado⁵⁴ é a síntese por moldagem, ou conhecida como ‘*template*’, utilizando-se materiais do tipo das zeólitas, sílica mesoporosa, argilas como montmorillonita, etc⁵⁵. As principais etapas envolvidas neste tipo de síntese são: preparação de um molde inorgânico, introdução de um precursor de carbono, polimerização deste precursor, carbonização do material orgânico e remoção do molde inorgânico⁵³.

Os Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL) têm sido utilizados para a preparação de carbonos porosos ou nanocompósitos de carbono, por meio da intercalação de precursores de carbono, como sacarose, polímeros ou monômeros, como acetato de vinilo, acrilonitrilo, vinil benzeno sulfonato, etc⁵⁴.

Como por exemplo, Prevot e colaboradores⁵⁴ descreveram uma metodologia para a preparação destes compósitos e/ou réplicas de carbono, em que o HDL com 4-vinil benzeno sulfonato (VBS) foi preparado por calcinação-regeneração utilizando-se como precursor um compósito entre um HDL de Mg-Al-CO₃ e poliestireno (PS), numa segunda etapa este material foi submetido a um tratamento térmico para a oxidação do monômero (polimerização) em ar a 220 °C. Este material foi então submetido a um outro tratamento térmico à temperatura mais alta, de 600 °C, em atmosfera de N₂, sendo subsequentemente desmineralizado por lavagem com ácido clorídrico 1M. Na *Figura 6* está representado um esquema de preparação da réplica de carbono.

Os materiais obtidos por esta metodologia de preparação, após a lavagem ácida apresentaram um caráter poroso, com a estrutura com grande quantidade de micro e mesoporos^{54,58}, como pode ser observado pelas micrografias apresentadas na *Figura 7 (a-c)*, e na *Figura 7 (d)* está representado um esquema simplificado do método de preparação.

Figura 6: Representação esquemática experimental da preparação da réplica de carbono (*Adaptada da Referência 54*).

Figura 7: Microscopia Eletrônica de Varredura para: a) compósito Mg-Al-VBS HDL; b) Mg-Al-VBS-HDL após carbonização; e c) Mg-Al-VBS HDL após lavagem ácida; d) Representação Esquemática do processo de carbonização de HDL (*Adaptada das Referências 54,58,59*).

Stimpfling e Leroux⁵⁵ prepararam uma réplica de carbono derivada de um HDL intercalado com ácido 3-sulfopropilmetaacrílico (SPMA), o material apresentou uma elevada área superficial ($1650 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Estes autores⁵⁶ demonstraram ainda que estas réplicas de carbono derivadas de HDL possuem características eletroquímicas que os tornam capazes de serem aplicados como supercapacitores.

Santos e colaboradores⁶⁰ preparam uma réplica de carbono, derivada de HDL, utilizando como precursor um HDL intercalado com o ânion VBS, e este material foi testado quanto à sua capacidade de remoção de surfactantes aniônicos e catiônicos, como por exemplo, dodecil benzeno sulfonato (SDBS) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) respectivamente. Os estudos demonstraram uma maior adsorção do surfactante aniônico, devido a superfície positiva da réplica. Este tipo de material tem sido reportado para aplicação, por exemplo, como adsorventes para descontaminação de águas residuais⁶¹.

1.3- Compósitos de HDL/grafeno

De maneira geral, existem vários métodos de preparação de HDL/nanocompósitos de carbonos; a interação entre os materiais se dá de forma eletrostática através da interação entre cargas positivas dos HDL e cargas negativas dos materiais de carbono⁵⁸. O método mais simples é através da mistura direta do material de carbono e de uma dispersão de HDL, outro método que pode ser utilizado para a preparação é o método de 'layer-by-layer', ou conhecido como '*auto-montagem*', através de deposições, passo a passo, de filmes finos, visando a obtenção de materiais com estrutura bem definida, com composição controlada e dimensões nanométricas⁵⁸. Também é possível preparar nanocompósitos entre HDL e materiais de carbono por coprecipitação, isso é, precipitando os dois cátions juntamente com uma dispersão do material de carbono, obtendo-se o material de carbono intercalado entre as lamelas, ou adsorvido na superfície⁵⁸, dentre tantos outros métodos existentes na literatura.

Dentre os compostos de carbono, o Grafeno é um material que apresenta ótimas propriedades físico-químicas, devido a elétrons π presentes na sua estrutura eletrônica e hibridização sp^2 do carbono⁵⁸. Entre estas propriedades destacam-se: alta condutividade elétrica e propriedades eletrônicas; alta mobilidade de carga ($250000 \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a temperatura ambiente), alta condutividade térmica ($5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), além de elevada área superficial específica (acima de $2630 \text{ m}^2/\text{g}^{-1}$)^{62,63}. Devido a estas propriedades, o

grafeno possui interesse para diversas aplicações em dispositivos eletrônicos e de energia como: em filmes transparentes condutores⁵⁸, em sensores, em células a combustível, em supercapacitores, etc⁶². O Grafeno pode ser ainda funcionalizado e assim ser utilizados em catálise, em adsorção, etc⁵⁸. Geralmente o óxido de grafeno é empregado como um precursor de grafeno, devido à sua melhor solubilidade em água⁶³.

É possível a combinação entre HDL e grafeno, de diferentes maneiras, mais especificamente, na *Figura 8* estão demonstradas algumas estratégias para preparação de compósitos de HDL/grafeno.

Figura 8: Preparação de compósitos HDL/grafeno: a) intercalação de camadas de grafeno em HDL, b) crescimento *in situ* de HDL paralelo às camadas de grafeno, c) crescimento *in situ* de HDL verticalmente às camadas de grafeno, d) crescimento *in situ* de grafeno na superfície dos HDL (*Adaptada da Referência 58*).

Como exemplo da utilização da combinação entre HDL e grafeno, Garcia-Gallastegui e colaboradores⁶³, reportaram a preparação de compósitos de HDL/ óxido de grafeno utilizando-se o método de coprecipitação, para serem aplicados como materiais adsorventes de CO₂, com a finalidade de melhorar a capacidade de adsorção, em relação à obtida quando se utiliza somente HDL. Os compósitos foram preparados variando-se a porcentagem em massa de óxido de grafeno, para avaliar qual material preparado apresentaria maior capacidade de adsorção de CO₂. Os autores demonstraram neste estudo, que a capacidade de adsorção do HDL aumentou cerca de 62% quando utilizado o compósito com 7% em massa de óxido de grafeno como suporte. Os compósitos preparados demonstram que podem ser utilizados para fins de aplicação

comercial. Na *Figura 9*, está representado um esquema do compósito HDL/óxido de grafeno utilizado neste estudo.

Figura 9: Representação esquemática do compósito HDL/óxido de grafeno (Adaptada da Referência 63).

Combinando as propriedades de adsorção e catálise dos HDL com as propriedades de condutividade elétrica do grafeno é possível melhorar o transporte de carga dos filmes preparados entre estes materiais⁶². Materiais híbridos derivados de HDL/grafeno podem apresentar propriedades melhoradas em relação as de suas partes individuais. Entre estas, a melhoria da condutividade elétrica, o aumento da área superficial ativa, sendo considerados bons suportes para a imobilização de espécies⁶⁴, o que os tornam atraentes para utilização, na área de eletroquímica, para a preparação de biossensores^{62,64}. Exemplos da utilização de compósitos entre HDL/grafeno na área eletroquímica para a preparação de sensores e biossensores serão descritos na seção 1.6.1.2

1.4- Sensores e Biossensores

Um sensor é um dispositivo que transforma uma interação químico/físico em um tipo de sinal analítico. Os sensores eletroquímicos vem ganhando destaque ultimamente por serem relativamente fáceis de se construir, por apresentarem alta sensibilidade e baixo custo⁶⁵. Um tipo de sensor que utiliza material biológico ou derivado, é denominado biossensor⁶⁶. Um biossensor possui três partes principais: um elemento de reconhecimento biológico, que pode ser enzimas, anticorpos, microorganismos, etc;. A

segunda parte é um transdutor que converte esse bio reconhecimento em um sinal mensurável, podendo ser, eletroquímico, óptico, térmico, piezelétrico, magnético, etc;. A terceira parte do sistema tem a função de processar o sinal⁶⁶. A *Figura 10* mostra um esquema dos elementos constituintes de um biossensor.

Figura 10: Representação Esquemática de um biossensor (*Adaptada da Referência 67*).

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados de acordo com o seu princípio operacional em: *amperométricos*, em que o sinal medido é a corrente; *potenciométricos*, onde é medido o potencial; *condutimétricos*, onde é medida alguma alteração nas propriedades de condução do meio; e ainda outras técnicas que medem impedância, etc.⁶⁷⁻⁶⁹. Na *Figura 11* está representado um esquema de um biossensor com um transdutor eletroquímico.

Figura 11: Representação esquemática de um biossensor eletroquímico (Adaptada da Referência 70).

Alguns parâmetros importantes que são avaliados na caracterização de um biossensor são a sensibilidade, seletividade, estabilidade a longo prazo, tempo de resposta e reprodutibilidade^{69,71}.

Os biossensores estão sendo extensivamente estudados atualmente para aplicações na determinação de analitos com interesse em diversas áreas como: em diagnósticos médicos, na área ambiental, no controle de qualidade de alimentos, etc. Os biossensores enzimáticos são utilizados em pesquisas e na área comercial devido ao seu baixo custo, simplicidade para o uso e possibilidade de construção de dispositivos portáteis⁷².

1.5- A Enzima Glicose Oxidase (GOx)

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores, convertendo substratos em produtos, algumas enzimas possuem propriedades de oxidação/redução, recebendo e doando elétrons, e são conhecidas como enzimas redox. Desta forma, estas enzimas podem ser usadas na preparação de biossensores eletroquímicos enzimáticos, e uma das enzimas mais conhecidas e utilizadas para este fim é a Glicose Oxidase (GOx)⁶⁷.

A enzima Glicose Oxidase (GOx), β -D-glicose: oxigênio 1-oxidoreductase, é uma flavoproteína, que catalisa a oxidação de β -D-glicose à ácido glicônico utilizando oxigênio (O_2) como aceptor de elétrons e com a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)⁷³.

A GOx é uma proteína dimérica, de aproximadamente 160 kDa e que possui ligada à sua estrutura um cofator, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), por monômero de proteína⁷⁴, como representado na *Figura 12*.

A enzima glicose oxidase possui aplicações nas áreas química, farmacêutica, de alimentos, na indústria têxtil, para a preparação de biocélulas à combustível, e também na área clínica para a determinação de glicose em pessoas com diabetes⁷³, além de continuar sendo extensivamente estudada como modelo de enzima, devido a sua estabilidade bioquímica, atividade bioeletrocatalítica e custo relativamente baixo^{73,75}.

Figura 12: Representação da estrutura cristalina da enzima Glicose Oxidase de *Aspergillus niger*, destacando o cofator FAD (Adaptada da Referência 76).

O grupo FAD presente na estrutura da GOx é um centro redox ativo, porém o acesso à esse centro redox não é tão facilitado, o que com que faz com que sua eletroquímica direta seja difícil, pois a transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima (GOx) e um eletrodo pode ocorrer de forma incompleta ou mesmo muito lenta⁷⁷.

O mecanismo envolvido é explicado pelas seguintes reações⁷⁸, onde primeiramente a GOx catalisa a oxidação da glicose à gliconolactona que é hidrolisada não enzimaticamente à ácido glicônico, como mostrado na *Figura 13*. Em seguida o cofator FAD ligado à enzima GOx é reduzido à FADH₂, e a GOx é reoxidada utilizando oxigênio e produzindo peróxido de hidrogênio⁷³:

Figura 13: Representação das reações da GOx⁷³.

Essa transferência de elétrons pode ser facilitada utilizando-se mediadores que são aceptores de elétrons⁷⁹. Assim compostos derivados de ferroceno têm sido amplamente empregados como mediadores para a glicose oxidase^{74,79}. A reação que ocorre entre GOx e o mediador ferroceno pode ser representada como no esquema abaixo⁸⁰:

Na *Figura 14* está representado os esquemas de transferência de elétrons que podem ocorrer entre a enzima e o eletrodo, que foram discutidos acima. Na *Figura 14 (a)* está representado um esquema da transferência de elétrons mediada (TEM), onde moléculas doam ou recebem elétrons para o sítio ativo da enzima e esta os transferem para o eletrodo, mais especificamente neste caso representando a transferência de elétrons entre ânions ferroceno para a enzima GOx. Na *Figura 14 (b)* está representada a transferência de elétrons direta (TED), onde ocorre a transferência direta de elétrons da enzima para o eletrodo, neste caso a transferência de elétrons se dá entre a enzima Lacase e o eletrodo⁸¹.

Figura 14: Representação esquemática de: a) TEM; e b) TED (*Adaptada da Referência 81*).

1.5.1-Biossensores de Glicose

São utilizadas três estratégias para preparação de biossensores eletroquímicos de glicose, sendo que a detecção pode se dar através da medida do consumo de oxigênio; da medida da quantidade de peróxido de hidrogênio produzido; ou utilizando um mediador que transfira elétrons da GOx para o eletrodo⁶⁶, e os biossensores de glicose, são classificados em três tipos:

(i) Eletrodos de 1ª geração: a detecção de glicose ocorre por meio medida da quantidade de oxigênio consumida ou de peróxido de hidrogênio formado. O peróxido de hidrogênio gerado na reação enzimática é eletro-oxidado em um eletrodo de Platina (Pt) a altos potenciais em cerca de 0,6-0,7 V, conforme a seguinte reação: $H_2O_2 \rightarrow 2H^+ + O_2 + 2e^-$ ^{66,72}. Pode ocorrer uma falsa resposta, quando são utilizadas amostras reais, devido à possível oxidação, nestes altos potenciais, de outras espécies presentes no meio⁷².

(ii) Eletrodos de 2ª geração: substituição do acceptor de elétrons, oxigênio, por mediadores redox que transportam elétrons da enzima para o eletrodo, exemplos: ferrocenos e derivados, ferrocianetos, azul de metileno, metil viologênio, etc.⁶⁶, de acordo com as seguintes reações⁸²:

Nestes casos, os mediadores atuam utilizando baixos potenciais. No caso da enzima GOx, pode ser utilizado o mediador ferroceno (Fc), em potenciais perto de 0,4V, que podem contornar os problemas citados anteriormente nos eletrodos de primeira geração⁷².

(iii) Eletrodos de 3ª geração: transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo, evitando a utilização de mediadores que podem ser tóxicos ou erros devido à variações de oxigênio em amostras reais^{66,83}. Neste caso tem-se a vantagem de atuar em potenciais menores ainda, perto do potencial redox da enzima, sendo assim o elétron é transferido da glicose para o eletrodo através do sítio ativo da enzima. Porém este tunelamento de elétrons diretamente do sítio ativo da GOx é lento, devido a este sítio ativo estar localizado profundamente no interior da enzima, a cerca de uma distância de 13-15 Å abaixo do contato com a superfície do eletrodo⁷².

Na *Figura 15* está representado um diagrama esquemático dos três tipos de biossensores de glicose.

Figura 15: Representação Esquemática dos tipos de biossensores de glicose (Adaptada da Referência 84).

1.5.2- Métodos de Imobilização de Enzimas

A imobilização de enzimas é uma peça chave na preparação de biossensores, pois a enzima em sua forma livre pode se tornar inativa⁸⁵. As técnicas mais utilizadas para imobilização de enzimas são: adsorção física; adsorção química por ligação covalente; reticulação por ligação cruzada ou “*cross-linking*”; aprisionamento; encapsulamento; automontagem; etc.⁸⁶, como mostrado na Figura 16.

A *adsorção* é o método mais fácil para imobilização de enzimas, e pode ser classificada em física ou química. Na adsorção física o suporte e a enzima são mantidos unidos por interações de Van de Waals ou por interações eletrostáticas. Na adsorção química a interação se dá através da formação de uma ligação covalente^{85,87}. No método de *aprisionamento* ou “*entrapment*” a enzima é adicionada a um polímero em forma de gel, formando uma rede⁸⁷. No método de *reticulação*, ou conhecido como “*cross-linking*”, é utilizado um agente bifuncional, geralmente é empregado o glutaraldeído, que forma uma forte ligação covalente com grupos funcionais específicos da enzima, é empregado geralmente em combinação com métodos de adsorção^{85,87}. Há também a possibilidade de imobilização por *encapsulamento* ou *micro encapsulamento* da enzima

em uma membrana sólida⁸⁵. E ainda, há a possibilidade de formação de filmes *auto-montados*, como por exemplo, filmes Langmuir-Blodgett, filmes layer-by-layer⁸⁵.

Figura 16: Métodos de Imobilização de Enzimas (*Adaptada da Referência 85*).

1.6- Materiais híbridos entre HDL/biomoléculas

Devido à algumas propriedades que os HDL apresentam como por exemplo, sua alta capacidade de troca iônica, flexibilidade da composição química, elevada área superficial, propriedades de inchamento, solubilidade dependente do pH, caráter hidrofílico, etc, estes compostos se caracterizam como materiais atrativos para a imobilização de biomoléculas, proporcionando sua estabilização, sem se ligar covalentemente a enzima⁸⁸⁻⁹⁰. Devido à carga positiva das lamelas, os HDL podem interagir com diversas biomoléculas como por exemplo, DNA, vitaminas, nucleotídeos, enzimas, etc⁹⁰.

Os biohíbridos formados entre as enzimas e os HDL e seus derivados, interagem por ligações de van der Waals e interações eletrostáticas, pois em pH acima do pI da enzima, existem interações eletrostáticas entre a enzima (carregada negativamente) e a superfície positiva dos HDL. Também, devido ao grande tamanho das enzimas, elas ficam localizadas na superfície externa dos HDL⁸⁶.

Na *Figura 17* está representado um esquema dos métodos de preparação de biohíbridos entre HDL e enzimas. Para isto há várias possibilidades como: a utilização de um HDL precursor ou ainda um HDL intercalado com um polímero para adsorver enzimas; utilizar um HDL exfoliado que se reempilha na presença de enzimas; através da calcinação/reconstrução dos óxidos mistos de um HDL, na presença de uma solução da enzima; ou ainda utilizar o método de coprecipitação, em que a formação do biohíbrido ocorre com precipitação do HDL juntamente com a enzima. Neste último caso, para a formação de um HDL a precipitação ocorre por volta de pH 8-11, sendo necessário verificar quais enzimas tem pH ótimo para serem utilizadas neste método. Geralmente são utilizadas as enzimas urease, fosfatase alcalina, tripsina, hemoglobina, que suportam pHs mais elevados⁸⁶.

Figura 17: Métodos de preparação de biohíbridos entre HDL e enzimas
(Adaptada da Referência 86).

