UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GERMÁN AYALA VALENCIA

Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas

(Versão corregida)

Pirassununga
2013

GERMÁN AYALA VALENCIA

Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Andrés Vercik

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

Valencia, Germán Ayala
V152t Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas / Germán Ayala Valencia. -- Pirassununga, 2013.
121 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.
Orientador: Prof. Dr. Andrés Vercik.

1. Biossensor condutométrico 2. Quitosana 3. Nanopartículas de ouro 4. Peróxido de hidrogênio 5. Transporte eletrônico 6. Indústria de alimentos. I. Título.

Porque cada dia, cada esforço e cada luta, não teve sentido se não fosse por vocês. Porque sendo vocês o sentido da minha vida, foram a forca para superar cada obstáculo e porque somente através de vocês minhas obras tomam vida, por isto e muitas outras coisas que não consigo escrever em tão curto paragrafo, dedico a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas muitas bendições que tem dado na minha vida.

A minha família pelo constante apoio e colaboração quando o precise.

Ao Dr. Andrés Vercik pela orientação e ensinamentos no mestrado.

Ao Dr. José António Rabi pela orientação nos trabalhos teóricos e esclarecimento de questões referentes ao trabalho.

Á Dra. Luci Cristina de Oliveira Vercik pela orientação no laboratório.

À Dra. Eliana Rigo pela disposição e colaboração ao longo do meu mestrado.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pela bolsa para o financiamento dos estudos.

Aos professores Mariza Pires de Melo, Samantha Pinho e Paulo José do Amaral Sobral pela disposição dos seus laboratórios para o desenvolvimento de medidas de espectroscopia de ultravioleta, tamanho de partícula e microscopia eletrônica de varredura.

Aos laboratoristas Silvana Pugine e Ana Mônica dos laboratórios de Química Biológica, Tecnologia de Alimentos respetivamente, pela ajuda e disposição ao realizar as determinações de espectroscopia de ultravioleta e microscopia eletrônica de varredura.

À pós-graduanda Graziela Veiga pela colaboração nos analise de tamanho de partícula.

Á Dra. Ana Cecília Agudelo Henao e ao Dr. Rubén Antonio Vargas Zapata que sempre me ajudaram desde a graduação.

Aos colegas e amigos Léa Marie Sturton, Sarah Hwa in Lee, Jaiber Humberto Rodriguez Llanos e Christian Humberto Caicedo Flaker pela amizade, companheirismo, apoio e paciência.

E todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização do trabalho.

Muito obrigado.

RESUMO

VALENCIA, G.A. **Transporte eletrônico em biofilmes nanoestruturados para biossensores a base de enzimas.** 2013. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Os biossensores são dispositivos empregados para a detecção de um analito específico, podendo assim ser no controle de qualidade nos alimentos para determinar a presença de micro-organismos, toxinas ou metabólitos. O presente estudo objetiva desenvolver um biossensor condutométrico, baseado na imobilização de peroxidasse em membranas de quitosana e quitosana com nanopartículas de ouro (AuNP) para a detecção de peroxido de hidrogênio. O trabalho foi dividido em três etapas. Na primeira etapa foi estudada a obtenção de AuNP empregando agentes redutores biológicos, sendo avaliados três monossacarídeos (glicose, frutose e galactose), três dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose), dois biopolímeros (amido e quitosana), assim como os extratos obtidos a partir das folhas de hortelã (*Mentha piperita*) e cascas de furtas de abacaxi (*Ananas comosus*), banana (*Musa sp.*), maracujá (*Passiflora edulis*), tangerina (*Citrus reticulata*). A quitosana mostrou-se como o melhor agente redutor na síntese das AuNP, as quais foram empregadas na segunda etapa para a produção de membranas. Três tipos de membranas foram processadas, membranas de quitosana sem AuNP e membranas de quitosana com AuNP com concentrações de 8 e 11mM., as quais foram caraterizadas morfológica e eletricamente. Finalmente foi avaliada a imobilização da peroxidasse usando quatro tratamentos diferentes, sendo a dispersão da peroxidasse nas soluções filmogênicas precursoras das membranas a mais eficiente. A resposta elétrica destas membranas é dependente da concentração de AuNP e da presença de enzimas, e também foi alterada quando as mesmas foram expostas a soluções de tampão fosfato com diferentes concentrações de peroxido de hidrogênio. Isto constitui o principio de operação dos biossensores condutométricos desenvolvidos neste trabalho.

Palavras chave: biossensor condutométrico, quitosana, nanopartículas de ouro, peroxido de hidrogênio, transporte eletrônico, indústria de alimentos.

ABSTRACT

VALENCIA. G.A. **Electronic transport in nanostructures films for biosensors based in enzymes.** 2013. 118 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Biosensors are devices used for detecting a specific analyte, and thus can be used in quality control of food for determining the presence of micro-organisms, toxins or metabolites. The present study aims to develop a conductometric biosensor based on the immobilization of peroxidase in membranes of chitosan and chitosan with gold nanoparticles (AuNP) for the detection of hydrogen peroxide. The work was divided into three stages. In the first stage, methods for obtaining AuNP employing biological reducing agents were studied, evaluating three monosaccharides (glucose, fructose and galactose), three disaccharides (sucrose, maltose and lactose), two biopolymers (starch and chitosan), as well as the extracts obtained from the leaves of mint (*Mentha piperita*) and husks dost thou pineapple (*Ananas comosus*), banana (*Musa sp*), passion fruit (*Passiflora edulis*), mandarin (*Citrus reticulata*). Chitosan exhibited the best behavior as reducing agent for the synthesis of AuNP, which were employed in the second step for the production of membranes. Three types of membranes were processed, chitosan membranes without AuNP and chitosan membranes with AuNP with concentrations of 8 and 11mM, which were morphologically and electrically characterized. Finally the peroxidase immobilization was evaluated using four different procedures, being the dispersion of the peroxidase in filmogenic solutions precursor of membranes the more efficient. The electrical response of these membranes, depends on the AuNP concentration and the presence of enzymes, and was also altered when they were exposed to hydrogen peroxide containing phosphate buffer solutions. This constitutes the principle of operation of the conductometric biosensor developed in this work.

Keywords: conductometric biosensor, chitosan, gold nanoparticles, hydrogen peroxidase, electronic transport, food industry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A: Área.

A: Absorbância.

AuNPs: Nanopartículas de ouro.

ADN: Ácido dexosirribonucleico.

B_{din}: Coeficiente viral dinâmico.

C: Capacitância.

c: Concentração molar do soluto.

d: Diâmetro.

D: Coeficiente de difusão.

D_o: Coeficiente de difusão para uma dissolução infinita.

E: Campo elétrico.

E_t: Energia das armadilhas.

E_{vib}: Energia vibracional.

E_{rot}: Energia rotacional.

ε: Absortividade molar, permissividade do meio.

ξ: Dimensionalidade do transporte.

f: Fator de enchimento (filling fator).

$f(K_a)$: Função de Henry.

G: Condutância.

σ: Condutividade

$HAuCl_4$: Cloreto de ouro.

HRP: Enzima da raiz forte (Horseradish peroxidase).

h: Constante de Plank.

I: Número de inércia, intensidade de luz incidente.

I_o: Intensidade de luz refletida.

I: Corrente.

I-V: Curvas corrente-tensão.

I_{RS}: Corrente de Richardson-Schottky.

I_{FN}: Corrente de Fowler-Nordheim.

i: Número imaginário.

J: Número quântico rotacional.

j: Densidade de corrente.

j_{drift}: Corrente de Drift.

$j_{\text{difusão}}$: Corrente de difusão.

j_{SCLC}: Corrente Space-Charge-Limited-Current.

j_{TCLC}: Corrente Trap-Charge-Limited-Current.

k: Constante de força.

k_B: Constante de Stefan Boltzmann.

L: Indutância.

l: Espessura.

MET: Microscopia eletrônica de transmissão.

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

m: Massa dos núcleos.

n: Densidade dos portadores.

η: Viscosidade.

θ: Preenchimento das armadilhas.

PBS: Solução tampão fosfato.

PCR: Reação em cadeia da polimerase (polimerase chain reaction).

pZ: Potencial zeta.

q: Carga do eletrón.

R: Resistencia elétrica.

RC: Resistor capacitivo.

R_h: Raio hidrodinâmico.

RLC: Circuito elétrico resistor, indutor, capacitor.

RPS: Ressonância de plasmon de superfície.

T: Temperatura.

U_E: Mobilidade eletroforética do sistema.

UV-Vis: Espectrocopia UV no visivél.

μ: Massa reduzida.

V: Tensão.

ν: Número quântico vibracional.

ω: Frequência angular.

X: Reatância.

Z: Impedância.

$Z_{real} = Z' = \mathrm{Re}\, Z$: Resistencia.