1.6.1- Utilização dos HDL e derivados/biomoléculas na área eletroquímica como biossensores

Os HDL possuem também propriedades eletroanalíticas, como por exemplo, capacidade de acumular analitos, imobilizar mediadores redox⁶⁵ ou biomoléculas ou ainda biocatalisadores como as enzimas⁸⁶. Devido a isso, os eletrodos modificados com HDL têm sido estudados e aplicados no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos^{65,91}, pois os materiais híbridos formados podem apresentar performance eletroquímica melhorada, em comparação com outros sistemas utilizados⁶⁴.

Desta forma, os HDL e derivados além de funcionarem como uma matriz de proteção ou preservação da biomolécula⁹⁰, exibem um efeito sinérgico, pela combinação de ambas as partes exibirem propriedades específicas como, por exemplo: propriedades ácido-base ou redox, magnéticas, condutividade eletrônica, etc⁹².

Para a preparação de biossensores é necessário fazer a conexão entre a enzima e o transdutor, mantendo a atividade da enzima⁸⁷, sem alterar seu sítio ativo, ou mudar drasticamente sua geometria, imobilizando a enzima na superfície do eletrodo⁷⁰. A preparação de eletrodos modificados para a construção dos biossensores é feita com a deposição de filmes sobre o eletrodo de trabalho, por métodos de imobilização já descritos anteriormente na seção 1.5.2, sendo que os mais empregados para este caso são os métodos: layer-by-layer ou automontagem, através da preparação de um filme eletropolimerizado, por adsorção, aprisionamento em uma membrana, inclusão em um gel, incorporação em uma pasta de carbono, por ligação covalente, etc^{72,86,70}. Na *Figura 18* estão representados alguns métodos de imobilização de enzimas na superfície de eletrodos.

Figura 18: Métodos mais comuns de imobilização de enzimas na superfície do eletrodo (*Adaptada da Referência 70*).

Na maioria das vezes, os eletrodos modificados com HDL e a enzima são preparados pela adsorção de uma mistura coloidal do HDL/enzima na superfície do eletrodo^{89,93}, por possibilitar uma deposição de uma quantidade conhecida da enzima⁸⁹, e por ser de fácil preparação. Mais especificamente, é comumente empregada a técnica de evaporação do solvente, onde uma suspensão de HDL ou uma mistura de HDL/enzima é depositada no eletrodo e depois seco à temperatura ambiente ou a 4 °C, sendo utilizado glutaraldeído, um agente “*cross-linking*”, ou que promove a reticulação, para prevenir a dessorção da enzima^{72,86}.

Um dos desafios encontrados na preparação destes biossensores enzimáticos, está relacionado com a imobilização eficaz da enzima, para evitar perdas da mesma durante os ensaios, mantendo sua atividade biológica e com orientação adequada da mesma, para que o analito atinja seu sítio ativo⁷². A enzima GOx, por exemplo, pode sofrer perda de atividade devido a mudanças estruturais durante a sua imobilização na superfície dos eletrodos, daí a importância do estudo de novos materiais, que sirvam como matrizes de imobilização^{77,94}, para explorar as características eletroquímicas da GOx⁷⁷.

As pesquisas, nos últimos anos, estão focadas, então, em encontrar materiais que sirvam de matriz de imobilização para estas biomoléculas, que permitam atingir estas características desejadas, que mantenham sua estrutura secundária, preservando assim a atividade da enzima⁷². Os nanomateriais possuem algumas características que propiciam um microambiente ótimo para a imobilização destas biomoléculas⁹⁴. Alguns materiais

estão sendo utilizados para esta finalidade como: filmes poliméricos⁷⁵; nanotubos de carbono⁹⁵; semicondutores⁹⁶; carbono mesoporoso–Au⁹⁷; grafeno/nanotubos/ZnO⁷⁸; nanofolhas de grafite/ZnO⁹⁸, fulerenos/quitosana⁹⁹, etc, podem ser utilizados para facilitar a transferência de elétrons do eletrodo para GOx^{75,77}.

1.6.1.1- Exemplos da utilização de HDL e derivados na área eletroquímica para a preparação de sensores e biossensores

Na literatura encontram-se alguns exemplos de aplicações de HDL na preparação de sensores e biossensores para determinação de glicose^{100,101}, etanol¹⁰², uréia¹⁰³, sensor de pH¹⁰⁴, para detecção de Cd²⁺¹⁰⁵, H₂O₂¹⁰⁶, dentre vários outros. Existem também estudos com compósitos e/ou réplicas de carbono a partir de HDL para aplicações como baterias e supercapacitores^{54–56,107}.

Moust e colaboradores⁶⁵ vêm demonstrando o emprego de materiais inorgânicos, como argilas catiônicas e aniônicas no desenvolvimento destes dispositivos, devido à algumas características como inércia química, biocompatibilidade, estabilidade física e química e custo relativamente baixo⁷².

Como por exemplo⁷², um HDL de Mg/Al¹⁰⁸ intercalado com hexacianoferrato (III) foi utilizado para a preparação de um eletrodo modificado e mostrou-se seletivo para detecção de H₂O₂, indicando que este sistema pode ser utilizado para mimetizar enzimas que são utilizadas para esta finalidade. Além disto, HDL calcinado contendo Co¹⁰⁶ foram utilizados para preparação de eletrodo modificado que exibiu alta atividade eletrocatalítica para a redução de H₂O₂, mostrando-se altamente sensível e eficiente para detecções de bebidas aromatizadas.

Outros estudos realizados utilizando híbridos entre HDL e enzimas, como por exemplo, o estudo da eletroquímica direta da Hemoglobina (Hb) foi realizado por Li e colaboradores¹⁰⁹, que imobilizaram a biomolécula em um eletrodo de carbono vítreo, modificado com HDL de Zn-Al funcionalizado com dodecil sulfato de sódio (SDS). O eletrodo modificado se mostrou eficiente para a eletrocatalise de peróxido de hidrogênio⁷².

1.6.1.2- Exemplos de Biossensores e Sensores entre compósitos de HDL/ Grafeno

A utilização de HDL com grafeno para imobilização de biomoléculas e utilização na área eletroquímica já vem sendo reportada na literatura. Por exemplo, Sun e colaboradores⁹⁴ prepararam um biossensor constituído de um compósito de um HDL de Mg-Al-Cl com grafeno, utilizado para imobilizar a Hemoglobina em um eletrodo. Os autores demonstraram que foi possível realizar a eletroquímica direta no eletrodo modificado com a Hemoglobina, caracterizada pelo par de picos redox bem definido que a enzima apresenta. O biossensor preparado apresentou boa biocompatibilidade e boa resposta eletrocatalítica para a redução do ácido tricloro acético, demonstrando que o compósito de HDL/Grafeno mostrou-se eficaz para a preparação de biossensores de terceira geração⁹⁴.

Wang e colaboradores⁶² reportaram a utilização de um compósito de HDL de Zn-Al com grafeno para a preparação de um eletrodo de carbono vítreo modificado, com a finalidade de melhorar as propriedades de transporte de carga no filme do eletrodo. Este sensor preparado foi utilizado para detecção de dopamina, mostrando alta atividade eletrocatalítica para sua determinação, inclusive na presença de alguns interferentes, demonstrando que o método desenvolvido pode ser aplicado para detecção de dopamina inclusive em amostras reais⁶².

1.6.1.3- Exemplos de Biossensores entre HDL e a enzima GOx

Os HDL e seus derivados têm sido utilizados para preparar eletrodos modificados com a enzima GOx. Como por exemplo:

Shan e colaboradores⁸⁹ reportaram a preparação de um biossensor amperométrico utilizando o HDL de Zn-Al-Cl para imobilizar a enzima GOx, por adsorção, através da formação de um gel entre eles. O ensaio eletroquímico foi realizado aplicando-se um potencial de 0,6 V medindo o H₂O₂ gerado enzimaticamente.

Em outro trabalho, a enzima GOx, também por adsorção, foi imobilizada em HDL de Zn-Cr-Cl⁹³ sendo os materiais obtidos utilizados na preparação de biossensores de glicose.

Shi e colaboradores¹¹⁰ utilizaram um HDL com o biopolímero quitosana para a imobilização da GOx e preparação de eletrodos modificados, sendo o estudo eletroquímico realizado aplicando-se um potencial de 0,6 V. Os autores demonstraram

que o filme de HDL/quitosona/GOx aumentou a biocompatibilidade e a adesão do filme no eletrodo, melhorando assim os parâmetros analíticos do biossensor, em comparação com outros biossensores similares apresentados na literatura.

Ainda, Ding e colaboradores¹¹¹ prepararam um biossensor de glicose, com detecção a 0,6 V, utilizando um HDL e um biopolímero de alginato, juntamente com a enzima GOx, e assim como no exemplo anterior, a combinação do biopolímero com o HDL também apresentou características melhoradas em comparação com as de seus precursores separados.

Xu e colaboradores¹¹² reportaram a preparação de um eletrodo de carbono vítreo modificado com um HDL de $\text{Ni}^{2+}/\text{MgFe}$, quitosana e GOx, utilizado para construção de biossensor amperométrico de glicose. Neste caso, o ensaio foi realizado utilizando-se o mediador Ferroceno Ácido Carboxílico em solução. O biossensor preparado demonstrou boa resposta, reprodutibilidade e estabilidade à longo prazo, podendo ser aplicado para amostras reais.

Outros autores¹¹³⁻¹¹⁶ reportaram a preparação de eletrodos modificados com HDL de Ni-Al que foram eletroquimicamente depositados em eletrodos de Pt junto com a enzima GOx, para a preparação de biossensores de glicose. O biossensor amperométrico preparado por Scavetta e colaboradores¹¹³ mostrou-se eficiente para a determinação de glicose em sucos de frutas, que continha o interferente ácido ascórbico, que normalmente é uma fonte de erro presente em biossensores de glicose.

Os HDL também podem ser utilizados para imobilizar mediadores redox para serem aplicados em processos eletroanalíticos. Estes mediadores atuam como catalisadores através da transferência de elétrons entre o analito alvo e a superfície do eletrodo⁶⁵. Estes mediadores podem estar situados no espaço interlamelar ou adsorvidos na superfície externa das lamelas, facilitando a transferência de elétrons entre a biomolécula e a superfície do eletrodo⁶⁵. Alguns exemplos descritos na literatura de mediadores redox intercalados ou adsorvidos em HDL, para utilização na preparação de biossensores com a enzima GOx serão exemplificados a seguir:

Colombari e colaboradores¹¹⁷ reportaram a intercalação de derivados de ferroceno em HDL de Mg-Al para a preparação de biossensores de Glicose. Os autores utilizaram o método de coprecipitação para preparar os HDL de Mg-Al-Fc-COOH e Mg-Al-Fc-SO₃H e estes foram utilizados para imobilizar a enzima GOx em eletrodo de carbono vítreo. Os biossensores amperométricos obtidos apresentaram boa resposta e estabilidade.

Shan e colaboradores¹¹⁸ prepararam um biossensor amperométrico de glicose através da co-imobilização em um HDL de Zn-Al-Cl, do mediador ferroceno metanol (FcMeOH) e da enzima GOx em um eletrodo de Platina (Pt). Neste caso, o biossensor com o mediador apenas adsorvido na superfície externa do HDL, demonstrou eficiência na mediação da transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo, apresentando elevada sensibilidade.

Mousty e colaboradores¹¹⁹ reportaram a intercalação de derivados de ferroceno de cadeia longa, como o ferroceno-3-sulfopropil-carboxilato (FcPSO₃) e o ferroceno-1,1'-bis(3-sulfopropil) carboxilato (Fc(PSO₃)₂), em HDL de Zn-Cr. Estes HDL foram utilizados para preparação de eletrodos modificados, juntamente com a enzima GOx. O biossensor preparado com o HDL de Zn-Cr-FcPSO₃ mostrou-se eficiente na mediação de elétrons e apresentou elevada performance, já o eletrodo modificado com o HDL de Zn-Cr-Fc(PSO₃)₂ não apresentou sinal eletroquímico eficiente do ferroceno. Isto se deve, possivelmente, aos átomos de ferro não estarem totalmente disponíveis para o processo de oxidação/redução, devido a estrutura do derivado de ferroceno e a imobilização não terem permitido a difusão dos íons ferro.

Shan e colaboradores⁹³ reportaram a intercalação do mediador 2,2'-azinobis- 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) em HDL de Zn-Cr, para preparar um biossensor bienzimático através da co-imobilização das enzimas GOx e HRP (*Horseradish peroxidase*). O biossensor bienzimático mostrou sensibilidade para detecção de H₂O₂ e glicose.

Na *Tabela 3* está sumariado alguns exemplos de biossensores já apresentados na literatura utilizando HDL e a enzima GOx, com os métodos de imobilização que foram utilizados, bem como alguns parâmetros analíticos que foram obtidos. Todos estes biossensores descritos foram preparados utilizando-se o conceito de eletrodos de glicose de primeira e de segunda geração, como foi descrito na seção 1.5.1.

Tabela 3: Exemplos de biossensores enzimáticos de glicose entre HDL/GOx (Adaptada das Referências 86,120).

HDL	Tipo imobilização	Sensibilidade (mAc ⁻² mol ⁻¹ L)	Faixa linear (mol L ⁻¹)	Ref
Zn-Cr-Cl	Adsorção	19	-	93
Zn-Al-Cl	Adsorção	34,8	0,1x10 ⁻⁶ -1,2x10 ⁻²	89
		55	1x10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³	121
Zn-Al-Cl/quitosana	Adsorção	62,6	1x10 ⁻⁶ -3x10 ⁻³	110
Zn-Al-Cl/alginato	Adsorção	68,9	1,6x10 ⁻⁵ -2x10 ⁻³	111
Ni-Al-NO ₃	Deposição	6,5	4x10 ⁻⁴ -1x10 ⁻²	113
	eletroquímica	13-18	1x10 ⁻³ -1x10 ⁻²	114
		6,2	5x10 ⁻⁴ -1x10 ⁻²	115, 116
Zn-Al-Glut-GA	"chemical grafting"	0,21	1x10 ⁻⁴ -2,5x10 ⁻³	122
Mg-Al-FcSO ₃ H	Adsorção	2,1	-	117
Mg-Al-FcCO ₂ H	Adsorção	4,8	-	117
FcMeOH/Zn-Al-Cl	Adsorção	60	6,7x10 ⁻⁶ -3,86x10 ⁻⁴	118
Zn-Cr-FcPSO ₃	Adsorção	68	1x10 ⁻⁷ -2,5x10 ⁻⁵	119
HRP/Zn-Cr-ABTS	Adsorção	23	3,5x10 ⁻⁸ -8x10 ⁻⁶	93
Ni-Mg-Fe-quitosana	Adsorção	-	1x10 ⁻³ -2x10 ⁻²	112

Utilizando-se o conceito de preparação de biossensores de glicose de terceira geração, Zhang e colaboradores⁷⁷, reportaram a utilização de um HDL nanoestruturado na preparação de eletrodos modificados para a utilização na eletroquímica direta da enzima GOx. Foram preparados eletrodos de carbono vítreo (ECV) modificados utilizando-se HDL exfoliado ou HDL sem exfoliar e a enzima GOx, realizando os estudos de voltametria cíclica que mostraram que o HDL exfoliado promove uma melhoria na eletroquímica direta da enzima GOx, evidenciada pelo par de picos em aproximadamente -0,40 V, atribuído ao grupo FAD presente na estrutura da enzima, como pode ser visto na *Figura 19*, mostrando as características eletroquímicas deste estudo.

Figura 19: Voltamograma Cíclico para: a) GOx/ECV; b) GOx/HDL/ECV; c)GOx/HDL exfoliado/ECV (*Adaptada da Referência 77*).

2. Objetivos

2.Objetivos

O objetivo geral do trabalho é a preparação e caracterização de materiais como HDL, Compósitos e/ou Réplicas de Carbono derivadas de HDL ou compósitos de HDL/óxido de grafeno, como suporte da enzima Glicose Oxidase, visando suas potenciais aplicações como biossensores de glicose.

Mais especificamente:

*i)*Preparação de HDL de Mg-Al e Zn-Al com proporção entre cátions de 2:1 intercalados com o ânion carbonato preparados pelo método de coprecipitação a pH variável;

*ii)*Preparação de Compósitos e/ou Réplicas de Carbono derivado de um HDL precursor intercalado com o ânion 4-vinil benzeno sulfonato (VBS), preparado por coprecipitação a pH constante;

*iii)*Preparação de Compósitos de HDL/óxido de grafeno, pelo método de coprecipitação;

*iv)*Caracterização dos materiais obtidos quanto à estrutura cristalina, estabilidade térmica, morfologia, tamanho de partícula, utilizando um conjunto de técnicas de análise;

*v)*Preparação de eletrodos modificados utilizando os materiais descritos e a enzima Glicose Oxidase;

*vi)*Estudo das propriedades eletroquímicas da enzima Glicose Oxidase imobilizada em eletrodos com HDL e derivados, bem como avaliar o potencial destes eletrodos modificados para aplicação como biossensor de glicose.

3. Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1- Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram utilizados sem purificação prévia. Foi utilizada água destilada na maioria dos experimentos ou quando necessário para o preparo das soluções, foi utilizada água deionizada através do sistema Millipore MilliQ®, e/ou descarbonatada, através do aquecimento até ebulição e resfriada com borbulhamento de gás inerte (N₂).

Foram utilizados os seguintes reagentes:

Nitrato de Magnésio hexahidratado-Mg(NO₃)₂.6H₂O (J.T Baker, 100%); Nitrato de Zinco hexahidratado-Zn(NO₃)₂.6H₂O (Sigma-Aldrich, 98%); Nitrato de Alumínio nonahidratado-Al(NO₃)₃.9H₂O (J.T Baker, 100%); Vinil Benzeno Sulfonato de Sódio-C₈H₇NaO₃S (Aldrich, ≥90%); Óxido de Grafeno-C_xO_yH_z (*sheets*, Sigma-Aldrich); Carbonato de Sódio-Na₂CO₃ (Vetec, ≥99,5%); Hidróxido de Sódio-NaOH (Dinâmica, ≥97%); D-(+)-glicose-C₆H₁₂O₆ (Sigma-Aldrich≥99,5%); glicose oxidase tipo VII (*Aspergillus Níger*) (Sigma-Aldrich); tris(hidroximetil)amino-metano- NH₂C(CH₂OH)₃ (Sigma-Aldrich≥99,8%); Grafite em pó (Fisher Scientific, grau 38); Glutaraldeído (25%).

3.2- Métodos de preparação dos materiais

3.2.1-Preparação dos Hidróxidos Duplos Lamelares (HDL)

Para a síntese dos HDL de Mg-Al-CO₃ e Zn-Al- CO₃ foi empregado o método de coprecipitação a pH variável¹²³, que consiste em adicionar uma solução que contem os cátions divalentes e trivalentes sobre uma solução do ânion que se deseja intercalar⁷. Para a preparação dos HDL, com razão entre os cátions de M(II) / M(III) de 2:1, uma solução contendo 0,25 mol de nitrato de magnésio ou nitrato de zinco e 0,125 mol de nitrato de alumínio foi dissolvida em 175 mL de água deionizada e adicionada a 250 mL de uma solução contendo 0,875 mol de NaOH e 0,25 mol de Na₂CO₃. O pH final da precipitação nos casos dos dois HDL ficou em torno de 11. O precipitado obtido foi

lavado até pH neutro, filtrado e seco, e os sólidos obtidos foram caracterizados pelas técnicas que serão descritas na seção 3.4.

3.2.2-Preparação de Compósitos e/ou Réplicas de carbono derivadas de HDL

Para a preparação do HDL precursor, de Mg-Al intercalado com o ânion 4-vinil benzeno sulfonato (VBS), utilizado para a síntese da réplica de carbono derivada de HDL, foi utilizado o método de coprecipitação a pH constante. Para isto, foram adicionados à solução do ânion, concomitantemente uma solução contendo os dois cátions e uma solução de NaOH, para que o pH pudesse ser controlado^{7,16}. Neste método uma solução dos cátions contendo 0,0125 mol de nitrato de magnésio e 0,00625 mol de nitrato de alumínio, na razão molar de M(II)/M(III)(2/1), foi dissolvida em 20 mL de água deionizada e foi adicionada à solução que continha 0,0125 mol do ânion 4-vinil benzeno sulfonato, com uma velocidade de gotejamento constante e com controle do pH entre 10-11¹⁶, pela adição concomitante de uma solução de NaOH 1 mol L⁻¹. A suspensão obtida, foi lavada com água destilada e filtrada até pH ~7 e o sólido obtido foi seco a vácuo e triturado até a obtenção de um pó fino.

Para a obtenção dos compósitos e/ou réplicas de carbono, foi utilizada a metodologia adaptada descrita por Prevot e colaboradores⁵⁴ e por dos Santos e colaboradores⁶⁰. Para isto, o HDL de VBS preparado, conforme descrito anteriormente, foi submetido a um tratamento térmico para a oxidação do monômero (polimerização), por 2 h em ar a 200 °C, este material foi denominado de Mg-Al-VBS calcinado. Após isto o material foi submetido a um outro tratamento térmico à temperatura mais alta, de 600 °C, em atmosfera de N₂ por 8 h, este material foi denominado de Mg-Al-VBS carbonizado, que foi então desmineralizado por lavagem com ácido clorídrico 1 mol L⁻¹ por 72 h, sendo este material final denominado como Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado. Os materiais obtidos foram caracterizados pelas técnicas descritas na seção 3.4. Na *Figura 20* está representado um esquema da preparação da réplica de carbono.

Figura 20: Representação esquemática das etapas de preparação da réplica de carbono derivada de HDL (*Adaptada da Referência 54*).

3.2.3-Preparação de Compósitos de HDL/óxido de grafeno

Para a preparação do compósito entre HDL e óxido de grafeno, foi utilizado o método de coprecipitação a pH constante adaptado de Fu e colaboradores¹²⁴, em que foram adicionados, sobre uma suspensão do óxido de grafeno, uma solução dos cátions concomitantemente com uma solução de base NaOH, para que o pH pudesse ser controlado^{7,16}. Neste método uma solução contendo 0,002 mol de nitrato de magnésio e 0,001 mol de nitrato de zinco em 25 mL de água e na razão molar de MII/MIII(2/1), foi adicionada à suspensão que continha 0,0259 g do óxido de grafeno (previamente sonificado em 25 mL de água) a uma velocidade de gotejamento constante e com controle do pH entre 10-11¹⁶, pela adição concomitante de uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. A suspensão obtida, foi centrifugada, lavada com água destilada até pH ~7 e o sólido obtido foi seco em estufa e triturado até a obtenção de um pó fino e caracterizado pelas técnicas descritas na seção 3.4.

3.3- Experimentos de Voltametria Cíclica

Os experimentos de Voltametria Cíclica (VC) foram realizados em um equipamento descrito na seção 3.4.6.

Para a realização dos experimentos, foi utilizado como eletrólito de suporte uma solução tampão tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ pH 7, desaerada com Argônio na maioria dos experimentos, ou saturada com ar sintético ou O₂, quando necessário. Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos: um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar e todos os potenciais foram referenciados num eletrodo de Ag/AgCl/KCl_(sat), não levando em consideração o potencial de junção líquida. Como eletrodo de trabalho foram utilizados eletrodos de carbono vítreo (ECV) com área

geométrica $0,0314 \text{ cm}^2$. Eletrodos de Pasta de Carbono (EPC) foram preparados com eletrodos que possuíam uma cavidade (base de ouro ou de grafite).

Foram preparadas soluções de glicose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ utilizada na reação com a enzima GOx para construção das curvas analíticas. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

Foram realizados testes de sensibilidade dos eletrodos preparados. Quantidades conhecidas do analito de interesse, no caso glicose, foram adicionadas na célula eletroquímica juntamente com a solução tampão para determinação das respostas de corrente de pico da redução do O_2 utilizada para a construção de uma curva analítica em função de cada concentração de glicose adicionada.

Quando não estavam sendo utilizados, os eletrodos modificados, eram guardados em geladeira, em solução tampão tris-HCl pH=7, para posterior realização de testes de estabilidade.

3.3.1- Preparação de eletrodos modificados com Mg-Al- CO_3 /GOx e Zn-Al- CO_3 /GOx

A metodologia para preparação de eletrodos modificados foi baseada em alguns trabalhos anteriores^{125,126}.

3.3.1.1- Preparação de eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al- CO_3 /GOx

i) Metodologia 1

Foi preparado um eletrodo de carbono vítreo modificado com 5 μL de uma suspensão (2,0 mg/mL) do HDL de Mg-Al- CO_3 , 5 μL da enzima GOx (1mg/mL) e 2,5 μL de glutaraldeído (25%), um agente químico “*cross-linking*”, que ajuda a prevenir a perda da enzima imobilizada^{110,127}. A deposição de cada material foi realizada em três etapas, sendo que na primeira foi gotejado sobre o eletrodo a suspensão do HDL e este foi seco em estufa. Na segunda etapa foi depositado sobre este eletrodo modificado uma alíquota da solução da enzima e então este foi seco à temperatura ambiente. Por fim, na terceira etapa, uma alíquota da solução de glutaraldeído foi gotejada sobre este eletrodo, que foi seco em geladeira de um dia para o outro. Após a realização dos experimentos, o eletrodo modificado foi guardado em geladeira em solução tampão tris-HCl pH=7, para realização de testes de estabilidade do eletrodo.

ii) Metodologia 2

Foi preparado um outro eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al- CO_3 , enzima GOx e glutaraldeído, porém desta vez foi utilizada uma mistura de 50 μL da suspensão do HDL de Mg-Al- CO_3 , 50 μL da solução da enzima GOx e 10 μL da solução de glutaraldeído, e desta mistura resultante, gotejou-se uma alíquota de 10 μL na superfície do eletrodo de carbono vítreo, então este foi seco em geladeira, para posterior realização dos experimentos.

3.3.1.2- Preparação de eletrodos de Pasta de Carbono modificados com Mg-Al- CO_3 /GOx

Ainda para o HDL de Mg-Al- CO_3 , foi preparado um eletrodo de Pasta de Carbono modificado, utilizando uma mistura sólida de enzima GOx (5,2%) e grafite (94,8%); sendo adicionada a esta mistura 1,3 mg de Mg-Al- CO_3 e 0,5 μL de nujol.

3.3.1.3- Preparação de eletrodos de Pasta de Carbono modificados com Zn-Al- CO_3 /GOx

Para o HDL de Zn-Al- CO_3 , foi preparado um eletrodo de Pasta de Carbono utilizando a mistura sólida de 36 mg de grafite; 3,5 mg de Zn-Al- CO_3 e 0,43 mg da enzima GOx com 4 μL de nujol.

3.3.2- Preparação de eletrodos modificados com compósito de carbono derivado do HDL de Mg-Al-VBS e GOx

Foi preparado um eletrodo de Pasta de Carbono utilizando a mistura sólida de 4,6 mg do HDL de Mg-Al-VBS carbonizado; 0,47 mg de GOx e 0,5 μL de nujol. Um outro eletrodo de Pasta de Carbono foi preparado adicionando-se a esta mistura 9,7 mg de grafite, 0,5 μL de nujol e 0,5 μL de glutaraldeído (25%).

3.3.3- Preparação de eletrodos modificados com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno e GOx

Foi preparado um eletrodo de carbono vítreo modificado, no qual foi depositado pela ordem: 5 μL de uma suspensão (2,0 mg/mL) do composto de Mg-Al/óxido de grafeno, que foi seco em estufa; logo após secagem foi depositado sobre a superfície do eletrodo modificado 5 μL da enzima GOx (1 mg/mL), que foi então seco a temperatura ambiente. Por fim, foi depositada sobre a superfície do eletrodo uma última camada de 2,5 μL de glutaraldeído (25%), que foi seco em geladeira de um dia pro outro. Após a realização dos experimentos, o eletrodo foi guardado em geladeira em solução tampão pH=7, para a realização de testes de estabilidade.

3.4- Caracterização dos materiais e forma de análise dos resultados

3.4.1-Difração de raios X- método do pó

As análises por Difração de raios X no pó (DRXP) foram realizadas em um difratômetro “Siemens D 5005”, com uma fonte de cobre e um monocromador de grafite para a seleção da radiação $K\alpha_1$ do Cu, com comprimento de onda de 1,5406 Å. Utilizou-se uma velocidade de varredura de $0,02^\circ\text{s}^{-1}$ na faixa de ângulos de 2θ entre 2 e 70° ^{16,128}.

Por meio desta técnica é possível obter informações sobre a estrutura dos materiais preparados, sobre sua cristalinidade e assim determinar se o composto é lamelar, por meio da equação de Bragg^{7,128}, dada por:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta,$$

onde n representa a ordem de reflexão do pico, θ é o ângulo de Bragg e d_{hkl} representa o espaçamento basal. Desta forma é possível calcular a distância interlamelar por meio dos valores de 2θ , pois o espaçamento basal (d) para um HDL com simetria 3R é igual a espessura da lamela, que é considerada geralmente como sendo 4,8 Å¹²⁹, mais o tamanho do ânion interlamelar. Os cálculos do espaçamento basal (d) foram realizados com o auxílio do programa computacional Diffrac Plus Basic, versão 1.70, próprio para o aparelho de raios X descrito acima. A partir de valores de (d) calculados, e descontando-se o valor de espessura da lamela, de 4,8 Å, é possível a determinação do valor da distância entre as lamelas, ou espaço interlamelar. Então, utilizando-se programas computacionais como o “ACDLABS 11.0”[®], estimar como é o arranjo dos ânions no domínio interlamelar.

Um padrão de raios X no pó característico de um HDL exibe picos basais descritos como (00 l), caracterizando a sequência de empilhamento da lamela¹⁸, e que correspondem as sucessivas ordens do espaçamento basal c' , além dos picos não basais (01 l , 10 l e 11 l) que estão relacionados com a estrutura das lamelas e sua sequência no empilhamento. Na *Figura 21* está representado um difratograma de raios X típico de HDL.

Figura 21: Difratograma de raios X para HDL de Zn-Al-NO₃ (*Adaptada da Referência 18*).

Por meio da técnica de DRXP, ainda é possível identificar a pureza de fase do material, por comparação com padrões^{2,16}, sendo que a largura do pico e sua intensidade são informações importantes, para se relacionar a organização estrutural do material com os métodos de preparação.

3.4.2-Análise Termogravimétrica e Térmica Diferencial

As análises termogravimétricas e térmica diferencial (ATG/ATD) foram realizadas em um aparelho “SDT 2960 Simultaneous TGA-DTA”, acoplado a um analisador (microcomputador) com o programa “Thermal Analyst 2100”, ambos da “TA Instruments”, que permite a realização simultânea de ATG e ATD. A taxa de aquecimento utilizada foi de 10K.min⁻¹, com fluxo de ar sintético super seco (White

Martins, 80% N₂, 20% O₂, com pureza >99,997%), utilizando uma faixa de aquecimento desde a temperatura ambiente até 1273,15 K. A quantidade de amostra utilizada para a análise foi de aproximadamente 10 mg.

A decomposição térmica dos HDL é dependente de alguns parâmetros, como por exemplo, a natureza dos cátions, a natureza do ânion intercalado, e as condições experimentais de aquecimento (atmosfera inerte ou oxidante, por exemplo). Quando não há processos de oxidação ou redução, a decomposição ocorre em quatro etapas principais¹³⁰, como representado na *Figura 22*:

- i) remoção de água adsorvida externamente na superfície;
- ii) remoção de água interlamelar;
- iii) remoção de grupos hidroxilas das lamelas como vapor de água;
- iv) remoção do ânion intercalado.

Figura 22: Representação da decomposição térmica de um HDL de Mg-Al-CO₃ (Adaptada da Referência 130).

As etapas de decomposição dos materiais são identificadas por meio da análise termogravimétrica (ATG), pela qual também é possível avaliar a estabilidade térmica, a quantidade de água dos materiais preparados, através das curvas de variação de massa (%) em função da temperatura (°C) (curva sólida representada na *Figura 22*). Com o auxílio de curvas derivadas da análise termogravimétrica (DTG) (curva pontilhada representada na *Figura 22*) é possível determinar também as etapas de decomposição

dos materiais, cujos máximos e mínimos são utilizados para determinar os limites destas etapas, já que em alguns casos um processo de decomposição pode estar sobreposto a outro nas curvas de ATG. Ainda, pela análise térmica diferencial (ATD) é possível identificar processos exotérmicos e endotérmicos relacionados com as transformações físicas e químicas do material, permitindo avaliar o comportamento térmico dos materiais obtidos.

Na Figura 23 é proposto um modelo para a decomposição térmica do HDL de Mg-Al-CO₃¹³¹ em atmosfera inerte, onde (A) representa o HDL original Mg-Al-CO₃, (B) representa o primeiro estágio de decomposição de água adsorvida e de água de intercalação, fracamente ligadas, que vai da temperatura 70-190 °C. O estágio (C) representa a remoção de grupos OH⁻ ligados a Al(OH)-Mg na faixa de temperatura de 190-300 °C, já no estágio (D) há a remoção de grupos OH⁻ ligados principalmente à cátiões Mg²⁺, Mg(OH)-Mg na temperatura de 300-405 °C, e o último estágio (E) é referente a descarbonatação na temperatura entre 405-580 °C.

Figura 23: Representação da evolução térmica do HDL de Mg-Al-CO₃ em função da temperatura (*Adaptada da Referência 131*).

3.4.3-Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) foram registrados na região entre 400 a 4000 cm^{-1} . Para isto, foram preparadas pastilhas com 2,5% em peso do material em KBr, utilizando-se um equipamento “ABB Bomen MB 100”.

Esta técnica, não é a principal utilizada na identificação de HDL, mas pode ser utilizada para se obter informações sobre a natureza dos ânions, sobre os tipos de ligações formadas por esses ânions e as lamelas, através da identificação de algumas bandas características dos materiais. Por exemplo, a banda de absorção presente em aproximadamente 3500-3600 cm^{-1} é atribuída às vibrações dos grupos OH^- presentes na lamela, à água adsorvida e de hidratação; bandas na região entre 400-1000 cm^{-1} são devidas as vibrações cátion-oxigênio; e bandas de absorção dos ânions entre 1000-1800 cm^{-1} ¹⁶.

3.4.4-Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X

As análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas em um equipamento Zeiss mod. EVO 50 (origem Cambridge-UK). As amostras foram preparadas sobre suportes apropriados (alumínio) através da dispersão do pó sobre um adesivo condutor elétrico e pulverização com ouro por um período de 110 s em um equipamento Bal-TEC mod. SCD 050 (origem Liechtenstein). Através desta técnica é possível obter informações a respeito da morfologia dos HDL obtidos, como a formação dos cristalitos e a superposição das camadas¹⁸. Acoplada à esta técnica foi utilizada a Análise de Espectroscopia de Dispersão de Energia de Raios X (EDX), para a determinação semiquantitativa dos elementos presentes nos materiais.

3.4.5- Medidas de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

As medidas de tamanho de partícula dos materiais e do potencial eletrocinético, potencial Zeta, foram realizadas em um equipamento Zetasizer 3000 HSA da Malvern Instruments acoplado a um microcomputador. As medidas de tamanho de partícula foram realizadas utilizando-se a técnica de espalhamento de luz, utilizando-se

suspensões dos materiais em água, baseando-se na propriedade de que a intensidade da luz espalhada é dependente do tamanho da partícula em suspensão. As medidas de determinação do potencial Zeta foram realizadas utilizando-se suspensões dos materiais em água. Para a determinação do ponto de carga zero, ponto isoelétrico da enzima, foi utilizado uma solução da GOx em água variando-se o pH por adição de NaOH ou HCl.

3.4.6-Medidas de Voltametria Cíclica

Os experimentos de Voltametria Cíclica (VC) foram realizados em um Potenciostato BAS- Voltamograph CV-27 com um registrador Omnigraphic® 100 recorder - Houston instrument, e em um Potenciostato Metrohm 910 PSTAT mini.

A Voltametria Cíclica é uma técnica amplamente empregada na obtenção de informações como, por exemplo, potenciais redox, velocidades de reações eletroquímicas. Em um voltamograma, os resultados obtidos são construídos em um gráfico de corrente *versus* voltagem⁶⁷, como pode ser observado em um exemplo na Figura 24.

Figura 24: Voltamograma Cíclico para IrCl₆²⁻, 2 mmol L⁻¹, a 40 mVs⁻¹ (Adaptada da Referência 132).

Através dos experimentos de Voltametria Cíclica foi possível avaliar processos de oxidação, redução, bem como entender o comportamento eletroquímico das espécies de interesse.

4. Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1- HDL intercalados com o ânion carbonato

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos para os HDL intercalados com o ânion carbonato, Mg-Al-CO₃ e Zn-Al-CO₃, preparados pelo método de coprecipitação a pH variável, como descrito na seção 3.2.1, e com razão entre os cátions MII/MIII de 2:1.

Os difratogramas de raios X no pó (DRXP) para os materiais Mg-Al-CO₃ e Zn-Al-CO₃ preparados por coprecipitação a pH variável e com proporção entre os cátions de 2:1 estão representados na *Figura 25 (a) e (b)* respectivamente.