$Z_{imaginário} = Z'' = -\mathrm{Im}\, Z$: Reatância.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO 16
2.2. MEMBRANAS ORGÂNICAS NANO-ESTRUTURADAS COM NANOPARTÍCULAS E SUAS APLICAÇÕES COMO MEMÓRIAS ORGÂNICAS 21
2.3. DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES E SUA CLASIFICAÇÃO 23
2.4. QUITOSANA 32
2.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO 36
2.5.1. ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA (UV-VIS) 36
2.5.2. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ 41
2.5.3. CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA (PZ) 42
2.5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 45
2.5.5. ANALISE ELÉTRICO: CURVAS CORRENTE-TENSÃO (I-V) 46
2.5.6. ANALISE ELÉTRICO: ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA (EI) 47
3. MODELOS TEÓRICOS NO ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS MATERIAIS ORGÂNICOS 50
3.1. MODELOS TEÓRICOS PORPOSTOS PARA A INJEÇÃO DE CARGA NOS MATERIAIS ORGÂNICOS. 50
3.2. MODELOS TEÓRICOS PORPOSTOS PARA O TRANSPORTE ELETRÔNICO NOS MATERIAIS ORGÂNICOS. 51
4. OBJETIVO 58
4.1. OBJETIVO GERAL: 58
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 58
5. MATERIAL E MÉTODOS 60
5.1. MATERIAIS 60
5.2. SÍNTESES DAS NANOAPARTÍCULAS DE OURO (AUNP) 61
5.2.1. SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO MONO-, DI- E POLISACARIDEOS COMO AGENTES REDUTORES 61
5.2.2 SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EXTRATOS DE CASCAS DE FRUTAS E FOLHAS DE HORTELÃ COMO AGENTES REDUTORES 62
5.3. PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AUNP 63
5.4. NEUTRALIZAÇÃO DAS MEMBRANAS E DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS 64
5.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA HRP NAS MEBRANAS 65
5.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AUNP CONTENDO HRP 66
5.7. CARATERIZAÇÃO DOS COLOIDES E DAS MEMBRANAS 67
5.7.1. CARATERIZAÇÃO DAS AuNP 67
5.7.2 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP 68
5.7.3 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP E SUA RESPOSTA ELÉTRICA ÁS DIFERENTES CONCENTRACOES DE PEROXIDO DE HIDROGENIO 69
5.7.4 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSNA, QUITOSANA/HRP, QUITOSNA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA 70
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 71

6.1. ESTUDO DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO A PARTIR DE DIFERENTES CARBOIDRATOS. 71
6.2. ESTUDO DE PARAMENTOS DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM QUITOSANA 78
6.3. ROTEIROS ALTERNATIVOS NA SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO 84
6.4. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AUNP 87
6.4.1. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP 87
6.4.2. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP 91
6.5. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AUNP/HRP 94
6.5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP CONTENDO HRP 94
6.5.2. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP 96
6.5.3. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP 97
6.5.4. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/HRP, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP E SUA RESPOSTA AO CONTATO COM O PEROXIDO DE HIDROGENIO 98
6.5.5. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/HRP, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ..105
7. CONCLUSÕES 108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 111

1. INTRODUÇÃO

A análise de alimentos, seu frescor, assim como a detecção de contaminantes químicos e biológicos é de extrema importância tanto para o consumidor quanto para a indústria, tanto para garantir produtos de qualidade quanto por questões de segurança alimentar, evitando assim problemas de saúde publica. Um exemplo disso pode-se observar na indústria láctea onde no ano 2012 foram reportadas ao menos quatro surtos que envolveram a presença de micro-organismos como *Escherichia coli* e *Campilobacter* em produtos lácteos, e que geraram a hospitalização de varias pessoas em cidades como Pennsylvania, Missouri, Oregon e Washington nos Estados Unidos (MILK FACTS, 2012). Caso similar foi reportado em países como Alemanha, França e Suécia onde o micro-organismo *E. coli* O104:H4 foi encontrado em legumes, gerando problemas de saúde na população (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). A Tabela 1 apresenta os micro-organismos que estão comumente associados aos surtos por contaminação dos alimentos.

Segundo o reportado por Campos (1995), Brasil é um dos países que apresenta uma alta taxa de mortalidade infantil a causa de diarreias, onde a contaminação dos alimentos e da água potável são dois dos principais fatores. De acordo com o Ministério da saúde (2007) e citado por Farias-Firmo (2010) no Brasil se reportam 2834 surtos confirmados devido à presença de micro-organismos em alimentos, do qual o 83% é devido a bactérias, 14,1% a vírus e o 1,1% a parasitas.

Devido a estas problemáticas, os países estabeleceram normas que restringem a quantidade de micro-organismos, toxinas ou metabólitos em alimentos em quantidades que não posam ser potencialmente perigosas na saúde humana (KRAJEWSKA, 2004).

Tabela 1. Micro-organismos associados a surtos por contaminação dos alimentos.

Micro-organismos	**Alimento contaminado**
Campylobacter jejuni	Leite, frango e carne
Salmonella spp.	Ovo, frango, carne, chocolate, saladas
E. coli	Ovo, carne, frango, leite, vegetais, hambúrguer
L. monocytogenes	Queijo frescal, leite mal processada, sorvete, vegetais, carne e frango
Bacilius cereus	Carnes, leite vegetais, peixe, arroz, pasta e queijo
Clostridium botulinum	Enlatados mal processados
Clostridium perfrigens	Produtos cárneos
Shigella	Saladas, vegetais, frango
Yersinia enterocolitica	Porco, peixe e derivados lácteos
Vibrio parahaemolyticus	Bolachas, peixe
Vibrio vulnificus	Amêijoas
Hepatitis A vírus	sanduíches, frutas e sucos, leite e derivados, vegetais, saldas
Norwalk virus/Norovirus	Gelo, saladas e glacê
Campylobacter jejuni	Frango

Fonte: VELUSAMY et al., 2010.

O controle da segurança e qualidade nos alimentos deve ser feito periodicamente através de analises químicas e microbiológicas (DORNELLES; TATSUO, 2002; RICCI et al., 2007). Este tipo de análise envolve o uso de técnicas convencionais como cromatografia, espectroscopia, eletroforeses, titulação, entre outras, que normalmente se caracterizam por seu fácil monitoramento, mas que precisam de pessoal treinado para manipulação e controle dos aparelhos (DORNELLES; TATSUO, 2002). Recentemente, houve um aumento no interesse em novas técnicas que permitam a detecção dos micro-organismos a partir da união antígeno-anticorpo e análises que envolvam o estudo de pequenos fragmentos de DNA (ácido dexosirribonucleico) que são logo amplificados, sendo um exemplo o analise PCR (polimerase chain reaction).

O problema de todas estas técnicas é a necessidade de vários dias para a geração dos resultados, já que os micro-organismos devem primeiramente ser multiplicados para gerar uma colônia visível (RICCI et al., 2007). Por exemplo, o regulamento para a detecção de *Salmonella* nos alimentos (ISSO/DIS 6579 do ano 2001) tarda entre 4 a 5 dias onde são feitas algumas etapas como pre-enriquecimiento e multiplicação para gerar resultados confiáveis (CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST, 2009).

Em busca de novas técnicas alternativas para uma detecção rápida dos micro-organismos e compostos tóxicos nos alimentos, diferentes técnicas tem sido propostas, sendo uma alternativa viável o uso dos biossensores que são dispositivos que permitiriam uma detecção quase instantânea do analito em estudo. Estes dispositivos têm sido extensamente estudados, visando aplicações em medicina. Exemplo disso é o biossensor de glicose que é usado para o monitoramento de pessoas com diabetes. Se estima que atualmente a comercialização deste dispositivo envolva cerca de 5 bilhões de dólares ao ano, o que motiva o desenvolvimento de novas pesquisas nesta área (SADIK; ALUOCH; ZHOU, 2009). Na atualidade não se reportam biossensores comerciais que posam ter aplicações na área da engenharia de alimentos.

Por todos estes motivos existe a necessidade de agregar tecnologia que posa ser empregada na indústria de alimentos brasileira para a determinação de micro-organismos e contaminantes em alimentos, assim como para o controle de qualidade nos mesmos, permitindo ao Brasil ter um melhor controle na segurança dos seus produtos, evitando os possíveis surtos e doenças causados pelo consumo de alimentos contaminados ou em mau estado.

No presente trabalho, se propôs desenvolver e caracterizar um biossensor condutométrico de peróxido de hidrogênio usando quitosana como matriz polimérica

contendo nanopartículas de ouro (AuNP). O sistema quitosana/AuNP foi utilizado como plataforma para a imobilização da peroxidasse como biorreceptor com possíveis aplicações na indústria de alimentos e em outras áreas correlatas como a agricultura e zootecnia de precisão. Este dispositivo visou uma futura aplicação do biossensor podendo ser empregado na detecção de adulteração e presença de antibióticos no leite, assim como no crescimento de microrganismos em diversos alimentos. Para isto, uma profunda compreensão das propriedades elétricas deste dispositivo e sua relação com a estrutura e composição são fundamentais para a manipulação e otimização do mesmo, sendo objeto deste trabalho.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

O uso de nanopartículas não é recente, investigações na área mostram que as nanopartículas metálicas foram usadas como materiais na elaboração de elementos históricos tais como o ‘‘Lycurgus Cup’’ que é um troféu da Roma antiga, construída em Alexandria entre os anos 290-325 depois de Cristo. Este troféu apresenta nanopartículas de ouro e prata na sua estrutura, em uma relação de 3:7 com dimensões entre 15-100 nm (BERNI-NETO, 2010). A Figura 1 apresenta o ‘‘Lycurgus Cup’’ quando reflete (a) e transmite (b) a luz.