Os materiais apresentaram-se com elevada cristalinidade, exibindo os picos basais (00*l*), característicos da estrutura lamelar dos materiais^{16,128}, e picos (01*l* e 11*l*) relacionados à estrutura das lamelas e a sequência de empilhamento. Através destes difratogramas foi possível identificar a existência de uma fase lamelar, pela repetição dos picos basais. Os espaçamentos basais para os materiais foram calculados utilizando-se a lei de Bragg dada pela equação: $n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta$, e utilizando-se a reflexão d_{003} ¹³³, sendo que os valores de espaçamento basal encontrados foram de 7,63 Å para o HDL de Mg-Al-CO₃ e 7,53 Å para o HDL de Zn-Al-CO₃, em concordância com valores encontrados na literatura¹⁶ para estes tipos de materiais. Na *Tabela 4* está sumarizado os valores do ângulo (2θ), espaçamento basal, e tamanho de partícula médio dos dois HDL intercalados com carbonato, este último parâmetro foi obtido por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz, como descrito na seção 3.4.5.

Tabela 4: Parâmetros obtidos para os materiais intercalados com carbonato.

HDL	Ângulo (2θ)	$d_{(003)}$ (Å)	Tamanho de Partícula (nm)
Mg-Al-CO ₃	11,68	7,63	184,4
Zn-Al-CO ₃	11,86	7,53	510,5

Figura 25: Difrátogramas de raios X no pó para: a) Mg-Al-CO_3 preparado a pH variável; e b) Zn-Al-CO_3 preparado a pH variável. ° fase identificada como ZnO.

O HDL de Mg-Al-CO_3 apresentou-se com picos mais bem definidos e maior pureza de fase do que o material preparado com o cátion Zn, neste último foi possível observar o aparecimento de uma fase de ZnO, similar ao reportado na literatura de um

HDL intercalado com nitrato¹³⁴. O aparecimento desta fase pode ser relacionado às condições de síntese empregadas, onde o pH final obtido foi de 11, e como já reportado na literatura acima de pH = 9 há a precipitação de ZnO, pois em meio fortemente alcalino as espécies de ZnO não são solúveis e competem com a formação do HDL de Zn/Al¹³⁵. No *Anexo 1* está representado um DRXP para o HDL de Zn-Al-CO₃ com os picos de ZnO indexados.

Com o auxílio do programa ACD/ChemSketch® e ACD/3D Viewer 11.0, com os valores de espaçamento basal obtido por DRXP, e sabendo que a espessura da lamela é de 4,8 Å^{16,129}, é possível obter um valor de aproximadamente 2,8 Å condizente com o tamanho do íon carbonato. Assim foi proposto um modelo de intercalação deste ânion hidratado nos HDL, como pode ser observado na *Figura 26*.

Figura 26: Esquema de intercalação das moléculas de carbonato entre as lamelas do HDL.

Através das Análises Termogravimétricas (ATG) e Análises Térmicas Diferenciais (ATD) foi possível avaliar a estabilidade térmica destes materiais. Na *Figura 27* estão representadas as curvas de ATG e de ATD para os materiais preparados com Mg/Al ou Zn/Al, onde foi possível observar três principais etapas de decomposição¹³⁰. A primeira etapa, que vai da temperatura ambiente até aproximadamente 250 °C está relacionada com a eliminação de água de adsorção e da água interlamelar (picos endotérmicos). A segunda etapa, entre 250 °C até aproximadamente 500 °C está relacionada ao início da desidroxilação e à decomposição do carbonato intercalado. A terceira etapa acima de 500 °C está relacionada com o final da desidroxilação e formação dos óxidos. As etapas de decomposição para os materiais e suas temperaturas estão apresentadas na *Tabela 5*.

Figura 27: Curvas de ATG e de ATD para: a) Mg-Al-CO₃ preparado a pH variável; e b) Zn-Al-CO₃ preparado a pH variável.

Para o HDL de Mg-Al-CO₃ é possível observar na curva de ATD dois picos endotérmicos, o primeiro em aproximadamente 224 °C, devido à remoção de água interlamelar, e o segundo em aproximadamente 392 °C, devido à desidroxilação de OH ligado à cátions Mg¹³⁶, comportamento similar ao reportado na literatura para este mesmo tipo de sistema¹³¹. O HDL de Zn-Al-CO₃ apresentou um pico endotérmico em

aproximadamente 183 °C, exibindo comportamento similar ao reportado na literatura para este mesmo sistema¹³⁵.

Tabela 5: Etapas de decomposição dos materiais intercalados com carbonato.

Material	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa
	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)
Mg-Al-CO ₃	TA - 251,12	251,12 - 477,78	477,78 - 889,47
Zn-Al-CO ₃	TA - 207,23	207,23 - 473,76	473,76 - 889,46

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV-TF) na região entre 4000 e 400 cm⁻¹ para os materiais intercalados com o carbonato estão representados na *Figura 28*. As bandas que aparecem em aproximadamente 3400 cm⁻¹ estão relacionadas ao estiramento do grupo hidroxila e água interlamelar e adsorvida¹³⁷. Em aproximadamente 1400 cm⁻¹ é possível observar uma banda relacionada à deformação axial do carbonato¹³¹. Abaixo de 700 cm⁻¹ as bandas estão relacionadas com às vibrações metal-oxigênio-metal da parte inorgânica do material¹³⁷. Uma descrição mais completa de todas as bandas características dos dois HDL pode ser observada na *Tabela 6*.

Tabela 6: Atribuição das bandas de IV-TF para os HDL intercalados com carbonato.

HDL	Bandas (cm ⁻¹)	Atribuição
Mg-Al-CO ₃ e Zn-Al-CO ₃	3414	estiramento grupo O-H
	1633	deformação da H ₂ O
	1373	estiramento grupo CO ₃ ²⁻
	795	estiramento: Mg-O, Zn-O, Al-O deformação: M-O-H
	645	
	563

Figura 28: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para: Mg-Al-CO₃; e b) Zn-Al-CO₃.

As imagens representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para os materiais intercalados com carbonato estão representados na *Figura 29*. Foi possível observar a formação de aglomerados em forma de placas, sendo que para o HDL de Mg-Al, estas placas são mais densas, do que o material preparado com Zn-Al que apresentou um grande número de placas alongadas, inclusive com o aparecimento de algumas placas hexagonais, devido possivelmente a fase de óxido de zinco que foi observada nos difratogramas¹³⁸, ou a maior uniformidade das placas hexagonais neste caso, pode ser devido também a maior cristalinidade do HDL de Zn/Al observada no difratograma de raios X.

Figura 29: Imagens representativas de MEV para: a) e b) Mg-Al-CO_3 em diferentes escalas; c) e d) Zn-Al-CO_3 em diferentes escalas.

A medida do potencial Zeta para os HDL preparados descrito acima, foi realizada como descrito na seção 3.4.5, e apresentou valores positivos, de acordo com a literatura para esse tipo de material¹⁰, sendo que para o HDL de Mg-Al-CO_3 o potencial Zeta médio encontrado foi de 22,7 mV e para o HDL Zn-Al-CO_3 foi de 42,9 mV. Estes resultados são importantes visto que estes materiais serão utilizados para a imobilização da enzima GOx na superfície de eletrodos, por adsorção. Esta imobilização é favorecida através de interações eletrostáticas, com as cargas positivas do HDL e negativas da enzima, pois em valores de pH acima do pI a enzima GOx apresentada carga negativa, como pode ser observada no Anexo 2, onde está representada a curva do ponto de carga zero para a enzima GOx.

4.2- Compósitos e/ou Réplicas de carbono derivados de HDL

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos para o HDL intercalado com o ânion 4-vinilbenzenosulfonato (VBS), designado como Mg-Al-VBS , que foi preparado pelo método de coprecipitação a pH constante, e com razão entre os cátions

M(II)/M(III) de 2:1, como descrito na seção 3.2.2. Este material foi utilizado como precursor na preparação dos compósitos e/ou réplicas de carbono derivados de HDL, através de etapas de calcinação, carbonização e lavagem ácida, como já descrito também na seção 3.2.2.

Os difratogramas de raios X no pó (DRXP) para o HDL precursor Mg-Al-VBS e para o materiais obtidos após as etapas de calcinação, carbonização e lavagem ácida, estão representados na *Figura 30*.

Na *Figura 30 (a)* está representado o difratograma de raios X no pó para o material Mg-Al-VBS preparado por coprecipitação a pH constante com proporção entre os cátions de 2:1. Através deste difratograma foi possível identificar a existência de uma fase lamelar, devido a repetição dos picos basais, apresentando espaçamento basal de 18,46 Å, em concordância com materiais similares preparados e reportados na literatura^{54,60}, sugerindo uma intercalação do VBS com os íons sulfonato alternadamente dirigidos para as lamelas, com a parte hidrofóbica das moléculas semi-emparelhadas no interior do espaço interlamelar⁶⁰. Na *Figura 30 (b)*, que representa o difratograma para o HDL de Mg-Al-VBS após o tratamento térmico a 220 °C, em que é possível observar ainda a presença de uma estrutura lamelar no material, porém com contração no espaçamento basal, que foi de 16 Å, devido a desidratação e a uma possível mudança de arranjo das moléculas de VBS, relacionada ao início da polimerização⁵⁴. Os difratogramas para os materiais Mg-Al-VBS carbonizado a 600 °C, e para este mesmo material após a lavagem ácida, estão representados na *Figura 30 (c)* e *(d)* respectivamente. No caso do material carbonizado ainda aparece a estrutura dos oxihidróxidos, com o colapso da estrutura lamelar e após a desmineralização é possível observar o caráter amorfo, indicando degradação completa da estrutura cristalina^{54,60}.

Figura 30: Difratomogramas de raios X no pó para: a) Mg-Al-VBS preparado a pH constante; b) Mg-Al-VBS após a calcinação; c) Mg-Al-VBS carbonizado; e d) Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.

Na *Tabela 7* estão representados os valores do ângulo (2θ), espaçamento basal, e tamanho de partícula médio, obtido conforme descrito na seção 3.4.5, para o HDL intercalado com VBS e para os produtos derivados dele.

Tabela 7: Parâmetros obtidos para o material intercalado com o VBS e seus derivados.

Material	Ângulo (2θ)	$d_{(003)}$ (Å)	Tamanho de Partícula (nm)
Mg-Al-VBS	4,90	18,46	332,4
Mg-Al-VBS calcinado	5,60	16,0	1775,3
Mg-Al-VBS carbonizado	----	----	1488,0
Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado	----	----	387,47

Na *Figura 31*, foi proposto um modelo de intercalação dos ânions 4-vinilbenzeno sulfonato (VBS) entre as lamelas, com o auxílio dos programas ACD/ChemSketch® e ACD/3D Viewer 11.0, utilizando-se os valores de espaçamento basal obtido por DRXP, e sabendo que a espessura da lamela é de $4,8 \text{ \AA}$ ^{16,129}.

Figura 31: Esquema de intercalação das moléculas do 4-vinil benzeno sulfonato entre as lamelas do HDL.

Na *Figura 32* está representado as curvas de ATG e de ATD para o HDL de Mg-Al-VBS. Foi possível observar para este material, que a decomposição ocorreu em quatro principais etapas. A primeira etapa que ocorreu da temperatura ambiente até $178,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi devido à perda de água adsorvida e de água de intercalação, a segunda etapa que foi desta última temperatura até $444,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ está relacionada à desidroxilação das lamelas e início de decomposição do ânion VBS, a terceira etapa que ocorreu até a temperatura de $609,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi devido ao final da decomposição dos ânions VBS, e a quarta etapa que ocorreu até a temperatura de $987,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ foi devido à formação dos óxidos mistos. Comportamento similar foi observado para HDL do sistema Zn-Al intercalado com VBS⁶⁰. Na *Tabela 8* estão representadas as etapas de decomposição para o HDL Mg-Al-VBS.

Tabela 8: Etapas de decomposição para o HDL Mg-Al-VBS.

	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa
Material	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)
Mg-Al-VBS	TA- 178,6	178,6-444,2	444,2-609,8	609,8-987,8

Figura 32: Curvas de ATG e de ATD para: Mg-Al-VBS.

Os espectros de absorção no infravermelho (IV-TF) na região entre 4000 e 400 cm^{-1} para os materiais intercalados com VBS e os materiais derivados, após sofrerem tratamento, estão representados na *Figura 33*. Para todos os materiais foi possível observar uma banda em aproximadamente 3450 cm^{-1} devido ao estiramento do grupo O-H relacionado à água adsorvida e intercalada e às hidroxilas na estrutura do HDL. Nos espectros (a) e (b) foi possível observar bandas em aproximadamente 1200 e 1043 cm^{-1} atribuídas às vibrações simétricas e assimétricas do grupo S=O, em concordância com o descrito na literatura para este tipo de material^{54,60}. Estas bandas não estão presentes nos materiais (c) e (d) após carbonização e desmineralização, respectivamente. Em aproximadamente 925 cm^{-1} aparece, em (a), uma banda relacionada à deformação simétrica angular de C-H no plano do alceno, que desaparece em (b)⁶⁰. Em aproximadamente 681 e 550 cm^{-1} aparecem bandas relacionadas com as vibrações Al-O e Mg-O¹³⁹, que desaparecem no material (d) após a lavagem ácida, sugerindo uma remoção dos cátions, como pode também ser observado nos espectros de EDX (*Anexo 3*), em

comparação com o material carbonizado da etapa anterior, onde é possível observar os cátions pelo IV e pelo EDX (*Anexo 4*).

Figura 33: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para a) Mg-Al-VBS; b) Mg-Al-VBS calcinado; c) Mg-Al-VBS carbonizado; d) Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.

As imagens representativas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o HDL de Mg-Al-VBS e para os materiais compósitos preparados, em duas magnitudes diferentes, estão representados na *Figura 34*.

Figura 34: Imagens representativas de MEV para: a) e b) Mg-Al-VBS; c) e d) Mg-Al-VBS calcinado; e) e f) Mg-Al-VBS carbonizado; g) e h) Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.

Para o HDL Mg-Al-VBS, na *Figura 34 (a) e (b)*, foi possível observar a formação de placas sobrepostas, com partículas adsorvidas na superfície. Para o material após o primeiro tratamento térmico, Mg-Al-VBS calcinado, *Figura 34 (c) e (d)* foi possível observar placas sobrepostas, mas com o aparecimento de poros na estrutura. Na *Figura 34 (e) e (f)* estão representadas as imagens de MEV para o material após o processo de carbonização, e em *(g) e (h)* para o material carbonizado após a lavagem ácida, onde foi possível observar a elevada porosidade do material^{54,60}.

As medidas de potencial Zeta, também foram realizadas para o HDL de Mg-Al-VBS e para os compósitos derivados dele, e a média dos valores estão descritas na *Tabela 9*.

Tabela 9: Valores médios de potencial Zeta para o HDL de Mg-Al-VBS e os compósitos derivados.

Material	Potencial Zeta (mV)
Mg-Al-VBS	20,07
Mg-Al-VBS calcinado	15,67
Mg-Al-VBS carbonizado	3,22
Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado	-23,97

O potencial Zeta positivo encontrado para o HDL Mg-Al-VBS e para os materiais derivados de calcinação e carbonização, está de acordo com o esperado. Para o material após a lavagem ácida, também era de se esperar um potencial negativo, devido a remoção dos cátions nesta etapa. Estes resultados serão importantes e utilizados para entender o comportamento da imobilização da enzima GOx nestes materiais.

4.3- Compósitos de HDL/óxido de grafeno

Nesta seção, serão apresentados os resultados obtidos para o compósito HDL/óxido de grafeno, Mg-Al/óxido de grafeno, preparado pelo método de coprecipitação a pH constante, como descrito na seção 3.2.3, e com razão entre os cátions M(II)/M(III) de 2:1.

Na *Figura 35* estão representados o difratogramas de raios X no pó para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno. Pode ser observado no difratograma para o óxido de grafeno puro, *Figura 35 (a)*, um pico de difração (001) em

10,97°, correspondendo a uma distância de 8,03 Å, atribuído ao plano cristalino do óxido de grafeno, devido a grupos oxigênio na estrutura, como reportado em trabalho anterior¹²⁴. Para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno, *Figura 35 (b)*, foi possível identificar a existência de uma fase lamelar, devido à repetição dos picos basais (003), (006), e ainda as reflexões (012) e (110). A reflexão (003) no material ocorre em aproximadamente 11°, correspondendo a um espaçamento basal de 8,24 Å, muito próxima e sobreposta ao pico do óxido de grafeno^{63,140}. Na *Tabela 10*, está sumarizada valores de ângulos, valores de d , e de tamanho de partícula, obtido conforme descrito na seção 3.4.5, para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.

Tabela 10: Parâmetros obtidos para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.

Material	Ângulo (2 θ)	d (Å)	Tamanho de Partícula (nm)
óxido de grafeno	10,97	8,03	1135,7
Mg-Al/óxido de grafeno	11,0	8,24	3756,3

Figura 35: Difratomogramas de raios X no pó para: a) óxido de grafeno puro; e b) Mg-Al/óxido de grafeno.

Na *Figura 36* está representado as curvas de ATG e de ATD para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.

Figura 36: Curvas de ATG e de ATD para: a) óxido de grafeno puro; e b) Mg-Al/óxido de grafeno.

Para o óxido de grafeno puro, *Figura 36 (a)*, foram observadas quatro principais etapas de decomposição: sendo que a primeira foi da temperatura ambiente até 123,26 °C; a segunda etapa entre 123,26 °C e 243,79 °C; correspondendo a perda de água adsorvida¹⁴¹; a terceira etapa indo da temperatura de 243,79 °C até 516,86 °C; devido a decomposição de grupos funcionais e oxidação⁶³; e a última etapa até 889,34 °C,

relacionada à combustão da cadeia carbônica¹⁴¹. Para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno, *Figura 36 (b)*, foram observadas quatro principais etapas de decomposição, sendo que a primeira da temperatura ambiente até 243,79 °C corresponde a perda de água intercalada e água adsorvida; a segunda etapa de 243,79 °C até 350,58 °C correspondente à desidroxilação das lamelas; a terceira etapa de 350,58 °C até 466,52 °C; devido à decomposição de carbonato e a combustão da cadeia carbônica do óxido de grafeno, que aparecem sobrepostas^{63,141}, e a quarta etapa até a temperatura de 891,48 °C devido à formação dos óxidos mistos. Comportamento similar foi observado para compósitos preparados entre HDL de Zn-Al e óxido de grafeno¹⁴¹. As etapas de decomposição para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno estão representadas na *Tabela 11*.

Tabela 11: Etapas de decomposição para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno.

	1ª Etapa	2ª Etapa	3ª Etapa	4ª Etapa
Material	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)	Faixa de Temp (°C)
Mg-Al/óxido de grafeno	TA- 243,79	243,79-350,58	350,58-466,52	466,52-891,48

Os espectros de absorção no infravermelho (IV-TF) na região entre 4000 e 400 cm^{-1} para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno, e para o óxido de grafeno puro, estão representados na *Figura 37*.

Figura 37: Espectros no Infravermelho (IV-TF) para a) óxido de grafeno; b) compósito Mg-Al/óxido de grafeno.

Para o óxido de grafeno puro, *Figura 37 (a)*, foi possível observar bandas em 3421 cm^{-1} , devido ao estiramento do grupo O-H, uma banda em aproximadamente 1611 cm^{-1} devido ao estiramento C=C, uma banda em 1440 cm^{-1} devido a deformação O-H, e uma banda em 1064 cm^{-1} devido ao estiramento C-O¹⁴². Para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno, *Figura 37 (b)*, foi possível observar uma banda em aproximadamente 3450 cm^{-1} devido à grupos O-H de água e da estrutura do HDL, e bandas relacionadas com o grupo COOH do óxido de grafeno, C=O, C-O e C-OH, em 1627 cm^{-1} , mostrou-se com

menor intensidade, sugerindo uma possível redução do óxido de grafeno¹²⁴. A banda que aparece em 1372 cm^{-1} , relacionada as vibrações C=O, mostrou com maior intensidade, possivelmente devido ao carbonato intercalado do HDL¹²⁴, e ainda foram identificadas bandas na região abaixo de 800 cm^{-1} relacionadas com as vibrações M-O-M. Como demonstrado em trabalho anterior para materiais do sistema Ni-Al, o NaOH utilizado na síntese do compósito HDL/grafeno, além de atuar como agente precipitante para a formação do HDL, pode atuar como agente redutor dos grupos oxigenados do óxido de grafeno¹²⁴.

Na *Figura 38* estão representadas as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para o óxido de grafeno puro e para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno. Para o óxido de grafeno puro, *Figura 38 (a)* e *(b)* correspondem a duas regiões diferentes da amostra. Em *(a)* observa-se placas mais desordenadas e em *(b)* as folhas do óxido de grafeno empilhadas. Para o compósito Mg-Al/óxido de grafeno representado na *Figura 38 (c)* e *(d)*, também registrada em duas regiões diferentes da amostra, é possível observar em *(c)* a formação de placas sobrepostas com partículas adsorvidas e em *(d)* de outra região da amostra é possível observar uma modificação em relação ao óxido de grafeno puro, indicando um crescimento do HDL na superfície das folhas de óxido de grafeno, que indicam a formação do compósito de HDL/óxido de grafeno, assim como demonstrado para compósitos de Zn-Al/grafeno¹⁴¹.

Figura 38: Imagens representativas de MEV para: a) e b) óxido de grafeno puro; e c) e d) Mg-Al/óxido de grafeno.

O potencial Zeta médio encontrado para o óxido de grafeno puro foi de $-35,4$ mV, de acordo com a literatura¹⁴³, que é favorável para a formação do compósito com HDL por interações eletrostáticas. O compósito Mg-Al/óxido de grafeno apresentou potencial Zeta de $10,8$ mV.

4.4- Comportamento eletroquímico dos eletrodos modificados com HDL e derivados e a enzima GOx

A enzima GOx possui em sua estrutura um grupo flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que é um centro redox ativo, que possibilita a transferência de elétrons diretamente entre o substrato e a enzima. O pico de oxidação/redução do FAD pode ser observado em um potencial de aproximadamente $-0,4$ V (vs Ag/AgCl)^{77,78,125}. Na Figura 39 estão representados os processos de oxidação/redução que ocorrem na molécula de FAD.

Figura 39: Processos de oxidação/redução do FAD¹⁴⁴.

4.4.1- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com Mg-Al-CO₃ e Zn-Al-CO₃ e aplicação para medidas de glicose

Nesta seção serão apresentados os resultados eletroquímicos obtidos para os eletrodos modificados com o HDL de Mg-Al-CO₃ e Zn-Al-CO₃ e a enzima GOx, que foram preparados como descrito na seção 3.3.1.

4.4.1.1- Comportamento eletroquímico dos eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx

Os resultados eletroquímicos do comportamento dos eletrodos de carbono vítreo modificados com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx, que foram preparados como descrito na seção 3.3.1.1, serão apresentados a seguir.

Na *Figura 40* está representado o Voltamograma Cíclico para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx. Para o experimento realizado em Argônio, a uma velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹, foi possível observar um par redox de picos, não muito pronunciados, em aproximadamente -0,4 V, atribuídos à molécula FAD presente na estrutura da enzima GOx. Comportamento similar a este foi observado para filmes da enzima GOx imobilizada em HDL intercalado com lactato, mostrando que o HDL pode ajudar na promoção da eletroquímica direta entre a enzima GOx e o eletrodo, de forma não tão eficiente, devido ao pequeno par de picos redox observado⁷⁷. Neste mesmo estudo realizado por Zhang e colaboradores⁷⁷ utilizou-se um mesmo HDL exfoliado, onde foi observado uma melhor resolução do pico redox de FAD/FADH₂, demonstrando uma melhora na eficiência para a promoção da eletroquímica direta entre a enzima GOx e o eletrodo, neste último caso.

Figura 40: Voltamograma Cíclico para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO₃/GOx saturado com argônio e velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹.

Para a obtenção dos parâmetros analíticos foram modificados três eletrodos de CV com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx, da mesma forma como descrito na seção 3.3.1.1.i). E neste caso, para o experimento realizado em Argônio, não foi possível observar com nitidez em aproximadamente -0,4 V o par de picos atribuído ao FAD (Anexo 5).

Para estes eletrodos modificados preparados, foi avaliado o comportamento eletroquímico na solução eletrolítica saturada com ar sintético e após adição de solução 0,1 M de glicose.

No Voltamograma Cíclico após saturação com ar sintético a 10 mVs⁻¹, e após adição de solução de glicose 0,1 mol L⁻¹, *Figura 41*, foi possível observar a diminuição da corrente catódica do O₂ (~ -0,60 V), indicando o consumo de oxigênio na reação^{78,125}, durante a oxidação da glicose pela GOx imobilizada no HDL, e a resposta catalítica frente ao substrato, como também foi observado para GOx imobilizada em compósito de GNs/ZnO⁹⁸. O mecanismo envolvido é explicado pelas seguintes reações⁷⁸:

Figura 41: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO₃/GOx saturado com ar sintético: — sem glicose; e — com 1,75 mmol L⁻¹ de glicose 0,1 mol L⁻¹ à 10 mVs⁻¹.

Na *Figura 42*, está representado o Voltamograma Cíclico da resposta da GOx imobilizada em eletrodos de CV com Mg-Al-CO₃, na presença de diferentes concentrações de glicose 0,1 mol L⁻¹, indo em uma faixa de 0-1,75 mmol L⁻¹, em solução tampão saturada com ar sintético e a 10 mVs⁻¹, mostrando que com o aumento da concentração de glicose, houve uma diminuição da corrente do pico de redução do oxigênio¹⁴⁵.

Figura 42: Voltamogramas Cíclicos: Resposta da GOx imobilizada em eletrodos de CV com Mg-Al-CO₃/GOx com as sucessivas adições de glicose, saturado com ar sintético.

Experimentos controle foram realizados utilizando as mesmas condições descritas anteriormente, em que somente o HDL suporte Mg-Al-CO₃ ou somente a enzima GOx foram empregados para modificar o eletrodo de CV, e não foi observada alteração significativa na corrente quando foi adicionada sucessivamente alíquotas de solução de glicose, de acordo com o trabalho proposto por Zhang e colaboradores⁷⁷, mostrando que o suporte, neste caso o HDL de Mg-Al-CO₃, se faz importante para a acessibilidade no sítio ativo da enzima.

Na *Figura 43 (a)* está representada a curva de I vs C_{glicose} , realizada em triplicata, onde foi possível observar que com as sucessivas adições de glicose houve uma diminuição na corrente, mostrando uma resposta catalítica eficiente. Na *Figura 43 (b)*, está representada a parte linear da curva anterior para a concentração de 0 até 0,625 mmol L⁻¹ cuja equação linear foi de $I = -2,9733 (\pm 0,0195) \mu\text{A} + 1,8344 (\pm 0,0665) \cdot [\text{glicose}] (\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L})$ ($R = 0,9934$), e cuja sensibilidade foi de $1,83 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$.

Figura 43: a) Curva I vs C glicose para os eletrodos de carbono vítreo modificados com Mg-Al-CO₃/GOx; e b) Curva Analítica.

Os eletrodos modificados com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx exibiram uma boa eletrocatalise para a redução de O₂ e para a oxidação da glicose, e esta

estabilidade do filme preparado pode ser atribuída as interações eletrostáticas favoráveis que ocorreram entre o material e a enzima¹⁴⁶.

O valor do K_M^{app} , foi calculado fazendo-se a linearização da Equação de Michaelis-Menten, utilizando-se a equação de Lineweaver–Burk, nas condições eletroquímicas^{99,147}, como descrita abaixo:

$$\frac{1}{I} = \frac{K_M^{app}}{I_{max}} \cdot \frac{1}{C_{glicose}} + \frac{1}{I_{max}}$$

Foi construído um gráfico do inverso da corrente (μA^{-1}) vs o inverso da Concentração de Glicose (mM^{-1}), representado na *Figura 44*, cuja equação da reta obtida foi: $1/I = 0,1615(\pm 0,0054) \cdot (1/C) - 0,7980(\pm 0,0068)$, e utilizando-se os valores do intercepto e da inclinação da reta do duplo recíproco, foi obtido um valor de K_M^{app} de $0,202 \text{ mmol L}^{-1}$.

A constante de Michaelis-Menten aparente K_M^{app} é utilizada para avaliar a atividade biológica da enzima imobilizada¹⁴⁸, este valor que foi encontrado é menor do que outros valores reportados na literatura^{95,99} e similar ao valor encontrado por Deng e colaboradores¹⁴⁸, que atribui o pequeno valor de K_M^{app} a alta atividade enzimática da GOx imobilizada, e que o eletrodo preparado exhibe alta afinidade pelo substrato glicose.

Figura 44: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al-CO₃/GOx.

Os eletrodos modificados preparados foram guardados em solução tampão, em geladeira, a aproximadamente 4 °C, quando não estavam sendo utilizados, para a realização dos testes de estabilidade. Após 15 dias, a corrente inicial do eletrodo em ar sintético, sem glicose foi mantida em 89% (*Figura 45 (a)*), e para uma concentração de glicose de 0,175 mmol L⁻¹ após 15 dias, a corrente foi mantida em 87% (*Figura 45 (b)*), demonstrando bons resultados, comparáveis com outros artigos reportados^{149–151}, que utilizaram outro suporte e mediadores para a enzima GOx. A instabilidade a longo prazo dos eletrodos modificados esta relacionada com a dissociação ou perda da atividade da enzima¹⁴⁹.

Figura 45: Estabilidade dos eletrodos de CV modificados com Mg-Al-CO₃/GOx após período de 15 dias: a) sem glicose; e b) com adição de 1,75 mmol L⁻¹ glicose.

Em um teste preliminar realizado modificando-se somente um eletrodo de CV com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx da mesma forma como descrita anteriormente, foi possível observar um fraco par de picos redox, em aproximadamente -0,45 V do FAD/FADH₂ e após saturação com ar sintético foi observado um pico de redução do oxigênio que foi monitorado com as sucessivas adições de glicose. Foi construída a curva analítica de Corrente vs Concentração de Glicose, apresentada no *Anexo 6*. Foi possível observar a diminuição da corrente catódica com as adições de glicose. Foi possível observar pelo perfil do gráfico, duas regiões lineares, como já reportado em trabalho anterior⁹⁷, na região de baixa concentração até 0,625 mmol L⁻¹ com equação linear: $I = -2,8139 (\pm 0,0395) \mu A + 1,1814 (\pm 0,0990) \cdot [\text{glicose}] \mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$ ($R = 0,9896$), e sensibilidade de 1,18 $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$, na região de alta concentração até 1,25 mM, apresentou a equação linear: $I = -2,3452 (\pm 0,0317) \mu A + 0,4571 (\pm 0,0329) \cdot [\text{glicose}] \mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$ ($R = 0,9897$), e sensibilidade de 0,46 $\mu A \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$. Estes resultados demonstram similaridade com os resultados descritos anteriormente, para os eletrodos preparados em triplicada, mostrando que houve uma boa reprodutibilidade do método, tanto inter-ensaio quanto intra-ensaio.

Os testes de estabilidade realizados com este eletrodo demonstraram que após 10 dias a corrente inicial se manteve 98%, e após 35 dias foi mantida 95% de sua corrente inicial, indicando boa estabilidade a longo prazo dos eletrodos preparados. Quando adicionada uma concentração de 1,125 mmol L⁻¹ de glicose após 35 dias houve perda de 25% da corrente. A estabilidade do eletrodo preparado com o HDL/GOx está relacionada com as propriedades já descritas que o material apresenta, que propicia uma maior

estabilização da enzima. Ainda o método de imobilização utilizando-se o glutaraldeído, por meio de uma ligação cruzada, auxilia na prevenção da perda da enzima para a solução¹⁵¹. Todos estes resultados demonstram que este sistema pode ser aplicado na preparação de um biossensor de glicose.

Foram realizados experimentos através da modificação do eletrodo de carbono vítreo com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx utilizando-se a metodologia descrita na seção 3.3.1.1.ii), com a finalidade de verificar se o método de imobilização na superfície dos eletrodos alterava o comportamento eletroquímico. Os resultados obtidos estão apresentados no *Anexo 7*. Foi possível observar que este método de preparação do eletrodo modificado não foi tão eficiente quanto ao método descrito anteriormente, neste caso não foi obtida boa sensibilidade e resposta catalítica com as sucessivas adições de glicose, mostrando uma pequena alteração na corrente (variação de aproximadamente 0,36 V da primeira para a última adição de glicose), e também para a curva analítica que foi construída, foi possível observar o comportamento não tão linear deste eletrodo modificado.

4.4.1.2- Comportamento eletroquímico do eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx

Ainda para o HDL de Mg-Al-CO₃ foi modificado um eletrodo de Pasta de Carbono com a mistura deste HDL, grafite em pó, e a enzima GOx, como descrito na seção 3.3.1.2 e os resultados eletroquímicos serão descritos a seguir. Na *Figura 46* está representado o Voltamograma Cíclico, deste eletrodo modificado. Em atmosfera de Argônio a 100 mVs⁻¹, na *Figura 46 (a)* foram observados picos em ~-0,35 V e ~-0,42 V, correspondendo aos picos de oxidação/redução do FAD/FADH₂⁹⁵, como já descrito anteriormente. Após saturação com ar sintético à 10 mVs⁻¹, na *Figura 46 (b)*, foi observado um pico de redução em ~-0,53 V, atribuído à corrente catódica do oxigênio. É possível observar a diminuição no pico de redução e o aumento no pico de oxidação quando é adicionado glicose, comportamento similar foi observado em estudo com eletrodos modificados com a enzima GOx e o compósito de RGO/ZnO¹⁴⁶, exibindo assim boa resposta eletrocatalítica na redução de O₂ e na oxidação da glicose.

Figura 46: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-CO₃/grafite/GOx: a) em Argônio à 100 mVs⁻¹; e b) saturado com ar sintético: — sem glicose e — com 1,375 mmol L⁻¹ of glicose à 10 mVs⁻¹.

Este pico de redução também foi monitorado através da diminuição da corrente após as sucessivas adições de glicose. Na *Figura 47 (a)* está representada a influência da concentração de glicose na corrente catódica. Foi possível observar um comportamento linear na faixa de concentração até 0,875 mmol L⁻¹ (no gráfico da *Figura 47 (b)*) com equação linear: $I = -1,075(\pm 0,037)\mu\text{A} + 0,9357 (\pm 0,0718) \cdot [\text{glicose}] (\mu\text{Ammol}^{-1} \text{ L})$, ($R = 0,9827$) e sensibilidade de 0,93 $\mu\text{Ammol}^{-1} \text{ L}$. Neste caso também foi possível observar um comportamento Michaeliano.

Figura 47: a) Curva I vs C glicose para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado $Mg-Al-CO_3$ /grafite/ GOx ; e b) Curva Analítica.

O eletrodo de Pasta de Carbono modificado foi guardado em solução tampão, em geladeira, a aproximadamente $4^\circ C$, para a realização dos testes de estabilidade. Após

11 dias, para o experimento realizado em ar sintético e sem adição de glicose, a corrente inicial foi mantida em 94%, e nesta mesma condição com adição de $1,375 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose a corrente foi mantida em apenas 60%, demonstrando neste último caso uma perda na eficiência da enzima GOx.

Para este eletrodo modificado preparado foi possível observar também a importância do suporte na atividade da enzima GOx.

4.4.1.3- Comportamento eletroquímico do eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO₃ e a enzima GOx

Os resultados eletroquímicos do comportamento do eletrodo de Pasta de Carbono modificado com o HDL de Zn-Al-CO₃ e a enzima GOx, que foi preparado como descrito na seção 3.3.1.3, serão descritos a seguir.

Na *Figura 48 (a)* para o eletrodo em atmosfera de argônio foi possível observar um pico de redução em aproximadamente $-0,25 \text{ V}$, e não foi observado o pico do FAD/FADH₂. Após saturação com ar sintético, *Figura 48 (b)*, foi possível observar um pico de redução em aproximadamente $-0,6 \text{ V}$ devido a redução do oxigênio, e uma diminuição na corrente deste pico quando é adicionada solução de glicose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 48: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO₃/ grafite/GOx: a) em Argônio à 100 mVs⁻¹; e b) saturado com ar sintético : — sem glicose e — com 1,5 mmol L⁻¹ de glicose à 10 mVs⁻¹.

Foi possível observar na *Figura 49* a diminuição da corrente catódica do oxigênio com as sucessivas adições de glicose, essa diminuição não foi tão significativa quanto aos resultados apresentados anteriormente, evidenciado também pela curva de corrente catódica *versus* concentração de glicose, mostrada na *Figura 50*, que não demonstrou comportamento linear.

Figura 49: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO₃/ grafite/GOx, com as sucessivas adições de solução de glicose 0,1 mol L⁻¹, em ar sintético à 10 mVs⁻¹.

Figura 50: a) Curva I vs C glicose para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado Zn-Al-CO₃/grafite/GOx.

Em um estudo preliminar realizado com um eletrodo de Pasta de Carbono modificado com o HDL de Zn-Al-CO₃ e a enzima GOx, foi possível observar em atmosfera de argônio um pico de redução em aproximadamente -0,47 V, que não foi observado no estudo descrito anteriormente. Após saturação com O₂, foram observados alguns processos redox em $\sim -0,15$ V, $\sim -0,4$ V e $\sim -0,6$ V, devido possivelmente à contribuição da fase de ZnO (encontrada no difratograma) comportamento similar a este foi observado para GOx e nanopartículas de ZnO com grafeno-nanotubos⁷⁸ que exibiram um pico atribuído ao FAD em $\sim -0,45$ V e um pico de O₂ em $\sim -0,55$ V. Além disto, foi possível observar também a diminuição da corrente catódica com as sucessivas adições de glicose. Estes resultados estão apresentados no Anexo 8.