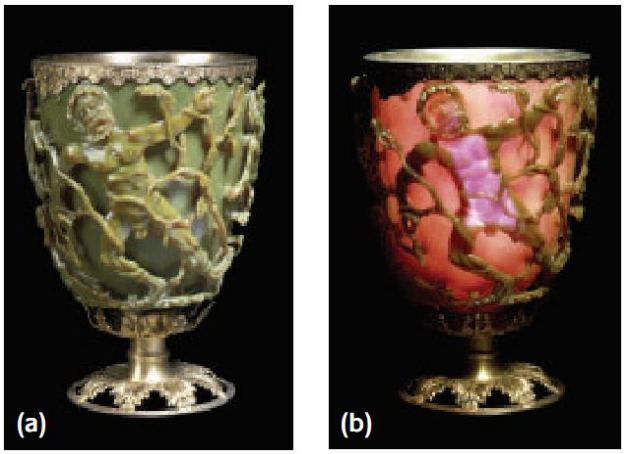


Figura 1. O troféu ‘‘Lycurgus Cup’’ da Roma antiga.

Fonte: BERNI NETO, 2010.

Outro exemplo se apresenta na cidade de Bonampak (México) onde está o Templo maior da cultura Maia e que apresenta diferentes figuras arqueológicas com uma coloração azul que não degrada com o tempo (Figura 2). Estudos referentes a esta

pintura que usaram os Maias revelam que na sua composição encontra-se nanopartículas de ferro (BERNI-NETO, 2010).

Figura 2. Fotografia de um pássaro feito pela cultura Maia.

Fonte: BERNI NETO, 2010.

Assim nossos antecessores empregaram as nanopartículas sem o seu conhecimento. De forma similar, Faraday no ano de 1857 reportou a formação de uma solução vermelha produto da reação do cloreto de ouro ($HAuCl_4$) em presença do fósforo (HAISS et al., 2007).

O físico Richard Feynman no ano de 1959 apresentou uma palestra intitulada ‘‘Há mais espaços lá embaixo’’ onde falou da possibilidade de construir novos materiais a partir da manipulação dos átomos, palestra que é considerada como o ponto de inicio da nanotecnologia (TOUMEY, 2008).

Os primeiros trabalhos foram orientados na síntese de nanopartículas de sulfito de cadmio (CdS) e nanocristais de cobre que foram obtidas utilizando a técnica de micelas. Nestas pesquisas se concluiu que a forma e tamanho das nanopartículas afetam suas propriedades (LIANOS; THOMAS, 1986; LISIEKI; PILENI, 1993).

Nas ultimas décadas, os múltiplos avanços em tecnologia tem permitido estudar os materiais em escala nanométrica. O grande interesse na síntese de nanopartículas

metálicas é que estas apresentam aplicações em diferentes áreas do conhecimento tais como física, química, ciência dos materiais, medicina entre outras. Estas aplicações derivam das propriedades térmicas, óticas, magnéticas, eletrônicas e elétricas que as nanopartículas metálicas apresentam e que é o resultado também da superfície e geometria das mesmas (FILIPPO et al., 2010; HUANG; YUAN; YANG, 2005; PANIGRAHI et al., 2005; VIGNESHWARAN et al., 2006; WEI; QUIAN, 2008), assim como da relação (volume/volume) com a matriz onde se encontram. Exemplo disto é o fator de enchimento (filling fator, *f*) que determina as propriedades elétricas das nanopartículas metálicas (FEDOTOV et al., 2004; LUE, 2001). Também os agregados coloidais de nanopartículas tem interesse por sua natureza fractal que apresenta propriedades óticas particulares (KHLEBTSOV et al., 1996).

As nanopartículas metálicas mais utilizadas são as de ouro (Au), prata (Ag) e Platina (Pt). Especialmente as nanopartículas de ouro ao ser sintetizadas usando compostos não tóxicos, permitem sua aplicação em áreas como medicina para o diagnostico e terapia em doenças (theragnostic) (KYURI et al., 2011), mais especificamente para o tratamento do câncer, onde as AuNP são conjugadas com fragmentos específicos de peptídeos ou anticorpos que são seletivos as células cancerígenas. Em farmacologia também são empregadas para a liberação controlada de medicamentos, na saúde dental, tecnologia de alimentos e cosmética devido a suas propriedades antimicrobianas e para o desenvolvimento de biossensores contendo uma ou mais enzimas imobilizadas (KASSAEE; AKHAVAN; BETESHOBABRUD, 2008; NA et al., 2011; SHARMA; YNGARD; LIN, 2009; SHERVANI; YAMAMOTO, 2011[a]; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010). As nanopartículas de prata são encontradas em produtos que estão em contato direto com o corpo humano como xampus, sopas, detergentes e cosméticos (SONG; JAN; KIM, 2009). Contudo estes

nanomateriais devem ser empregados em quantidades moderadas ao ter, além de efeito antimicrobiano (MUBARAKALI et al., 2011), toxicidade o que pode inibir também o crescimento de células nos tecidos do corpo (KYURI et al., 2011).

De forma geral, existe uma grande variedade de métodos a empregar na síntese de nanopartículas, estes podem ser classificados como: métodos físicos, químicos e biológicos.

Métodos físicos: envolvem a ablação por laser, termólisis, irradiação com microondas e síntese sonoquímica (BERNI-NETO, 2010). De este grupo, a termólisis é o método que tem tido maior sucesso ao permitir a obtenção de cátions metálicos e ânions moleculares produto da decomposição de sólidos a altas temperaturas. O problema da maioria destas técnicas é sua difícil implementação ao precisar de maquinarias sofisticadas, o que diminui as aplicações das mesmas (KASSAEE; AKHAVAN; BETESHOBABRUD, 2008).

Métodos químicos: é o método mais empregado para a produção de nanopartículas ao ser simples e permitir uma síntese em grande escala. Em este método, os sais metálicos presentes em um meio líquido ou sólido são reduzidos. Quando o meio for líquido se precisa adicionar um agente redutor à sal para fazer a redução; quando o meio for sólido, o meio pode atuar como agente redutor. Uma vantagem deste método é que a redução do sal permite controlar o tamanho e polidispersidade das nanopartículas (BERNI-NETO, 2010).

Além do uso de agentes redutores, outras técnicas químicas para a obtenção de nanopartículas são a redução radiolítica e fotoquímica, a primeira envolve o uso dos raios gama os quais ao incidir na amostra geram elétrons solvatados, radicais $HO^{\cdot}$ e átomos de H. Assim os radicais $HO^{\cdot}$ podem se converter em radicais redutores ao adicionar 2-propanol (BERNI-NETO, 2010). O segundo método de redução é a fotólisis

ou fotoquímica, na qual ao incidir raios UV sobre uma amostra de água, esta é foto-oxidada devido à redução do sal, onde finalmente pode-se obter nanopartículas metálicas (BERNI-NETO, 2010).

Atualmente este método emprega o uso de agentes redutores tais como o boroidreto de sódio, o *N,N*-dimetilformamida e os citratos, os quais são catalogados como compostos tóxicos, sendo apenas solúveis em dissolventes orgânicos (ENGELBREKT et al., 2009; VIGNESHAWARAN et al., 2006; VINOD et al., 2011).