4.4.2- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com compósito de carbono derivados de HDL de Mg-Al-VBS e aplicação para medidas de glicose

Nesta seção serão apresentados os resultados eletroquímicos obtidos para os eletrodos modificados com os compósitos de carbono derivados de HDL e a enzima GOx. Neste estudo foi utilizado o material Mg-Al-VBS carbonizado, que foi escolhido por ter apresentado, pelas medidas de potencial Zeta, superfície carregada positivamente, que torna favorável a interação com a enzima GOx. Os eletrodos modificados com o material Mg-Al-VBS carbonizado e a enzima GOx, foram preparados como descrito na seção 3.3.2.

Na *Figura 51* está representado o Voltamograma para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com o compósito de carbono Mg-Al-VBS carbonizado e a enzima GOx. Foi observado na *Figura 51 (a)* um pico de redução em aproximadamente -0,45 V na velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹ e em atmosfera de Argônio, e também um pico de redução em aproximadamente -0,13 V atribuído aos grupos óxidos na estrutura do material. Após saturação com ar sintético, *Figura 51 (b)*, o pico em -0,45 V foi monitorado à 10 mVs⁻¹ após as sucessivas adições de glicose. Foram realizadas oito adições de 0,125 mmol L⁻¹ de glicose cada, totalizando 1 mmol L⁻¹ de glicose adicionada. Foi observada a variação de corrente ΔI_{pc} entre a primeira e a última adição de glicose de 17,5 nA.

Figura 51: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/GOx: a) em Argônio à 100 mVs^{-1} ; e b) saturado com ar sintético: — sem glicose e — com 1 mmol L^{-1} de glicose à 10 mVs^{-1} .

O comportamento eletroquímico para o Eletrodo Pasta de Carbono utilizando este material anterior e adicionando grafite em pó está apresentado na *Figura 52*. É possível observar na *Figura 52 (a)*, à 100 mVs^{-1} , um par de picos em aproximadamente $-0,48 \text{ V}$ e $-0,42 \text{ V}$ mais pronunciado e com correntes maiores do que para o eletrodo preparado anteriormente, indicando que a combinação do material carbonizado com grafite melhora o transporte de carga no eletrodo. Após saturação com ar sintético (*Figura 52(b)*) é possível observar no voltamograma cíclico obtido à 10 mVs^{-1} um pico de redução em aproximadamente $-0,45 \text{ V}$, que diminui com adições de $0,125 \text{ mmol L}^{-1}$ de solução de glicose, com correntes variando de $0,52 \text{ }\mu\text{A}$ (sem adição de glicose) para $0,16 \text{ }\mu\text{A}$ com concentração final de glicose de $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$. Demonstrando assim que o pico de redução diminui e o pico de oxidação aumenta com as sucessivas adições de glicose⁹⁸. À medida que a concentração de glicose foi aumentando, foi ocorrendo a redução de GOx (FAD) a GOx (FADH₂), resultando em uma diminuição da corrente catódica do sistema¹⁵¹.

Figura 52: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx: a) em Argônio à 100 mVs^{-1} ; e b) em ar sintético: — sem glicose, — com $0,125 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, e — $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, à 10 mVs^{-1} .

Esta pasta de carbono preparada foi armazenada em freezer sob condições de atmosfera inerte, e após dois dias foi preparado um novo eletrodo modificado com esta pasta. Foi observado um comportamento similar ao eletrodo anteriormente reportado, apresentando um par de picos redox em $\sim -0,48$ V e $-0,42$ V, a 100 mVs^{-1} em atmosfera de Argônio, por isto esta figura não foi representada. E este eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx, foi utilizado para a construção da curva analítica com sucessivas adições de alíquotas de solução de glicose $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Na *Figura 53 (a)* está representado o decréscimo da corrente, I , *versus* o aumento da concentração de glicose, C_{glicose} . Foi possível observar um comportamento Michaeliano, e com o aumento da concentração de glicose, ocorre uma saturação do sítio ativo, na reação FAD/FADH_2 , fazendo com que a diminuição na corrente não seja mais tão expressiva, formando um platô no gráfico¹⁵¹.

A equação linear entre $12,5$ e $75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, está representada na *Figura 53 (b)*: $\Delta I = -2,0266 (\pm 0,0627) \mu\text{A} + 0,01623 (\pm 0,00129) \cdot [\text{glicose}] (\mu\text{A} \mu\text{mol}^{-1} \text{ L})$, $R = 0,9876$ e sensibilidade de $16,23 \text{ nA} \mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$.

Figura 53: a) Curva I vs $[\text{glicose}]$ para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx; e b) Curva Analítica.

O valor do K_M^{app} , foi calculado utilizando-se a equação de Lineweaver–Burk, já descrita anteriormente, e foi encontrado um valor de $18,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. O gráfico do inverso da corrente *versus* o inverso da concentração de glicose está representado no Anexo 9.

Foi realizado um experimento controle utilizando um eletrodo de Pasta de Carbono modificado com a mistura sólida entre a enzima GOx e grafite em pó. Foi observado um pico de redução em $\sim -0,47 \text{ V}$ e não houve mudança na corrente após saturação com ar sintético e adição de glicose. Este comportamento demonstra que o compósito estudado promoveu boa estabilização da enzima, provavelmente devido à elevada área superficial que este tipo de material possui, promovendo uma boa imobilização da enzima, e alcançando a eletroquímica direta da mesma¹⁵². Comportamento similar a este foi observado em trabalho descrito por Wu e colaboradores¹⁵² para compósitos de Silica-carbono utilizados para a imobilização da GOx em eletrodo, demonstrando que estes tipos de materiais têm importância significativa como suporte na resposta catalítica da enzima.

4.4.3- Estudo Eletroquímico da enzima GOx imobilizada em eletrodos com compósito de Mg-Al/óxido de grafeno e aplicação para medidas de glicose

Nesta seção serão apresentados os resultados eletroquímicos obtidos para os eletrodos modificados com o compósito de Mg-Al/óxido de grafeno e a enzima GOx, que foram preparados como descrito na seção 3.3.3.

Na Figura 54 está representado o voltamograma cíclico para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno e a enzima GOx. Para o experimento realizado em atmosfera de Argônio, e velocidade de varredura de 400 mVs^{-1} foi possível observar um par de picos redox em aproximadamente $-0,4 \text{ V}$ atribuído ao grupo FAD da estrutura da enzima, na velocidade de varredura de 100 mVs^{-1} este par de picos não aparece evidente.

Figura 54: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o composto Mg-Al/óxido de grafeno/GOx, saturado com Argônio: — à 100 mV s⁻¹; e — à 400 mVs⁻¹.

Na *Figura 55* após saturação com ar sintético é possível observar um pico atribuído à redução de oxigênio em aproximadamente -0,52 V que diminui com a adição de solução de glicose, indicando um consumo de O₂ na reação, visto pelas equações anteriores e uma resposta catalítica eficiente como demonstrado anteriormente para os outros materiais preparados e para outros materiais com grafeno encontrados na literatura¹⁵³.

Figura 55: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com o composto Mg-Al/óxido de grafeno/GOx: saturado com ar sintético: — sem glicose, — com $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à 10 mVs^{-1} .

Na *Figura 56 (a)*, curva I vs C_{glicose} , foi possível observar a diminuição da corrente de pico catódico do oxigênio com as sucessivas adições de solução $0,1 \text{ M}$ de glicose, após a concentração de $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose não houve muita variação da corrente, exibindo um comportamento irregular, indicando uma saturação da quantidade de substrato adicionada. Na *Figura 56 (b)* está representada a faixa linear de concentração de glicose até $0,625 \text{ mmol L}^{-1}$, com equação linear: $I = -3,3390(\pm 0,0448) \mu\text{A} + 1,4615(\pm 0,1184) [\text{glicose}] \mu\text{Ammol}^{-1} \text{ L}$ com ($R = 0,9680$), e uma sensibilidade de $1,46 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$.

Figura 56: a) Curva I vs [glicose] para os eletrodos de CV modificados com o composto Mg-Al/óxido de grafeno/GOx; e b) Curva Analítica.

O eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx foi guardado em solução tampão, em geladeira, a 4 °C, para a realização dos testes de estabilidade. As medidas foram realizadas após 16 dias, para o experimento realizado em ar sintético e sem adição de glicose, a corrente inicial foi mantida em aproximadamente 95%, e nesta mesma condição com adição de 1,25 mmol L⁻¹ de glicose a corrente foi mantida em 90%, mostrando uma eficiência do biossensor preparado.

O mesmo experimento foi realizado modificando-se outro eletrodo de carbono vítreo, nas mesmas condições das anteriores com o compósito Mg-Al/óxido de grafeno/GOx. Para o experimento realizado em atmosfera de Argônio foi observado o pico do FAD/FADH₂, exibindo comportamento similar ao descrito anteriormente. Após a saturação com O₂ foi possível observar um pico em aproximadamente -0,55 V, neste caso com correntes maiores do que as exibidas no experimento anterior quando se saturou a solução eletrolítica somente com ar sintético.

O pico de redução do O₂ foi monitorado com as sucessivas adições de glicose, e também foi observado a sua diminuição com o aumento da concentração de glicose, indicando boa eletrocatalise na redução do oxigênio¹⁵⁴, como pode ser observado na *Figura 57*.

Figura 57: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx saturado com O_2 à 10 mVs^{-1} com as sucessivas adições de glicose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Na *Figura 58 (a)* foi observado um perfil Michaeliano para curva de diminuição da corrente de redução de O_2 com o aumento da concentração de glicose. A região linear, está representada na *Figura 58 (b)*, indo até uma concentração de $0,625 \text{ mmol L}^{-1}$, com equação linear: $I = -11,9341(\pm 0,4702) \mu\text{A} + 11,6741(\pm 1,2426) \cdot [\text{glicose}] \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$ com ($R = 0,9780$), e uma sensibilidade de $11,67 \mu\text{Ammol}^{-1} \text{L}$.

Figura 58: a) Curva I vs [glicose] para o eletrodo de CV modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx, saturado com O_2 ; e b) Ajuste linear.

O valor do K_M^{app} calculado pela equação de Lineweaver–Burk., foi de 0,438 mmol L⁻¹. O gráfico do duplo recíproco, com o inverso da corrente *versus* o inverso da concentração de glicose está representado no *Anexo 10*.

Foi realizado um teste preliminar modificando-se um eletrodo de CV com o compósito Mg-Al/ óxido de grafeno e a enzima GOx da mesma forma como descrita anteriormente. Foi observado comportamento similar ao descrito anteriormente, com boa resposta catalítica do eletrodo preparado, demonstrando boa reprodutibilidade do método. Ainda, para avaliar se o método de preparação do eletrodo influenciava na resposta, foi preparado um eletrodo de CV com o compósito Mg-Al/ óxido de grafeno e a enzima GOx, utilizando-se a mesma metodologia descrita na seção 3.3.1.1, *metodologia 2*, similar ao descrito para preparar o eletrodo modificado com o Mg-Al-CO₃. E no caso do eletrodo preparado com o compósito Mg-Al/ óxido de grafeno e GOx, por este método, observou-se uma resposta parecida com as obtidas anteriormente para este mesmo sistema. Como experimento controle, foi modificado um eletrodo de CV somente com a enzima GOx e glutaraldeído, e os experimentos foram realizados saturando-se a solução eletrolítica com O₂. Neste caso, foi obtido um pico de oxigênio não tão bem definido em aproximadamente -0,7 V, e com as sucessivas adições de glicose, foi observada uma diminuição na corrente, não tão pronunciada e linear quanto para a enzima GOx suportada, indicando a necessidade do material suporte na reação catalítica.

Dessa forma, esse material compósito utilizado exibiu importância na imobilização e estabilização da enzima, melhorando a condutividade do eletrodo¹⁵¹, sugerindo que este pode ser utilizado também para a preparação de biossensores eletroquímicos de glicose.

Na *Tabela 12* está representado um resumo dos parâmetros analíticos obtidos, como sensibilidade e faixa de linearidade para todos os eletrodos modificados entre os materiais/GOx obtidos neste trabalho.

Tabela 12: Características Analíticas dos eletrodos modificados com HDL e derivados/GOx.

Eletrodo Modificado	Faixa Linear	Sensibilidade
Mg-Al-CO ₃ /GOx/ECV ^a	0- 0,625 mmol L ⁻¹	1,83 μAmmol ⁻¹ L
Mg-Al-CO ₃ /Grafite/GOx/EPC ^a	0- 0,875 mmol L ⁻¹	0,93 μAmmol ⁻¹ L
Mg-Al-VBS carbonizado/Grafite/GOx/EPC ^a	12,5- 75 μmol L ⁻¹	16,23 nAμmol ⁻¹ L
Mg-Al-óxido de grafeno/GOx/ECV ^a	0- 0,625 mmol L ⁻¹	1,46 μAmmol ⁻¹ L
Mg-Al-óxido de grafeno/GOx/ECV ^b	0- 0,625 mmol L ⁻¹	11,67 μAmmol ⁻¹ L

^a = experimento realizado saturando-se a solução eletrolítica com ar sintético;

^b = experimento realizado saturando-se a solução eletrolítica com oxigênio.

Estes valores de sensibilidade obtidos para os eletrodos modificados com os HDL e derivados e a enzima GOx, são comparáveis com outros trabalhos reportados na literatura que exploraram também a eletroquímica direta desta enzima. Como por exemplo Wang e colaboradores⁹⁵ prepararam um biossensor baseado na combinação de Polidopamina, Nanopartículas de Prata, Nanotubos de Carbono, Nafion e GOx (Nafion/GOx/Ag-Pdop@CNT/ECV), e utilizaram o mesmo método para detecção de glicose, através da medida da diminuição de oxigênio causada pela reação catalisada pela enzima GOx, os autores obtiveram resposta em uma faixa linear entre 50 e 1100 μmol L⁻¹ e sensibilidade da ordem de 3,1 μAmmol⁻¹ L. Liu e Ju¹⁵⁵ reportaram a preparação de um eletrodo de pasta de carbono com a enzima GOx imobilizada em partículas coloidais de Ouro, e também monitoraram o pico de redução do oxigênio com as adições de glicose, obtendo uma sensibilidade de 8,4 μAmmol⁻¹ L em uma faixa linear entre 0,04 e 0,28 mmol L⁻¹. Ainda Liu e colaboradores¹⁵⁶ reportaram a eletroquímica direta da GOx baseada em eletrodos de carbono vítreo modificados com quantum-dots e nanotubos de carbono, onde o biossensor preparado exibiu uma sensibilidade de 1,018 μAmmol⁻¹ L em uma faixa linear de até 0,7 mmol L⁻¹ de glicose.

Ainda outros trabalhos reportados na literatura^{118,119} de biossensores entre a enzima GOx e HDL utilizando-se mediadores para a quantificação de glicose, exibiram como por exemplo¹¹⁹ sensibilidade de 65 mAmmol⁻¹ Lcm⁻² em uma faixa linear de 10 - 25 μmol L⁻¹ de glicose, e outro trabalho¹¹⁸ que exibiu uma sensibilidade de 60 mAmmol⁻¹ Lcm⁻² em uma faixa linear de 6,7×10⁻⁶ até 3,86×10⁻⁴ mol L⁻¹ de glicose.

5. Conclusões

5. Conclusões

Os métodos de síntese e caracterização dos Hidróxidos Duplos Lamelares de Mg-Al e Zn-Al intercalados com o ânion carbonato apresentaram resultados satisfatórios. As análises de difração de raios X no pó para os HDL preparados mostraram materiais com estrutura lamelar e com elevada cristalinidade, e para o HDL de Zn-Al-CO₃ foi observado traços da fase de ZnO.

Através das análises termogravimétricas e térmicas diferenciais foi possível observar as principais etapas de decomposição dos materiais, concordando com resultados da literatura.

Os espectros de IV apresentaram bandas características do ânion intercalados.

A análise da morfologia dos materiais mostrou que a maioria deles forma folhas com partículas agregadas na superfície, características importantes para a adsorção da enzima na superfície destes materiais.

Pelas análises de difração de raios X no pó para o HDL preparado com o ânion 4-vinil benzeno sulfonato (VBS) foi possível observar um material com estrutura lamelar e com elevada cristalinidade. A partir das etapas de tratamento térmico e de carbonização o material foi perdendo a cristalinidade até se tornar um material totalmente amorfo, após a desmineralização com ácido. Por meio da análise da morfologia destes materiais foi possível observar a porosidade dos mesmos.

Através das análises de Difração de raios X no pó para o compósito de Mg-Al/óxido de grafeno, foi possível observar um material com estrutura lamelar e ainda uma fase atribuída ao óxido de grafeno.

Os eletrodos preparados com o HDL de Mg-Al-CO₃ e a enzima GOx mostraram boa resposta eletroquímica frente à oxidação do substrato glicose, apresentando boa sensibilidade de 1,83 $\mu\text{Ammol}^{-1}\text{L}$, boa estabilidade, e reprodutibilidade do método intra e inter ensaio. O eletrodo de Pasta de Carbono preparado com este material apresentou o pico do cofator FAD bem mais definido do que os eletrodos de carbono vítreo preparados com o mesmo material, este também exibiu boa resposta catalítica e sensibilidade.

Para os eletrodos preparados com o HDL de Zn-Al-CO₃ e a enzima GOx foi possível observar somente um pico de redução da molécula FAD, e alguns processos redox que deverão ser melhor estudados.

No estudo eletroquímico para o compósito de carbono derivado de HDL e a enzima GOx, também foi possível observar boa resposta eletrocatalítica, mostrando boa sensibilidade de $16,23 \text{ nA}\mu\text{mol}^{-1} \text{ L}$, comparável com os outros eletrodos obtidos.

Para os eletrodos preparados com o compósito de Mg-Al/óxido de grafeno e a enzima GOx também foi possível obter boa resposta eletroquímica, com um comportamento similar aos demais.

Estes resultados demonstram que possivelmente devido às propriedades de elevada área superficial, propriedades de adsorção por interação eletrostática, dentre outras, que estes materiais possuem, e devido ao sinergismo que foi obtido entre os materiais e a enzima GOx, proporcionaram melhora na sua estabilização, boa resposta eletroquímica dos eletrodos modificados preparados, e que estes materiais possuem potenciais aplicações na preparação de biossensores de glicose.

6. Perspectivas

6.Perspectivas

Por meio deste trabalho foi possível o estudo do comportamento eletroquímico da enzima Glicose Oxidase imobilizada em eletrodos modificados com HDL e derivados. Os resultados obtidos mostraram que o sinergismo entre os materiais e a enzima GOx proporcionou boa resposta eletroquímica e a possibilidade de aplicação destes sistemas como biossensores de glicose.