Métodos biológicos: basicamente este método consiste na redução do sal metálico (como apresentado nos métodos químicos). Contudo, esta técnica envolve o uso de agentes redutores de origem biológica tais como células, fungos, extratos de plantas, etc (BERNI-NETO, 2010). Este método surge com a finalidade de evitar o uso de solventes orgânicos e agentes redutores tóxicos. Diferentes pesquisas têm avaliado a síntese de nanopartículas metálicas usando compostos biológicos, o qual é conhecido na literatura como síntese verde ou biossínteses de nanopartículas metálicas. Esta biossínteses é uma redução química que nos últimos anos ganhou importância pelo uso de procedimentos menos nocivos ao meio ambiente e simples para a produção destes nanomateriais. Assim, soluções e extratos de glicose (ENGELBREKT et al., 2009; SHERVANI; YAMAMOTO, 2011[b]), coentro (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2008), banana (BANKAR et al., 2010[a], 2010[b]), mel (PHILIP, 2009), maltose (FILIPPO et al., 2010), amido (GHASEMINEZHAD; HAMEDI; SHOJAOSADATI, 2012; KASSAEE; AKHAVAN; BETESHOBABRUD, 2008; SHERVANI; YAMAMOTO, 2011[b]; VASILEVA et al., 2011; VIGNESHAWARAN et al., 2006), quitosana (WEI; QUIAN, 2008; YOKSAN; CHIRACHANCHAI, 2010), borracha de *Kondagogu* (VINOD et al., 2011), ácido tânico (SIVARAMAN et al., 2009), fruta tansy (DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010[a]), *Rosa rugosa* (DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010[b]),

Cinnamomum camphora (HUANG et al., 2007), *Memecylon edule* (ELAVAZHAGAN; ARUNACHALAM, 2011), pinho, caqui, magnólia, ginkgo, patanus (SONG; JAN; KIM, 2009), gerânio (SHANKAR; AHMAD; SASTRY, 2003) e filantina (KASTHURI; KATHIRAVAN; RAJENDIRAN, 2009) têm sido empregadas como agentes redutores na biossíntese de nanopartículas, reportando-se tamanhos de partícula entre 3,3 e 84nm.

Wei e Quian (2008) estudaram a síntese de nanopartículas de ouro usando quitosana como agente redutor a diferentes concentrações, temperaturas e tempos. Os autores concluíram que as nanopartículas de ouro apresentaram melhores características quando sintetizadas usando uma solução de quitosana na concentração de 6,92mg/mL e uma de cloreto de ouro a 11mM, em uma relação 0,4:1 (solução de cloreto de ouro:solução de quitosana). Estas soluções foram aquecidas a 95°C por 3h, onde foram obtidas nanopartículas em solução com forma esférica de tamanho menor aos 50nm.

O estudo do Wei e Quian (2008) foi empregado para basear a metodologia referente à síntese de nanopartículas de ouro apresentada neste trabalho e reportada no capítulo dos materiais e métodos.

2.2. MEMBRANAS ORGÂNICAS NANO-ESTRUTURADAS COM NANOPARTÍCULAS E SUAS APLICAÇÕES COMO MEMÓRIAS ORGÂNICAS

Na década de 70, os pesquisadores Alan G. MacDiarmid, Alan J. Heeger, e Hideki Shirakawa da Universidade de Pennsylvania (University of Pennsylvania), desenvolveram um polímero com propriedades elétricas particulares, este material deu origem a diferentes aplicações na microeletrônica e gerou um alto impacto na sociedade científica, sendo outorgado o prêmio Nobel de química no ano 2000. A partir deste

trabalho a condutividade elétrica deixou de ser uma propriedade única dos materiais metálicos e passou a ser estudada também em polímeros orgânicos (CHEMICAL HERITAGE FOUNDATION). Assim, diferentes materiais orgânicos têm sido estudados, apresentando aplicações como diodos emissores de luz (BURN et al., 1992; MÜLLER et al., 2003; LO et al., 2005; SEO et al., 2007), transistores (MIZUKANI et al., 2006; TANG; SlYKE, 1987), memórias (BURROUGHES et al., 1990), células solares (DENNLER; SARICIFTCI, 2005; GRANIER et al., 1994) e sensores (FENG; WANG; CHEN, 2009).

Na literatura se reporta o estudo com diferentes polímeros tais como silicone, alcano ditiol, polietileno de carbono e compostos modificados desde o benzeno e fenóis com possíveis aplicações como semicondutores orgânicos (DANCIL; GRENIER; SAILOR, 1999; DURKUT et al., 2006; MÜLLER et al., 2002; MURUGARAJ et al., 2008; PEI; SU; HWANG, 2005; WEE et al., 2009). Particularmente estes materiais apresentam uma série de vantagens como flexibilidade, baixo custo de fabricação e versatilidade do mesmo, além disso, recentemente têm se demonstrado que estas estruturas podem apresentar dois estados diferentes de condução quando se aplica uma rampa de tensão, tendo um estado de alta condutividade “ON” e um de baixa condutividade “OFF” que se emprega principalmente no desenvolvimento de memórias orgânicas resistivas (HOUILI; TUTIS; IZQUIERDO, 2010; REDDY et al., 2009).

A incorporação das nanopartículas metálicas em materiais orgânicos induz dois fenômenos: um aumento na condutividade dos polímeros em várias ordens de grandeza e um incremento do comportamento biestável. Nos dois fenômenos, as nanopartículas facilitam o transporte pelo material orgânico, alterando assim as propriedades elétricas dos mesmos (WEISS et al., 2007). As nanopartículas de ouro são uma das mais

empregadas para modificar as propriedades elétricas em polímeros (CHEN et al., 2009; LEONG et al., 2008; RAGUSE et al., 2009).

Nos últimos anos, o uso da quitosana atraiu o interesse devido a suas propriedades mecânicas e elétricas (AZIZ; ABIDIN; AROF, 2010). Desta forma a quitosana têm sido misturada com sais como o nitrato de amônio (NH_4NO_3) (CUI et al., 2009), $LiCF_3SO_3$ (YAHYA; AROF, 2003), $NH_4CF_3SO_3$ e nanopartículas metálicas (AVELLANEDA et al., 2007; JAMALUDIN; MOHAMAD, 2010), trazendo aplicações principalmente no desenvolvimento de membranas de condução protônica (KHIAR; AROF, 2011; MUKOMA; JOOSTE; VOSLOO, 2004) e biossensores (JIN et al., 2011).

2.3. DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES E SUA CLASIFICAÇÃO

O desenvolvimento dos sensores e posteriormente biossensores se remonta ao século XIX com os inícios da potenciometria, onde o primeiro trabalho foi reportado por Nerst no ano 1888 (NERNST; LOEB, 1888), quem conseguiu descrever o potencial redox de um sistema cujo eletrodo de trabalho era um metal imerso numa solução contendo íons do mesmo metal. Paralelamente, a necessidade de quantificar o grau de acidez nas soluções fez que diferentes pesquisas fossem orientadas para esta área. Assim o primeiro sensor para medir o pH foi proposto por Nerst em 1897 (NERNST; GLEICHGEWICHT, 1897), e modificado posteriormente nos trabalhos feitos por Cremer em 1906 (CREMER, 1906) e Haber & Klemensiewicz em 1909 (HABER; KLEMENSIEWICZ, 1909). Só no ano de 1935, este sensor foi comercializado pela empresa Beckman e Radiometer (FERNANDES; KUBOTA, 2001). Clark e Lions no ano de 1962 reportaram o primero biossensor conhecido como ‘‘eletrodo enzimático’’

onde a enzima glicose foi imobilizada num eletrodo para testar o O_2. Neste dispositivo a glicose catalisa uma reação de oxidação, onde o consumo do oxigênio é proporcional à concentração do substrato (VIERIRA, 2007). Stefanec e Simon entre 1966-1967 (STEFANAC; SIMON, 1966-1967) reportaram o uso de polipeptídios como materiais eletroativos para a construção de biossensores.

De acordo com a IUPAC e citado por Thévenot et al. (2001) os biossensores "são dispositivos que trabalham com reações bioquímicas especificas, mediadas por enzimas isoladas, inmuno-sístemas, tecidos, organelas ou células, com a finalidade de detectar compostos químicos através de sinais elétricos, térmicos ou óticos" (tradução nossa). Malhotra et al. (2005) reportou uma definição similar e agregou o termo biorreceptor para juntar num mesmo grupo todos aqueles materiais biológicos que detectam o analito, sendo também parte deste grupo aqueles materiais biomímicos que são derivados da bioengenharia e que podem reproduzir um comportamento típico de uma molécula biológica tais como os das proteínas, enzima, tecidos entre outros. Agrego também, que os biorreceptores devem estar em contato com um transdutor físico-químico ou microssistema de transdução para que o sinal elétrico, térmico ou ótico possa ser quantificado (MALHOTRA et al., 2005; PATEL, 2002).

Os biossensores mais estudados utilizam como elemento biológico de reconhecimento enzimas, anticorpos ou ácidos nucléicos. Entre estas, as enzimas do grupo das oxidases são frequentemente empregadas devido a suas características de não precisar de cofatores para sua atividade enzimática e de possuir alta estabilidade em uma ampla faixa de temperatura e pH (VASILEVA et al., 2009). Exemplo disso é a peroxidasse da raiz-forte (Horseradish peroxidade, HRP). A Tabela 2 resume alguns trabalhos da literatura mostrando o alto interesse pelo desenvolvimento de biossensores a base de peroxidasse para a detecção de peróxido de hidrogênio.

Tabela 2. Uso da enzima HRP na construção de biossensores.