Assim, estudos futuros poderão ser realizados através da combinação destes materiais com nanopartículas metálicas para melhorar a transferência direta de elétrons e o processamento destes materiais, visando sua aplicabilidade como biossensores eletroquímicos;

Pode-se ainda, melhorar a performance dos estudos eletroquímicos da Glicose Oxidase com o HDL de Zn-Al-CO₃, através da preparação de eletrodos de carbono vítreo modificados com filmes destes materiais;

Ainda estudos adicionais utilizando mediadores redox, como por exemplo o ferroceno carboxilato, já foram iniciados, visando melhora na resposta eletrocatalítica da enzima glicose oxidase e devem ser completados;

Pretende-se ainda realizar estudos eletroquímicos entre Sais de Hidróxidos Básicos Lamelares de Cu-Zn-acetato, que também já foram iniciados, visando a utilização para a preparação de eletrodos modificados com a enzima Glicose Oxidase e estudo de suas propriedades eletroquímicas;

Outra possibilidade é a imobilização da enzima glicose oxidase em HDL pelo método direto de coprecipitação, com a realização de estudos através de Voltametria Cíclica deste material e comparação com os materiais obtidos anteriormente;

Estudos preliminares utilizando HDL intercalado com o mediador ferroceno carboxilato, já vêm sendo desenvolvidos para a imobilização de outras enzimas redox, como por exemplo, a enzima álcool desidrogenase, em eletrodos de pasta de carbono, sem a obtenção de resposta satisfatória, por enquanto. Então estudos futuros visam a melhoria destes, para a aplicação deste sistema na preparação de biossensores de etanol.

7. Referências Bibliográficas

7.Referências Bibliográficas

1. Vaccari, A. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. *Catal. Today* **41**, 53–71 (1998).
2. Vaccari, A. Clays and catalysis: a promising future. *Appl. Clay Sci.* **14**, 161–198 (1999).
3. Reichle, W. T. Synthesis of Anionic Clay Minerals (Mixed Metal Hydroxides, Hydrotalcite). *Solid States Ionics* **22**, 135–141 (1986).
4. Rajamathi, M., Thomas, G. S., Kamath, P. V. The many ways of making anionic clays. *J. Chem. Sci.* **113**, 671–680 (2001).
5. Ghadiri, M., Chrzanowski, W., Rohanizadeh, R. Biomedical applications of cationic clay minerals. *RSC Adv.* **5**, 29467–29481 (2015).
6. Carrado, K. A., Kostapapas, A., Suib, S. L. Layered double hydroxides (LDHs). *Solid State Ionics* **26**, 77–86 (1988).
7. Crepaldi, E. L., Valim, J. B. Layered Double Hydroxides: Structure, Synthesis, Properties and Applications. *Quim. Nova* **21**, 300–311 (1998).
8. Braterman, P. S., Xu, Z. P. (Gordon). Layered Double Hydroxides: Self-Assembly and Multiple Phases. *Dekker Encycl. Nanosci. Nanotechnology, Second Ed.* 1841 (2009).
9. Tronto, J., Bordonal, A. C., Naal, Z., Valim, J. B. Conducting polymers / layered double hydroxides intercalated nanocomposites. *Mater. Sci. - Adv. Top.* 3–32 (2013).
10. Cunha, V. R. R., Ana, A. M., Constantino, V. R. L., Tronto, J., Valim, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: Nanopartículas inorgânicas para armazenamento e liberação de espécies de interesse biológico e terapêutico. *Quim. Nova* **33**, 159–171 (2010).
11. Feitknecht, W. The formation of double hydroxides between bi- and tri-valent metals. *Helv. Chim. Acta* **25**, 555–569 (1942).
12. Feitknecht, W., Gerber, M. Acknowledgement of the double hydroxide and base double salt III Manesium-aluminium double hydroxide. *Helv. Chim. Acta* **27**, 131–137 (1942).
13. Brindley, G. W., Kikkawa, S. A crystal-chemical study of Mg, Al and Ni, Al hydroxy-perchlorates and hydroxy- carbonates. *Am. Mineral.* **64**, 836–843 (1979).
14. Tichit, D., Vaccari, A. Recent catalytic applications of hydrotalcite-type anionic clays (layered double hydroxides). *Appl. Clay Sci.* **13**, 311–315 (1998).
15. Forano, C., Hibino, T., Leroux, F., Taviot-Guého, C. Chapter 13.1 Layered Double Hydroxides. *Dev. Clay Sci.* **1**, 1021–1095 (2006).
16. Cavani, F., Trifiro, F., Vaccari, A. Hydrotalcite-Type Anionic Clays: Preparation, Properties And Applications. *Catal. Today* **11**, 173–301 (1991).

17. Miyata, S. Anion-Exchange Properties of Hydrotalcite-Like Compounds. *Clays Clay Miner.* **31**, 305–311 (1983).
18. Benício, L. P. F., Silva, R. A., Lopes, J. A., Eulálio, D., dos Santos, R. M. M., de Aquino, L. A., Vergütz, L., Novais, R. F., da Costa, L. M., Pinto, F. G., Tronto, J. Layered double hydroxides: nanomaterials for applications in agriculture. *Rev. Bras. Cienc. do Solo* **39**, 1–13 (2015).
19. Zhang, F., Xiang, X., Li, F., Duan, X. Layered double hydroxides as catalytic materials: Recent development. *Catal. Surv. from Asia* **12**, 253–265 (2008).
20. Velu, S., Suzuki, K., Osaki, T. A comparative study of reactions of methanol over catalysts derived from NiAl- and CoAl-layered double hydroxides and their Sn-containing analogues. *Catal. Letters* **69**, 43–50 (2000).
21. Zou, X., Goswami, A., Asefa, T. Efficient Noble Metal-Free (Electro)Catalysis of Water and Alcohol Oxidations by Zinc – Cobalt Layered Double Hydroxide. (2013).
22. Li, C., Wei, M., Evans, D. G., Duan, X. Recent advances for layered double hydroxides (LDHs) materials as catalysts applied in green aqueous media. *Catal. Today* **247**, 163–169 (2015).
23. Winter, F., Van Dillen, A. J., de Jong, K. P. Supported hydrotalcites as highly active solid base catalysts. *Chem. Commun. (Camb)*. 3977–3979 (2005).
24. Liu, P., Guan, Y., van Santen, R. A., Li, C., Hensen, E. J. M. Aerobic oxidation of alcohols over hydrotalcite-supported gold nanoparticles: the promotional effect of transition metal cations. *Chem. Commun. (Camb)*. **47**, 11540–2 (2011).
25. Fan, G., Li, F., Evans, D. G., Duan, X. Catalytic applications of layered double hydroxides: recent advances and perspectives. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 7040–66 (2014).
26. Miyata, S. Adsorption of N₂, O₂, CO₂ and H₂ on Hydrotalcite-Like System: Mg²⁺-Al³⁺-(Fe(CN)₆)⁴⁻. *Clays Clay Miner.* **26**, 441–447 (1978).
27. Alexandrica, M. C., Silion, M., Hritcu, D., Popa, M. I. Layered Double Hydroxides As Adsorbents for Anionic Dye Removal From Aqueous Solutions. *Environ. Eng. Management Journal* **14**, 381–388 (2015).
28. Bruna, F.; Celis, R.; Pavlovic, I.; Barriga, C.; Cornejo, J.; Ulibarri, M. A. Layered double hydroxides as adsorbents and carriers of the herbicide (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid (MCPA): Systems Mg-Al, Mg-Fe and Mg-Al-Fe. *J. Hazard. Mater.* **168**, 1476–1481 (2009).
29. Elbasuney, S. Surface engineering of layered double hydroxide (LDH) nanoparticles for polymer flame retardancy. *Powder Technol.* **277**, 63–73 (2015).
30. Hibino, T. Delamination of layered double hydroxides containing amino acids. *Chem. Mater.* **16**, 5482–5488 (2004).
31. Nalawade, P., Aware, B., Kadam, V. J., Hirlekar, R. S. Layered double hydroxides : A review. *Ind. Res.* **68**, 267–272 (2009).
32. Tamura, H., Chiba, J., Ito, M., Takeda, T., Kikkawa, S. Synthesis and

- characterization of hydrotalcite-ATP intercalates. *Solid State Ionics* **172**, 607–609 (2004).
33. Del Hoyo, C. Layered double hydroxides and human health: An overview. *Appl. Clay Sci.* **36**, 103–121 (2007).
34. Tronto, J., Crepaldi, E., Pavan, P. C., De Paula, C., Valim, J. Organic anions of pharmaceutical interest intercalated in magnesium aluminum LDHs by two different methods. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **356**, 227–237 (2001).
35. Tronto, J., Cardoso, L. P., Valim, J. B., Marchetti, J. M., Bentley, M. V. B. Studies of the intercalation and ‘in vitro’ liberation of amino acids in magnesium aluminium layered double hydroxides. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **390**, 79–89 (2002).
36. Feng, Z., Yang, Z., Yang, B., Zhang, Z., Xie, X. The application of Co–Al hydrotalcite as a novel additive of positive material for nickel–metal hydride secondary cells. *J. Power Sources* **266**, 22–28 (2014).
37. Huang, S.; Zhu, G-N.; Zhang, C.; Tjiu, W. W.; Xia, Y-Y.; Liu, T. Immobilization of Co–Al Layered Double Hydroxides on Graphene Oxide Nanosheets: Growth Mechanism and Supercapacitor Studies. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 2242–2249 (2012).
38. Scavetta, E., Berrettoni, M., Nobili, F., Tonelli, D. Electrochemical characterisation of electrodes modified with a Co/Al hydrotalcite-like compound. *Electrochim. Acta* **50**, 3305–3311 (2005).
39. Nejati, K., Asadpour-Zeynali, K. Electrochemical synthesis of nickel-iron layered double hydroxide: Application as a novel modified electrode in electrocatalytic reduction of metronidazole. *Mater. Sci. Eng. C* **35**, 179–184 (2014).
40. Liu, L-M., Jiang, L-P., Liu, F., Lu, G-Y., Abdel-Halim, E. S., Zhu, J-J. Hemoglobin/DNA/layered double hydroxide composites for biosensing applications. *Anal. Methods* **5**, 3565 (2013).
41. Gong, J., Guan, Z., Song, D. Biosensor based on acetylcholinesterase immobilized onto layered double hydroxides for flow injection/amperometric detection of organophosphate pesticides. *Biosens. Bioelectron.* **39**, 320–323 (2013).
42. Chen, Z., Guo, J., Zhou, T., Zhang, Y., Chen, L. A novel nonenzymatic electrochemical glucose sensor modified with Ni/Al layered double hydroxide. *Electrochim. Acta* **109**, 532–535 (2013).
43. Indira, L., Dixit, M., Kamath, P. V. Electrosynthesis of layered double hydroxides of nickel with trivalent cations. *J. Power Sources* **52**, 93–97 (1994).
44. Crepaldi, E. L., Pavan, P. C., Valim, J. B. Comparative Study of the Coprecipitation Methods for the Preparation of Layered Double Hydroxides. *J. Braz. Chem. Soc.* **11**, 64–70 (2000).
45. Crepaldi, E. L., Pavan, P. C., Valim, J. B. A new method of intercalation by anion exchange in layered double hydroxides. *Chem. Commun.* 155–156 (1999).

46. Crepaldi, E. L., Pavan, P. C., Valim, J. B. Anion exchange in layered double hydroxides by surfactant salt formation. *J. Mater. Chem.* **10**, 1337–1343 (2000).
47. Bish, D. L. Anion-Exchange in Takovite - Applications to Other Hydroxide Minerals. *Bull. Mineral.* **103**, 170–175 (1980).
48. Jing He, Min Wei, Bo Li, Yu Kang, David G. Evans, X. D. in *Structure and Bonding*, 119 89–119 (2006).
49. Costantino, U., Marmottini, F., Nocchetti, M., Vivani, R. New Synthetic Routes to Hydrotalcite-Like Compounds – Characterisation and Properties of the Obtained Materials. *Eur. J. Inorg. Chem.* **1998**, 1439–1446 (1998).
50. Lopez, T., Bosch, P., Ramos, E., Gomez, R., Novaro, O., Acosta, D., Figueras, F. Synthesis and characterization of sol-gel hydrotalcites. Structure and texture. *Langmuir* **12**, 189–192 (1996).
51. Indira, L., Kamath, P. V. Electrogenation of base by cathodic reduction of anions: novel one-step route to unary and layered double hydroxides (LDHs). *J. Mater. Chem.* **4**, 1487 (1994).
52. Kooli, E., Depige, C., Ennaqadi, A., De Roy, A., Besse, J. E. Rehydration of Zn-Al Layered Double Hydroxides. *Clays Clay Miner.* **45**, 92–98 (1997).
53. Veloso, C., Rangel, M. d. C. Preparation of Porous Carbon by Sequential Templating. *Quim. Nova* **32**, 2133–2141 (2009).
54. Prevot, V., Geraud, E., Stimpfling, T., Ghanbajac, J., Leroux, F. Hierarchically structured carbon replica of hybrid layered double hydroxide. *New J. Chem* **35**, 169–177 (2011).
55. Stimpfling, T., Leroux, F. Carbon composites and replicas from intercalated layered double hydroxides. *Appl. Clay Sci.* **50**, 367–375 (2010).
56. Stimpfling, T., Leroux, F. Supercapacitor-Type Behavior of Carbon Composite and Replica Obtained from Hybrid Layered Double Hydroxide Active Container. *Chem. Mater.* **22**, 974–987 (2010).
57. Prevot, V., Leroux, F., Geraud, E. Synthesis and characterization of macroporous MgAl LDH using polystyrene spheres as template. *J. of Phys and Chem of Solids.* **67**, 903–908 (2006).
58. Zhao, M., Zhang, Q., Huang, J., Wei, F. Hierarchical Nanocomposites Derived from Nanocarbons and Layered Double Hydroxides - Properties , Synthesis , and Applications. *Adv. Funct. Mater.* 675–694 (2012).
59. Xu, Z. P., Xu, R., Zeng, H. C. Sulfate-functionalized carbon/metal-oxide nanocomposites from hydrotalcite-like compounds. *Nano Lett.* **1**, 703–706 (2001).
60. dos Santos, R. M. M., Gonçalves, R. G. L., Pinto, M. de. C. E., Prado, R. G., Leopoldo, V. R. C., da Costa, L. M., Pinto, F. G., Tronto, J. Removal of Dodecylbenzenesulphonate and Cetyltrimethylammonium Bromide Using a Carbon Composite Derived from Modified Zn – Al-Layered Double Hydroxide. *Adsorpt. Sci. Technol.* **31**, 711–728 (2013).

61. Han, S., Sohn, K., Hyeon, T. Fabrication of New Nanoporous Carbons through Silica Templates and Their Application to the Adsorption of Bulky Dyes. *Chem. Mater.* **12**, 3337–3341 (2000).
62. Wang, Y., Peng, W., Liu, L., Tang, M., Gao, F., Li, M. Enhanced conductivity of a glassy carbon electrode modified with a graphene-doped film of layered double hydroxides for selectively sensing of dopamine. *Microchim. Acta* **174**, 41–46 (2011).
63. Garcia-Gallastegui, A., Iruretagoyena, D., Gouvea, V., Mokhtar, M., Asiri, A. M., Basahel, S. N., Al-Thabaiti, S. A., Alyoubi, A. O., Chadwick, D., Shaffer, M. S. P. Graphene oxide as support for layered double hydroxides: Enhancing the CO₂ adsorption capacity. *Chem. Mater.* **24**, 4531–4539 (2012).
64. Zhang, L., Zhang, X., Shen, L., Gao, B., Hao, L., Lu, X., Zhang, F., Ding, B., Yuan, C. Enhanced high-current capacitive behavior of graphene / CoAl-layered double hydroxide composites as electrode material for supercapacitors. *J. Power Sources* **199**, 395–401 (2012).
65. Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes — new trends. *Appl. Clay Sci.* **27**, 159–177 (2004).
66. Yoo, E.-H., Lee, S.-Y. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel)*. **10**, 4558–76 (2010).
67. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Voros, J., Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **8**, 1400–1458 (2008).
68. Pohanka, M., Republic, C. Electrochemical biosensors — principles and applications. *Methods* **6**, 57–64 (2008).
69. Frew, J. E., Hill, H. A. O. Electrochemical biosensors. *Anal. Chem.* **59**, 933A–944A (1987).
70. Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., Heineman, W. R. Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1747–1763 (2010).
71. Stoytcheva, M., Zlatev, R., Velkova, Z., Valdez, B., Ovalle, M. Analytical Characteristics of Electrochemical Biosensors. *Port. Electrochim. Acta* **27**, 353–362 (2009).
72. Tonelli, D., Scavetta, E., Giorgetti, M. Layered-double-hydroxide-modified electrodes: Electroanalytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 603–614 (2013).
73. Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. Glucose oxidase—an overview. *Biotechnol. Adv.* **27**, 489–501 (2009).
74. Hecht, H. J., Schomburg, D., Kalisz, H., Schmid, R. D. The 3D structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Implications for the use of GOD as a biosensor enzyme. *Biosens. Bioelectron.* **8**, 197–203 (1993).
75. Oztekin, Y., Ramanaviciene, A., Yazicigil, Z., Solak, A. O., Ramanavicius, A. Direct electron transfer from glucose oxidase immobilized on polyphenanthroline-modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 2541–6 (2011).

76. Falk, M., Blum, Z., Shleev, S. Direct electron transfer based enzymatic fuel cells. *Electrochim. Acta* **82**, 191–202 (2012).
77. Zhang, Y., Chen, X., Wang, J., Yang, W. The Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Based on Layered Double-Hydroxide Nanosheets. *Electrochem. Solid-State Lett.* **11**, F19 (2008).
78. Hwa, K.-Y., Subramani, B. Synthesis of zinc oxide nanoparticles on graphene-carbon nanotube hybrid for glucose biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **62**, 127–33 (2014).
79. Wilson, R. Review article Glucose oxidase : an ideal enzyme. **7**, 165–185 (1992).
80. Zhang, Y., Li, Y., Wu, W., Jiang, Y., Hu, B. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **60**, 271–6 (2014).
81. Meredith, M. T., Minteer, S. D. Biofuel Cells: Enhanced Enzymatic Bioelectrocatalysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **5**, 157–179 (2012).
82. Wang, J. Electrochemical glucose biosensors. *Electrochem. Sensors, Biosens. their Biomed. Appl.* 57–69 (2008). doi:10.1016/B978-012373738-0.50005-2
83. Ferri, S., Kojima, K., Sode, K. Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases : **5**, 1068–1076 (2011).
84. Wang, G., He, X., Wang, L., Gu, A., Huang, Y., Fang, B. Non-enzymatic electrochemical sensing of glucose. *Microchim. Acta* **180**, 161–186 (2012).
85. Wang, X., Uchiyama, S. Polymers for Biosensors Construction.. *State Art Biosens. - Gen. Asp.* Chapter 3, 67-86 (2013).
86. Mousty, C., Prévot, V. Hybrid and biohybrid layered double hydroxides for electrochemical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 3513–3523 (2013).
87. Zhao, Z., Jiang, H. Enzyme-based Electrochemical Biosensors. *Biosensors-Intech.* 1–23 (2010).
88. Vial, S., Forano, C., Shan, D., Mousty, C., Barhoumi, H., Martelet, C., Jaffrezic, N. Nanohybrid-layered double hydroxides / urease materials : Synthesis and application to urea biosensors. *Mater. Sci. Eng.* **26**, 387–393 (2006).
89. Shan, D., Yao, W., Xue, H. Amperometric Detection of Glucose with Glucose Oxidase Immobilized in Layered Double Hydroxides. *Electroanalysis* **18**, 1485–1491 (2006).
90. Choy, J., Park, M., Oh, J. Bio-Nanohybrids Based on Layered Double Hydroxide. 275–281 (2006).
91. Scavetta, E., Ballarin, B., Corticelli, C., Gualandi, I., Tonelli, D., Prevot, V., Forano, C., Mousty, C. An insight into the electrochemical behavior of Co / Al layered double hydroxide thin films prepared by electrodeposition. *J. Power Sources* **201**, 360–367 (2012).