Elemento biológico	Matriz polimérica	Mecanismo de detecção	Referência
	Cerâmica de carbono/AuNP	Amperométrico	LEI et al., 2004
	Quitosana/AuNP	Amperométrico	KRAJEWSKA, 2005
	AuNP coloidal/cisteine/nafion	Amperométrico	LU et al., 2006
	Quitosana/AuNP	Amperométrico	LIN; QU; ZHANG, 2007
	AuNP	Condutométrico	ZAZOUA et al., 2009
	Quitosana	Amperométrico	JIN et al., 2011
	Tionina/quitosana/AuNP	Amperométrico	KANG et al., 2011
Peroxidasse (HRP)	Ferrita de cobalto/quitosana	Amperométrico	YARDIMCI; SENEL; BAYKAL, 2012

Pela sua vez, pode-se observar que para a imobilização desta enzima diferentes materiais têm sido empregados, destacando-se o uso da quitosana e das nanopartículas de ouro. Este tipo de biossensores tem sido usado na detecção de peróxido de hidrogênio presente em diferentes meios como no leite (WANG et al., 2000), em antibióticos (WANG, 1999) e para a detecção de microrganismos como *C. jejuni, L. monocytigenes e E. coli O157:H7* (PATEL, 2002; MILK FACTS, 2012).

Os sensores e biossensores eletroquímicos são os mais difundidos e que apresentam maiores aplicações, estes se classificam em condutométricos, potenciométrico e amperométricos. Os biossensores condutométricos resultam interessantes porque permitem uma fácil miniaturização, com produção em grande escala empregando tecnologias econômicas (ZAZOUA et al., 2009). Contudo, estes dispositivos não têm sido objeto de extensa pesquisa devido a que o sistema amperométrico é o que possui maior rapidez e precisão, além de linearidade na sua

resposta, o qual é desejado para o posterior desenvolvimento de dispositivos com fácil calibração (LUO et al., 2005).

Os biossensores podem ser classificados de acordo aos seus dois componentes (biorreceptor ou transdutor). Atendendo ao tipo de biorreceptor, estes se podem classificar por sua capacidade catalítica ou de afinidade:

Biorreceptor catalítico: nos sistemas biológicos, múltiplas reações são catalisadas por macromoléculas. Ao isolar estas macromoléculas, uma reação específica pode ser utilizada como mecanismo de reconhecimento nos biossensores.

Em uma reação química do tipo catalítico se tem no mínimo um substrato (A) e um co-substrato (B) os quais ao seres catalisados pelo biorreceptor vão gerar um produto principal (C) e outro(s) secundário(s) (D) assim:

$$A + B \xrightarrow{Biorreceptor} C + D$$

Em esta reação se tem quatro possíveis alternativas para obter um monitoramento da:

- Detecção do consumo do substrato (A).
- Detecção do consumo do co-substrato (oxigênio na maioria dos casos, B).
- Detecção da formação do produto principal ou secundário (C ou D), pela detecção da transferência de elétrons produto da reação.
- Detecção do estado catalítico do biorreceptor.

Os biorreceptores catalíticos podem ser: enzimas (uma o um conjunto), células (micro-organismos, bactérias, fungos, células eucariotas, leveduras), células vegetais e tecidos. Os biossensores que têm na sua estrutura células, tecidos ou micro-organismos

como biorreceptor, apresentam uma série de vantagens tais como baixo custo pelo fato que este tipo de biomateriais não envolve processos industriais complexos em sua purificação e isolamento, assim como possuir alta estabilidade as mudanças ambientais (temperatura, umidade, luz, pH, presença de compostos inibidores). Estes biorreceptores se caracterizam pela alta duração nos biossensores. Os biossensores que possuem este tipo de biorreceptores devem após o seu uso, ser imersos numa solução contendo nutrientes para que o biorreceptor possa ser regenerado. Contudo, a maior desvantagem destes dispositivos é sua baixa seletividade, devida ao amplo número de reações que estes materiais catalisam. Assim a reação de interesse é prejudicada pelos sinais das outras reações, fazendo que a detecção de um analito em particular não seja reproduzível (MALHOTRA et al., 2005).

De forma oposta as enzimas permitem uma ótima detecção do analito de interesse, sendo materiais que unicamente catalisam um tipo especifico de reação. Os problemas de estas biomoléculas são sua fácil inibição ou desnaturação devido a mudanças no ambiente (pH, temperatura e luz) ou pela presença de compostos que induz desnaturação.

Biorreceptor de afinidade: neste tipo de sistemas, ao invés de detectar o consumo de um reagente ou geração de um produto, o princípio de detecção se fundamenta na interação entre o biorreceptor e o analito, e como esta pode mudar o comportamento da matriz à qual esta ligada o biorreceptor, exemplo de estes são os biossensores piezelétricos que serão explicados posteriormente.

Exemplo de biorreceptores por afinidade são os anticorpos usados para a detecção de antígenos e os materiais biomímicos. Estes materiais são de alta seletividade, mas facilmente inibidos como no caso das enzimas. A especificidade dos

biorreceptores por afinidade dependerá do comportamento a ser imitado (MALHOTRA et al., 2005).

Em uma terceira classificação pode-se agrupar os biorreceptores chamados híbridos, os quais possuem características dos dois grupos descritos previamente, isto é, possuem características catalíticas e de afinidade com o analito.

Atendendo à classificação dos biossensores pelo transdutor e reportada por Dornelles e Tatsuo (2002), estes podem ser:

Térmicos: as reações químicas catalisadas por enzimas ou micro-organismos envolvem transferência de energia em forma de calor ao meio. Desta forma, os transdutores térmicos detectam estas mudanças de temperatura. O maior problema destes dispositivos é sua pouca precisão devido a que a maioria dos sistemas não são adiabáticos, podendo existir transferência de energia ao meio externo sem ser quantificada.

Óticos: estes transdutores usam biocompostos ou biomoléculas as quais apresentam uma absorção característica da luz ultravioleta, esta absorção muda quando o biorreceptor interage com o analito.

Piezelétricos: Detectam mudanças na massa ou viscosidade, geralmente estes biossensores são bastante específicos. Antígenos ou anticorpos são imobilizados na superfície de um cristal piezoeléctrico (em geral quartzo tipo α). Quando o analito interage com o biorreceptor, uma mudança da massa do cristal é detectada, em geral

como uma mudança na frequência característica de ressonância (microbalanzas de cristal de quartzo), essa variação na massa está em função da concentração do analito.

Mecânicos: ao igual que nos piezelétricos estes biossensores empregam na sua estrutura antígenos, anticorpos e materiais biomímicos os quais estão fixados à matriz, assim quando o analito interage com o biorreceptor uma deformação geométrica da matriz é detectada e correlacionada com a concentração do analito (por ex., BioMEMS). Também podem operar na modalidade de ressonância.

Eletroquímicos: estes dispositivos permitem quantificar um sinal produto de uma troca de elétrons em uma reação eletroquímica (tunelamento de elétrons ou mobilidade iônica). Pela sua vez, os transdutores electroquímos podem se classificar como:

Condutométricos: registram mudanças na condutividade ou resistividade de um meio ou material produto de uma reação química para uma concentração fixa do análito (LIU, 2000). Em sistemas biologicos estas mudanças se devem ao metabolismo de substratos pelos micro-organismos tais como carboidratos ou compostos intermediarios como ácido láctico que são detetados ao empregar uma voltagem constante. A condutividade (σ) do meio é igual ao porduto entre a conductancia (G) e a geometria da amostra presa nos eletrodos (d/A), onde A é a área dos eletrodos e d, a distancia entre eles ($\sigma = G \cdot d / A$). Quando no meio há uma mudanca de ions, esta é detectada pelos dois eletrodos que ficam em cotato directo com a amostra. Talvez uma das maiores desvantagens destes dispositivos seja um baixo sinal, devido ao qual apresentam poucas aplicações (DORNELLES; TATSUO, 2000).

Impedimétricos: princípio reconhecido pela AOAC (Association of Official Analytical Chemistsm Intl.) para o monitoramento e detecção de patógenos em alimentos. Neste, as substancias geradas pelo metabolismo dos micro-organismos leva a um incremento na condutividade e disminuição da impedância (DORNELLES; TATSUO, 2000).

A impedância (*Z*) possui uma parte real ou resistiva (*R*) e uma parte imaginária ou reativa (*X*), assim: $Z = R + iX$, onde *i* é a unidade imaginária. A impedância de uma amostra pode ser analizada em termos de ciruitos elétricos, cujas componentes podem ser associadas a diferentes processos e mecanismos, entre eles a reação que se pretende detectar.

Potenciométricos: é um tipo de sensor químico empregado frequentemente para quantificar a concentração de um analito em meio gasoso ou liquido. Para isso um acoplamento de electrodos (eletrodo de trabalho e de referencia) são usados para medir o potencial eletrico quando a corrente entre estes é nula. Nestes dispositivos o biorreceptor se encontra adherido sobre o eletrodo de trabalho, assim o funçonamento se basea na diferença de potencial entre os dois eletrodos, onde o potencial do eletrodo de trabalho depende da concentração do analito. Os biossensores potenciométricos são normalmente usados para testar mudanças do pH e concentração de íons em um sistema (DORNELLES; TATSUO, 2000; HUET et al., 2010).