92. Zebda, A., Tingry, S., Innocent, C., Cosnier, S., Forano, C., Mousty, C. Hybrid layered double hydroxides-polypyrrole composites for construction of glucose / O₂ biofuel cell. *Electrochim. Acta* **56**, 10378–10384 (2011).
93. Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C. HRP Wiring by Redox Active Layered Double Hydroxides: Application to the Mediated H₂O₂ Detection. *Anal. Lett.* **36**, 909–922 (2003).
94. Sun, W. Guo, Y., Lu, Y., Hu, A., Shi, F., Li, T., Sun, Z. Electrochemical biosensor based on graphene, Mg₂Al layered double hydroxide and hemoglobin composite. *Electrochim. Acta* **91**, 130–136 (2013).
95. Wang, Y., Liu, L., Li, M., Xu, S., Gao, F. Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. *Biosens. Bioelectron.* **30**, 107–11 (2011).
96. Zhang, X. Shen, L., Wang, M., Siqin, G., Tong, Z., Xu, R., Zhang, D., Ma, J., Liu, L. A novel glucose biosensor constructed by glucose oxidase immobilized with methylene blue intercalated layered lanthanum niobic acid nanocomposite. *Mater. Lett.* **135**, 39–42 (2014).
97. Wang, L., Bai, J., Bo, X., Zhang, X., Guo, L. A novel glucose sensor based on ordered mesoporous carbon-Au nanoparticles nanocomposites. *Talanta* **83**, 1386–91 (2011).
98. Karuppiah, C., Palanisamy, S., Chen, S.-M., Veeramani, V., Periakaruppan, P. Direct electrochemistry of glucose oxidase and sensing glucose using a screen-printed carbon electrode modified with graphite nanosheets and zinc oxide nanoparticles. *Microchim. Acta* **181**, 1843–1850 (2014).
99. Gao, Y., Yang, T., Yang, X., Zhang, Y., Xiao, B. Direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose biosensing on a hydroxyl fullerenes modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* **60**, 30–34 (2014).
100. Chen, L., Kong, X., Yan, D., Wei, M., Duan, X. Fabrication of Acid Violet 34/Nickel Hydroxide Ultrathin Film and Its Electrocatalytic Performance for Glucose. *Electroanalysis* **24**, 1192–1200 (2012).
101. Li, X. Liu, J., Ji, X., Jiang, J., Ding, R., Hu, Y., Hu, A., Huang, X. Ni/Al layered double hydroxide nanosheet film grown directly on Ti substrate and its application for a nonenzymatic glucose sensor. *Sensors Actuators, B Chem.* **147**, 241–247 (2010).
102. Guo, Y., Xiao, Y., Zhang, L., Song, Y.-F. Fabrication of (Calcein–ZnS)_n Ordered Ultrathin Films on the Basis of Layered Double Hydroxide and Its Ethanol Sensing Behavior. *Ind. Eng. Chem. Res.* **51**, 8966–8973 (2012).
103. Barhoumi, H., Maaref, A., Rammah, M., Martelet, C., Jaffrezic, N., Mousty, C., Vial, S., Forano, C. Urea biosensor based on Zn₃Al-Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures. *Mater. Sci. Eng. C* **26**, 328–333 (2006).
104. Mignani, A., Corticelli, C., Tonelli, D., Scavetta, E. A new pH sensor based on a glassy carbon electrode coated with a Co/Al layered double hydroxide. *Electroanalysis* **23**, 1745–1751 (2011).

105. Shi, W., Ji, X., Zhang, S., Wei, M., Evans, D. G., Duan, X. Fluorescence Chemosensory Ultrathin Films for Cd^{2+} Based on the Assembly of Benzothiazole and Layered Double Hydroxide. *J. Phys. Chem. C* **115**, 20433–20441 (2011).
106. Wang, J., Cui, L., Yin, H., Dong, J., Ai, S. Determination of hydrogen peroxide based on calcined layered double hydroxide-modified glassy carbon electrode in flavored beverages. *J. Solid State Electrochem.* **16**, 1545–1550 (2012).
107. Leroux, F., Raymundo-pin, E. Textural and electrochemical properties of carbon replica obtained from styryl organo-modified layered double hydroxide { . 2074–2081 (2006).
108. Wang, Y., Chen, S., Ni, F., Gao, F., Li, M. Peroxidase-Like Layered Double Hydroxide Nanoflakes for Electrocatalytic Reduction of H_2O_2 . *Electroanalysis* **21**, 2125–2132 (2009).
109. Li, M., Chen, S., Ni, F., Wang, Y., Wang, L. Layered double hydroxides functionalized with anionic surfactant: Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin. *Electrochim. Acta* **53**, 7255–7260 (2008).
110. Shi, Q., Han, E., Shan, D., Yao, W., Xue, H. Development of a high analytical performance amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized in a composite matrix: layered double hydroxides/chitosan. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **31**, 519–526 (2008).
111. Ding, S.-N., Shan, D., Xue, H.-G., Zhu, D.-B., Cosnier, S. Glucose oxidase immobilized in alginate/layered double hydroxides hybrid membrane and its biosensing application. *Anal. Sci.* **25**, 1421–1425 (2009).
112. Xu, Y. Liu, X., Ding, Y., Luo, L., Wang, Y., Zhang, Y., Xu, Y. Preparation and electrochemical investigation of a nano-structured material $\text{Ni}^{2+}/\text{MgFe}$ layered double hydroxide as a glucose biosensor. *Appl. Clay Sci.* **52**, 322–327 (2011).
113. Scavetta, E., Guadagnini, L., Mignani, A., Tonelli, D. Anti-interferent properties of oxidized nickel based on layered double hydroxide in glucose amperometric biosensors. *Electroanalysis.* **20**, 2199–2204 (2008).
114. Prevot, V., Forano, C., Khenifi, A., Ballarin, B., Scavetta, E., Mousty, C. A templated electrosynthesis of macroporous NiAl layered double hydroxides thin films. *Chem. Commun. (Camb).* **47**, 1761–1763 (2011).
115. Mignani, A., Luciano, G., Lanteri, S., Leardi, R., Scavetta, E., Tonelli, D. Optimization of a glucose biosensor setup based on a Ni/Al HT matrix. *Anal. Chim. Acta.* **599**, 36–40 (2007).
116. Mignani, A., Scavetta, E., Guadagnini, L., Tonelli, D. Comparative study of protective membranes for glucose biosensors based on electrodeposited hydrotalcites. *Sensors Actuators, B Chem.* **136**, 196–202 (2009).
117. Colombari, M., Ballarin, B., Carpani, I., Guadagnini, L., Mignani, A., Scavetta, E., Tonelli, D. Glucose Biosensors Based on Electrodes Modified with Ferrocene Derivatives Intercalated into Mg/Al Layered Double Hydroxides. *Electroanalysis.* **19**, 2321–2327 (2007).

118. Shan, D., Yao, W., Xue, H. Electrochemical study of ferrocenemethanol-modified layered double hydroxides composite matrix: application to glucose amperometric biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 432–7 (2007).
119. Mousty, C., Forano, C., Fleutot, S., Dupin, J.-C. Electrochemical Study of Anionic Ferrocene Derivatives Intercalated in Layered Double Hydroxides: Application to Glucose Amperometric Biosensors. *Electroanalysis* **21**, 399–408 (2009).
120. Mousty, C., Leroux, F. LDHs as electrode materials for electrochemical detection and energy storage: supercapacitor, battery and (bio)-sensor. *Recent Pat. Nanotechnol.* **6**, 174–92 (2012).
121. Cosnier, S., Mousty, C., Gondran, C., Lepellec, A. Entrapment of enzyme within organic and inorganic materials for biosensor applications: Comparative study. *Mater. Sci. Eng. C* **26**, 442–447 (2006).
122. Forano, C., Vial, S., Mousty, C. Nanohybrid enzymes - Layered double hydroxides: Potential applications. *Curr. Nanosci.* **2**, 283–294 (2006).
123. Feitknecht, W. On the alpha-form of hydroxide divalent metals. *Helv. Chim. Acta* **245**, 766–784 (1938).
124. Fu, S., Fan, G., Yang, L., Li, F. Non-enzymatic glucose sensor based on Au nanoparticles decorated ternary Ni-Al layered double hydroxide/single-walled carbon nanotubes/graphene nanocomposite. *Electrochim. Acta* **152**, 146–154 (2015).
125. Kang, X., Wang, J., Wu, H., Aksay, I. A., Liu, J., Lin, Y. Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 901–905 (2009).
126. Aguilar-Vargas, V., Valente, J. S., González, I. Electrochemical characterization of carbon paste electrodes modified with MgZnGa and ZnGaAl hydrotalcite-like compounds. 3145–3152 (2013).
127. Shan, D., Cosnier, S., Mousty, C. Layered Double Hydroxides : An Attractive Material for Electrochemical Biosensor Design. *Anal. Chem.* **75**, 3872–3879 (2003).
128. Roy, A. , Forano, C., Besse, J. P. Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry. *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.* **202**, 127–ETR. (1991).
129. Miyata, S. the Syntheses of Hydrotalcite-Like Physico-Chemical Properties I: The Systems $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-NO}_3$, $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}$, $\text{Mg}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-ClO}_4$, $\text{Ni}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}$ And $\text{Zn}^{2+}\text{-Al}^{3+}\text{-Cl}$. *Clays Clay Miner.* **23**, 369–375 (1975).
130. Rives, V. Characterisation of layered double hydroxides and their decomposition products. *Mater. Chem. Phys.* **75**, 19–25 (2002).
131. Yang, W., Kim, Y., Liu, P. K. T., Sahimi, M., Tsotsis, T. T. A study by in situ techniques of the thermal evolution of the structure of a Mg-Al- CO_3 layered double hydroxide. *Chem. Eng. Sci.* **57**, 2945–2953 (2002).
132. Petrovic, S. Cyclic Voltammetry of Hexachloroiridate(IV): An Alternative to the Electrochemical Study of the Ferricyanide Ion. *Chem. Educ.* **5**, 231–235 (2000).

133. Iorio, M., De Martino, A., Violante, A., Pigna, M., Capasso, R. Synthesis, characterization, and sorption capacity of layered double hydroxides and their complexes with polymerin. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 5523–5530 (2010).
134. Ali Ahmed, A. A., Abidin Talib, Z., Hussein, M. Z. Bin. ESR spectra and thermal diffusivity of ZnAl layered double hydroxide. *J. Phys. Chem. Solids* **73**, 124–128 (2012).
135. Klopprogge, J. T., Hickey, L., Frost, R. L. The effects of synthesis pH and hydrothermal treatment on the formation of zinc aluminum hydrotalcites. *J. Solid State Chem.* **177**, 4047–4057 (2004).
136. Toshiyuki Hibino, Y. Y., Kosuge Katsunori, T. A. Decarbonation Behavior of Mg-Al-CO₃ Hydrotalcite-Like Compounds During Heat Treatment. 427–432 (1995).
137. Mamat, M., Halim, K., Bulat, K., Aidil, M., Abdullah, A., Rahman, A. Zinc aluminium carbonate layered double hydroxide: syntheses and characterization. *J. Ultra Chem.* **7**, 430–435 (2011).
138. Dutta, K., Das, S., Pramanik, A. Concomitant synthesis of highly crystalline Zn-Al layered double hydroxide and ZnO: Phase interconversion and enhanced photocatalytic activity. *J. Colloid Interface Sci.* **366**, 28–36 (2012).
139. Angran, W., Yongzhong, B. A. O., Zhixue, W. Synthesis and Characterization of Proton-conducting Polymer Electrolytes Based on Acrylonitrile-Styrene Sulfonic Acid Copolymer / Layered Double Hydroxides Nanocomposites. *Chinese J. Chem. Eng.* **16**, 938–943 (2008).
140. Wang, J., Mei, X., Huang, L., Zheng, Q., Qiao, Y., Zang, K. Synthesis of layered double hydroxides/graphene oxide nanocomposite as a novel high-temperature CO₂ adsorbent. *J. Energy Chem.* **24**, 127–137 (2015).
141. Li, H., Wen, J., Yu, R., Meng, J., Wang, C.; Wang, C., Sun, S. Facile synthesis of a nanocomposite based on graphene and ZnAl layered double hydroxides as a portable shelf of a luminescent sensor for DNA detection. *Rsc Adv.* **5**, 9341–9347 (2015).
142. Li, M., Xu, S., Tang, M., Liu, L., Gao, F., Wang, Y. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase on graphene-modified electrode for electrocatalytic reduction towards H₂O₂. *Electrochim. Acta* **56**, 1144–1149 (2011).
143. Wang, L., Wang, D., Dong, X. Y., Zhang, Z. J., Pei, X. F., Chen, X. J., Chen, B., Jin, J. Layered assembly of graphene oxide and Co-Al layered double hydroxide nanosheets as electrode materials for supercapacitors. *Chem. Commun.* **47**, 3556–3558 (2011).
144. Leech, D., Kavanagh, P., Schuhmann, W. Enzymatic fuel cells: Recent progress. *Electrochim. Acta* **84**, 223–234 (2012).
145. Madhu, R., Devadas, B., Chen, S. M., Rajkumar, M. An enhanced direct electrochemistry of glucose oxidase at poly(taurine) modified glassy carbon electrode for glucose biosensor. *Anal. Methods* **6**, 9053–9058 (2014).
146. Palanisamy, S., Ezhil Vilian, A. T., Chen, S. M. Direct electrochemistry of

glucose oxidase at reduced graphene oxide/zinc oxide composite modified electrode for glucose sensor. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7**, 2153–2163 (2012).

147. Hong, J., Moosavi-Movahedi, A. A., Ghourchian, H., Rad, A. M., Rezaei-Zarchi, S. Direct electron transfer of horseradish peroxidase on Nafion-cysteine modified gold electrode. *Electrochim. Acta* **52**, 6261–6267 (2007).

148. Deng, C., Chen, J., Chen, X., Xiao, C., Nie, L., Yao, S. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on boron-doped carbon nanotubes modified electrode. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 1272–1277 (2008).

149. Kausaite-Minkstiniene, A., Mazeiko, V., Ramanaviciene, A., Oztekin, Y., Osman Solak, A., Ramanavicius, A. Evaluation of Some Redox Mediators in the Design of Reagentless Amperometric Glucose Biosensor. *Electroanalysis* **26**, 1528–1535 (2014).

150. Su, S., Sun, H., Xu, F., Yuwen, L., Fan, C., Wang, L. Direct electrochemistry of glucose oxidase and a biosensor for glucose based on a glass carbon electrode modified with MoS₂ nanosheets decorated with gold nanoparticles. *Microchim. Acta* **181**, 1497–1503 (2014).

151. Tang, W., Li, L., Zeng, X. A glucose biosensor based on the synergistic action of nanometer-sized TiO₂ and polyaniline. *Talanta* **131**, 417–423 (2015).

152. Wu, S., Ju, H., Liu, Y. Conductive mesocellular silica-carbon nanocomposite foams for immobilization, direct electrochemistry, and biosensing of proteins. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 585–592 (2007).

153. Liu, A. R., Huang, S. M. A glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized onto platinum nanoparticles modified graphene electrode. *Sci. CHINA Physics, Mech. Astron.* **55**, 1163–1167 (2012).

154. Liu, S., Tian, J., Wang, L., Luo, Y., Lu, W., Sun, X. Self-assembled graphene platelet-glucose oxidase nanostructures for glucose biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4491–4496 (2011).

155. Liu, S., Ju, H. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. *Biosens. Bioelectron.* **19**, 177–183 (2003).

156. Liu, Q., Lu, X., Li, J., Yao, X., Li, J. Direct electrochemistry of glucose oxidase and electrochemical biosensing of glucose on quantum dots/carbon nanotubes electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 3203–3209 (2007).

Anexos

Anexo 1

Figura A1: DRXP para Zn-Al-CO₃ com indexação dos picos de ZnO.

Anexo 2

Figura A2: Gráfico para obtenção de ponto de carga Zero da enzima GOx.

Anexo 3

Figura A3: Espectros de EDX para o material Mg-Al-VBS carbonizado desmineralizado.

Anexo 4

Figura A4: Espectros de EDX para o material Mg-Al-VBS carbonizado.

Anexo 5

Figura A5: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com $Mg-Al-CO_3/GOx$, saturado com Argônio à 100 mVs^{-1} .

Anexo 6

Figura A6: Curva Analítica da corrente catódica O_2 com a variação da concentração de glicose para o eletrodo de CV modificado com $Mg-Al-CO_3/GOx$.

Anexo 7

Figura A7: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de carbono vítreo modificado com $\text{Mg-Al-CO}_3/\text{GOx}$ saturado com ar sintético à 10 mVs^{-1} : a) com as sucessivas adições de glicose $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; e b) Curva I vs C glicose.

Anexo 8

Figura A8: Voltamogramas Cíclicos para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Zn-Al-CO₃/grafite/GOx: a) em Argônio à 10 mVs⁻¹; e b) saturado com O₂ : — com 0,25 mmol L⁻¹ de glicose e — com 1,125 mmol L⁻¹ de glicose à 10 mV s⁻¹.

Anexo 9

Figura A9: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de Pasta de Carbono modificado com Mg-Al-VBS carbonizado/grafite/GOx.

A equação da reta obtida foi: $1/I = 26,18665 (\pm 1,3385) \cdot (1/C) - 1,40695 (\pm 0,01962)$; $R=0,98453$.

Anexo 10

Figura A10: Gráfico de Linearização baseado em Lineweaver–Burk para o eletrodo de carbono vítreo modificado com Mg-Al/óxido de grafeno/GOx com saturação de O₂.

A equação da reta obtida foi: $1/I = 0,19421(\pm 0,0186) \cdot (1/C) - 0,44299(\pm 0,01648)$; $R=0,95576$.