Amperométricos: neste tipo de dispositivos se mede a corrente produto da reação química de uma espécie eletroactiva para uma diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e o meio (eletrodo de referência). Esta corrente pode ser relacionada com a concentração da espécie no meio. Os biossensores amperométricos são mais rapidos, sensíveis e precisos o que os biossensores potenciometricos, contudo, a selectividade do biossensor amperometrico depende do potencial redox que a interação analito-biorreceptor possa desenvolver. O potencial redox é um sinal baixo e, portanto o

mecanismo de detecção pode levar a uma imprecisão na quantificação do analito presente na amostra. Outra imprecisão acontece devido à presença de reações alternativas entre outros compostos que podem ter um maior potencial redox, diminuindo a sensibilidade do dispositivo (DORNELLES; TATSUO, 2000).

Na análise de alimentos, a maioria dos biossensores são do tipo amperométrico (biossensres não comerciais), os quais usam como biorreceptor enzimas do tipo das oxidasas. Este tipo de dispositivos apresenta ótimos resultados já que a enzima interage com o substrato e facilita sua posterior medição apresentando alta sensibilidade, exemplo de esto acontece nos biossensores de peroxidasse para a detecção de peróxido de hidrogênio que tem sido empregados na detecção de contaminantes microbiológicos presentes nos alimentos (DORNELLES; TATSUO, 2000; LEI et al., 2004).

Os biorreceptores podem ser imobilizados através de diferentes técnicas como:

- Absorção;
- Ligações cruzadas (cross linking);
- Ligações covalentes;
- Encarceramento (entrapment);
- Encapsulação;
- Ligação em matrizes sólidas.

Para a construção de biossensores, o método de imobilização do biorreceptor dependerá da natureza do biorreceptor, do tipo de transdutor a usar e das propriedades físico-químicas do biossensor. De forma geral, os métodos mais empregados na imobilização são a absorção e a ligação através de ligações covalentes. A primeira é uma técnica simples que envolve ligações fracas do tipo Van der Waals. Esta técnica

não gera modificações dos biorreceptores, sendo apropriado em biossensores que usam enzimas, pois evita a perda da estrutura quaternária das mesmas. O problema deste tipo de imobilização são suas ligações fracas onde o biorreceptor pode migrar do dispositivo para a amostra. Em contraste, a imobilização através de ligações covalentes é mais apropriada ao superar este problema de migração. Esta imobilização pode-se fazer em uma membrana ou diretamente na superfície do transdutor, algumas das ligações covalentes não alteram a estrutura quaternária das proteínas e enzimas, evitando a perda da atividade enzimática (KRAJEWSKA, 2004).

2.4. QUITOSANA

A quitosana é o segundo biopolímero mais abundante da natureza depois da celulosa, este biomaterial se obtém da quitina presente no exoesqueleto dos artrópodes, das estruturas internas dos invertebrados e dos tecidos de alguns fungos.

Comercialmente a quitosana é obtida das conchas dos crustáceos, cujo exoesqueleto é um resíduo proveniente da indústria pesqueira que apresenta altas quantidades de quitosana em comparação com outras fontes deste biopolímero (ARANAZ et al., 2009). A estrutura da quitina é similar a da celulose, com uma única diferença que a quitosana tem a presença de grupos acetamino ($-NHCOCH_3$) no carbono dois, basicamente a quitina é uma *N*-acetilglucosamina, composta de ligações β(1→4) 2-acetamino-2-deoxy-β-D-glicose, esta estrutura é representada na Figura 4. A quitina além de ser um polissacarídeo linear, é também nitrogenado o que permite desenvolver uma serie de caraterísticas como alta rigidez, elasticidade e cor branca. Este biopolímero é altamente hidrofóbico e não solúvel em água e alguns solventes orgânicos (ARANAZ et al., 2009; DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004).

As conchas dos crustáceos (exoesqueleto) estão compostas de 30-40% de proteína, 30-50% de carbonato de cálcio e 20-30% de quitina. Também apresenta pigmentos como carotenoides (ARANAZ et al., 2009). O processo de transformação da quitina em quitosana envolve uma série de procedimentos que são resumidos em quatro etapas. As três primeiras etapas (desmineralização, desproteinização e descoloração), as quais estão orientadas visando a separação e purificação da quitina presente nas estruturas biológicas, finalmente a última etapa envolve a transformação do grupo acetamino ($-NHCOCH_3$) presente na quitina em grupo amino ($-NH_3$). O processo está representado na Figura 5.

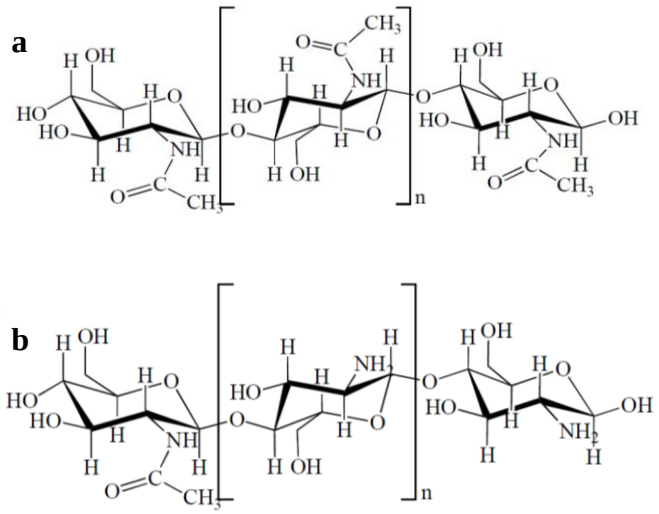


Figura 4. Fragmento de uma cadeia de quitina 100% acetilada (A) e de um fragmento de quitosana parcialmente desacetilado.

Fonte: ARANAZ et al., 2009.

Desmineralização: Em esta etapa se remove minerais como cálcio e fósforo presentes nas estruturas biológicas junto à quitina. Estes minerais são eliminados em forma de carbonatos e fosfatos com o uso de ácidos.

Desproteinização: Após à eliminação dos minerais, há uma remoção das proteínas e gorduras empregando uma base como o hidróxido de sódio. As proteínas se solubilizam e as gorduras se saponificam. O uso de altas temperaturas nesta etapa melhora a eficiência do processo.

Descoloração: Também conhecido como branqueamento, nesta etapa os pigmentos que geram a coloração nos exoesqueleto dos artrópodes são removidos empregando solventes orgânicos como hipoclorito de sódio ou peróxido de hidrogeno.

Desacetilação: Nesta última etapa o grupo acetamino ($-NHCOCH_3$) presente na quitina é hidrolisado até se obter o grupo amino ($-NH_3$) caraterístico da quitosana, este processo é feito na presença de hidróxido de sódio. O grau de desacetilação é a conversão (hidrólise) do grupo acetamino em amino, esta conversão é reportada em porcentagem, sendo muito importante, pois desta dependem as propriedades físico-químicas deste biopolímero como sua solubilidade, viscosidade, propriedades mecânicas, entre outras.

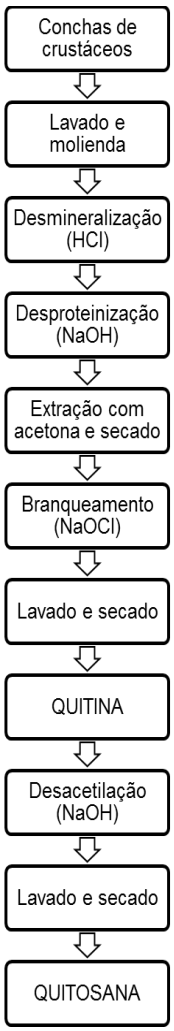


Figura 5. Obtenção da quitina e a quitosana desde as conchas dos crustáceos.

Fonte: ARANAZ et al., 2009, adaptado pelo autor.

Segundo Dutta; Dutta; Tripathi, (2004), a quitosana apresenta uma série de propriedade químicas e biológicas que se apresentam a continuação:

Propriedades químicas:

- Poliamida linear.
- Grupo amino reativo.
- Grupo hidroxilo reativo.
- Composto quelante para alguns íons metálicos.

Propriedades biológicas:

- Biocompatível: Polímero natural, biodegradável em condições fisiológicas, seguro e não toxico.
- Efeito regenerativo ao tecido conetivo.
- Acelera a formação de osteoblastos vinculados á formação do osso.
- Hemostático.
- Fungistático.
- Espermicida.
- Antitumoral.
- Anticolestérico.

Devido à presença do grupo amino e pelas propriedades anteriormente citadas, a quitosana é amplamente aplicada nas áreas de medicina, ciência dos materiais e na tecnológica de alimentos. nesta ultima a quitosana é usada como conservante, estabilizante, antioxidante, emulsificante, clarificante de sucos de frutas, encapsulante de aromas, etc. Também é amplamente usada para o desenvolvimento de embalagens de alimentos (CAVALCANTE; MONTENEGRO; MONTENEGRO, 2006).

2.5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

2.5.1. ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA (UV-VIS)

Esta técnica consiste na incidência da radiação sobre uma amostra em uma faixa de comprimento de onda entre 190 até 800nm. Quando a radiação atravessa um material, uma fração desta radiação pode ser absorvida e consequentemente excitar os

átomos e moléculas da amostra, passando de um estado de baixa energia para um estado de maior energia. A energia nesses átomos ou moléculas esta quantizada, portanto, a radiação eletromagnética que uma amostra pode absorver é igual à diferencia energética entre os dois estados permitidos na mesma. Com esta técnica pode-se determinar a vibração dos átomos e das moléculas (BERBERAN; SANTOS, 2012; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2000). O modelo do oscilador harmônico é usado para descrever o comportamento vibracional dos átomos e moléculas, o qual supõe que as oscilações dos núcleos de um átomo ou molécula em torno das respectivas posições de equilíbrio são de pequena amplitude, o modelo é:

$$E_{vib} = \left(V + \frac{1}{2}\right) h\nu = \left(V + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega, \qquad (1)$$

onde a energia vibracional (E_{vib}) esta descrita pela constante de Planck ($h, \hbar = h/(2\pi)$), pela freqüência do modo normal ($\omega = 2\pi\nu$), e pelo número quântico vibracional (V) que toma valores inteiros (0, 1, 2,..) (BERBERAN; SANTOS, 2012). Na Figura 6 se apresenta uma curva de distribuição dos níveis energéticos de acordo ao modelo oscilador harmônico, onde se pode observar que a distribuição é decrescente com os níveis de V.

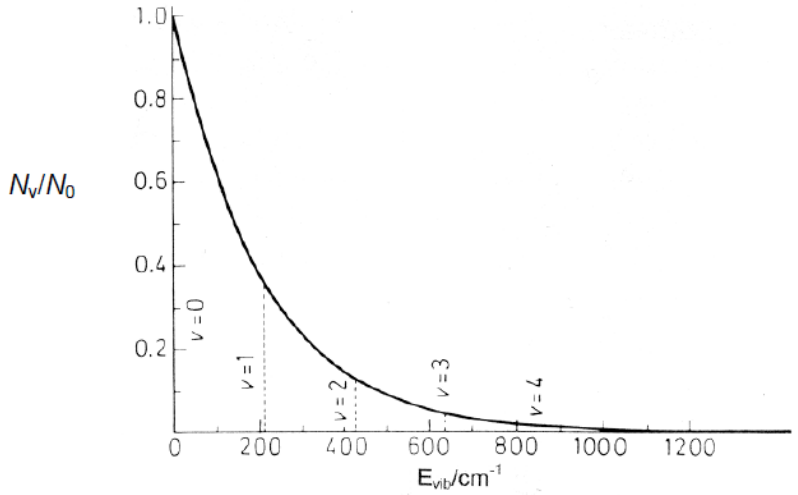


Figura 6. Esquema representativo da população relativa (N_v/N_o) dos níveis energéticos de um oscilador harmónico a 300K para a molécula de I_2.

Fonte: BERBERAN; SANTOS, 2012.

No modelo do oscilador harmônico, a frequência esta dada pela equação:

$$v = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{\mu}}, \qquad (2)$$

onde K, é a constante de força ou restituição, a qual denota a forca necessária para gerar um desvio do átomo em relação com sua posição de equilíbrio, e μ, a massa reduzida. Por tanto, uma frequência elevada esta relacionada com uma forte ligação (BERBERAN; SANTOS, 2012).

No modelo harmônico rotacional também se supõe que os ângulos e distancias intermoleculares não são afetados pelo movimento rotacional, com este suposto, o modelo harmônico rotacional serve como aproximação para descrever o comportamento de moléculas com energia rotacional não muito elevada (BERBERAN; SANTOS, 2012), assim, a energia rotacional é descrita pela equação:

$$E_{rot} = J(J+1)\frac{\hbar^2}{2I} = J(J+1)B, \quad (3)$$

onde I, é o momento de inercia e J, o número quântico rotacional que só toma valores inteiros (0, 1, 2. 3,...). Para moléculas diatômicas e lineares, o momento de inercia I, é proporcional à massa reduzida (μ), pela distancia internuclear (R):

$$I = \mu R^2, \quad (4)$$

pela sua vez, a massa reduzida é expressa em termos das massas dos núcleos (moléculas diatômicas):

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}. \quad (5)$$

Os níveis de energia rotacional são apresentados na Figura 7, onde se observa que esta energia é proporcional ao número quântico rotacional, e inversamente proporcional ao momento de inercia (BERBERAN; SANTOS, 2012).

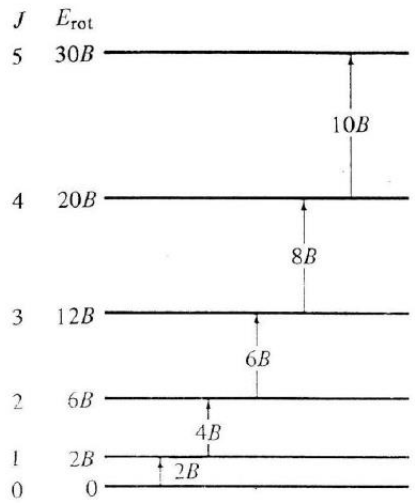


Figura 7. Esquema representativo dos níveis rotacionais de uma molécula linear.

Fonte: BERBERAN; SANTOS, 2012.

A absorbância A, apresenta um máximo quando a energia da radiação coincide com o intervalo de energia vibracional (E_{vib}). A absorbância é descrita pela lei de Beer-Lambert: $A = \log(I / I_o) = \varepsilon cl$, onde I, é a intensidade de luz incidente sobre a amostra, I_o, a intensidade de luz refletida, l, a espessura da amostra, ε, a absortividade molar e c, a concentração molar do soluto (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2000). Na síntese de nanopartículas, c, representa a concentração das nanopartículas em solução, portanto um aumento da concentração leva a um incremento na absorbância do pico, indicando uma maior eficiência no processo de síntese.

As nanopartículas metálicas são materiais que apresentam um aumento da absorbância para um comprimento de onda especifico, o qual é conhecido como ressonância de plasmon de superfície (RPS). A Figura 8 representa um espectro ultravioleta característico em nanopartículas de ouro, apresentando um pico característico entre 510-560 nm (RPS) (SHERVANI; YAMAMOTO, 2011[a]).

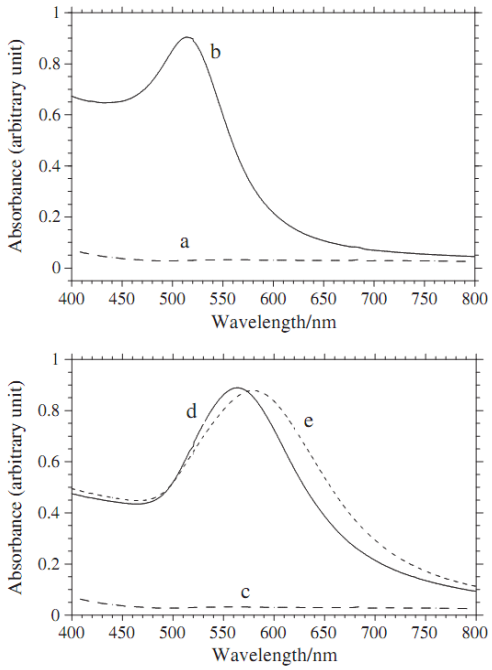


Figura 8. Uv-Vis de nanoapartículas de ouro.

Fonte: SHERVANI; YAMAMOTO, 2011[a].

Um espectrofotômetro ultravioleta está constituído basicamente por um jogo de lâmpadas, um monocromador e um detector de luz. Duas lâmpadas são comumente usadas, a primeira feita de deutério que emite radiação eletromagnética na região ultravioleta do espetro (400-200 nm), paralelamente a lâmpada de tungstênio é empregada para emitir luz com comprimento de onda na região visível do espetro (750-400 nm). Assim, pode-se obter um feixe de luz entre 200 até 750 nm, esta luz deve atravessar o monocromador cuja função é espalhar a luz em todas suas longitudes que a compõe e filtrar por comprimento de onda. Posteriormente a luz que sai do monocromador é dirigida à amostra, a luz que consegue atravessar o material em estudo ou luz transmitida é detectada por um detector de luz. Os cálculos de absorbância são determinados de acordo com a lei de Beer-Lambert (CLARK; FROST; RUSSELL, 1993; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2000).

2.5.2. ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ

Esta técnica é comumente empregada para a caracterização físico-química de coloides nos quais ao menos um dos seus constituintes tem uma dimensão entre 1nm e 1mm. Assim, a luz é espalhada na amostra para posteriormente analisar as flutuações da intensidade da luz no tempo. Normalmente as flutuações da intensidade estão associadas ao movimento Browniano das partículas em solução as quais se difundem no meio por difusão, tendo um coeficiente de difusão (D) caraterístico (CANEVAROLO, 2007). Este coeficiente relaciona-se com a fração de volume da fase dispersa quando tende a zero ($\Phi \rightarrow 0$) pela equação:

$$D = D_o(1 + B_{din} \cdot \Phi), \qquad (6)$$

onde D_o é o coeficiente de difusão para uma diluição infinita, ou seja, quando $\Phi \to 0$, e B_{din} é o coeficiente viral dinâmico. Finalmente, a determinação do D_o emprega-se para calcular o tamanho da partícula que está relacionado com o raio hidrodinâmico das mesmas (R_h), supondo uma geometria esférica, assim:

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0}, \tag{7}$$

onde k_B é a constante de Stefan Boltzmann, T a temperatura (K) e η a viscosidade do solvente (CANEVAROLO, 2007). A Figura 9 representa um diagrama com a distribuição de tamanho de partícula obtido para uma amostra contendo AuNP, com tamanhos entre 4 e 29 nm.

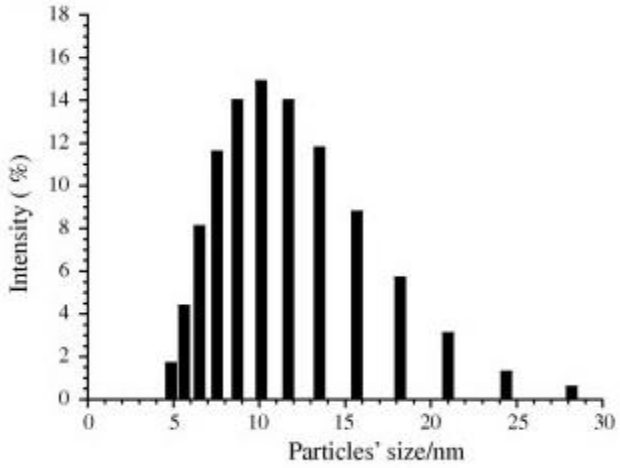


Figura 9. Distribuição de partículas de ouro obtido por espalhamento dinâmico de luz.

Fonte: ZERVANI; YAMAMOTO, 2011[b].

2.5.3. CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL ZETA (PZ)

O potencial Z é uma técnica que se emprega para quantificar a carga elétrica em volta das partículas de um coloide. Assim, quando uma partícula está no coloide, esta

possuirá uma carga liquida que logo atrairá íons de carga oposta na sua superfície. Basicamente os íons de carga oposta se distribuem ao redor da partícula formando duas camadas: Uma camada interna que está em contínuo contato com a partícula, e que é conhecida como camada de Stern (S*tern layer*) na qual os íons estão fortemente ligados à partícula, e uma segunda camada onde os íons estão ligados fracamente (camada externa) (ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004).

Assim, uma partícula no coloide terá um conjunto de camadas de íons na sua superfície, as quais se vão movimentar junto à partícula, esta camada de íons é conhecida como limite de carga superficial ou superfície de corte hidrodinâmico. Dessa forma, as cargas opostas que ficam fora do limite de carga superficial não se moverão junto à partícula. O pZ determina a diferença de potencial entre a camada limite e a superfície da partícula (ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004), como se apresenta na Figura 10.

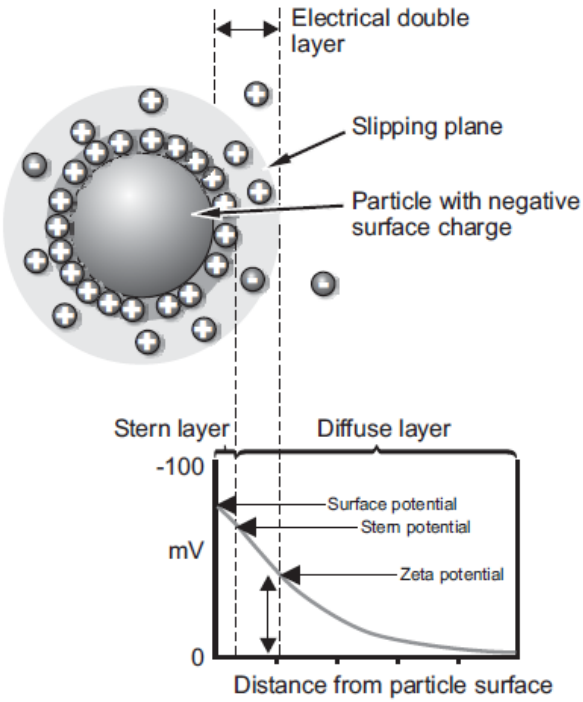


Figura 10. Carrega superficial de uma partícula.

Fonte: ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004.

Os valores do pZ podem ser positivos ou negativos e dependem da natureza da partícula. Partículas que possuem valores maiores do pZ apresentam uma camada maior de íons na sua superfície (e porém maior diferença de potencial entre a superfície de corte hidrodinâmico e a superfície da partícula), e vice-versa. Os valores de pZ podem ser relacionados com a estabilidade do coloide. De forma geral, coloides contendo partículas que possuam um pZ em modulo maior que 30mV apresentam alta estabilidade coloidal, na qual a camada hidrodinâmica evita (por interações eletrostáticas) a interação partícula-partícula que leva à geração de aglomerados e presença de precipitados no coloide (ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004). Como se apresenta na Figura 12, os valores de pZ para uma nanopartícula em meio coloidal mudam com o pH.

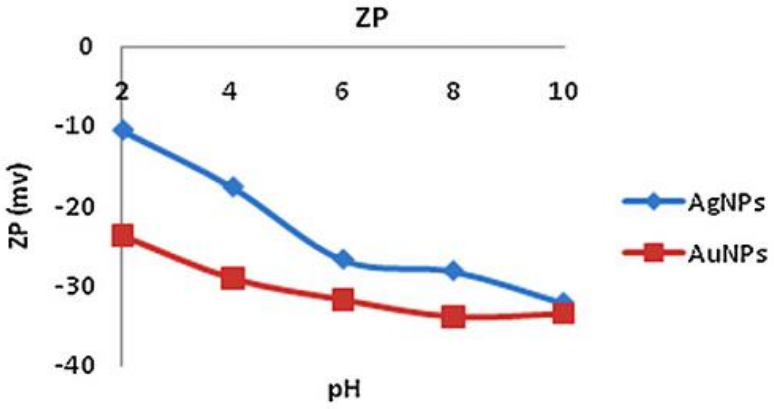


Figura 11. Potencial Zeta de soluções de nanopartículas (ouro e prata) a diferentes valores de pH.

Fonte: DUBEY et al., 2010[a].

Para a determinação do pZ, um campo elétrico é aplicado na solução, contendo as partículas carregadas, as quais vão se movimentar ao eletrodo com carga oposta. Assim, a velocidade de uma partícula dependerá de fatores como: diferença de potencial aplicada, permissividade do meio (ε), viscosidade do meio (η) e pZ. Ao conhecer a

mobilidade eletroforética do sistema U_E, o pZ pode ser calculado através da equação de Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon(pZ)f(\kappa a)}{3\eta}, \quad (8)$$

onde $f(\kappa a)$ é conhecida como a função de Henry que toma valores entre 1,0 e 1,5 (ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004).

2.5.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A MEV é uma técnica de caracterização que teve suas origens com o trabalho feito por Ernst Ruska & Max Knoll em 1931, e que têm sido amplamente pesquisadas até a atualidade. O uso do MEV em comparação com o microscópio óptico convencional permite obter imagens com maior resolução ao utilizar elétrons para formar a imagem e não a luz como no microscópio óptico convencional. De forma geral o MEV apresenta uma resolução de 10 nm, com aumentos entre 20 e 100.000 vezes da imagem original (CANEVAROLO, 2007).

Para uma ótima interpretação da imagem obtida no MEV, devem-se conhecer os tipos de interações entre os elétrons (usados no equipamento) e a amostra, basicamente estas interações podem ser de dois tipos:

- Espalhamento elástico ou espalhamento de Rutherford: processo em que a energia do elétron não é alterada, mas sua trajetória sim resulta modificada. Neste processo a energia cinética do elétron permanece constante, assim o espalhamento dos elétrons ocorre como resultado da interação eletrostática entre o feixe primário e o núcleo de um átomo da amostra. Este tipo de processo é de importância no

retroespalhamento a qual permite obter imagens com contraste maior (CANEVAROLO, 2007).

- Espalhamento inelástico: neste processo ocorre a perda de energia dos elétrons que incidem na amostra, além da mudança da sua trajetória. A perda de energia dos elétrons que incidem é transferida para os elétrons de átomos da amostra que são excitados. Ao retirar o feixe de elétrons, os átomos da amostra relaxam até seu estado fundamental, levando a uma emissão de raios x, comumente conhecido como espectrofotometria de dispersão de energia, e que serve para detectar a presença de átomos específicos na amostra (CANEVAROLO, 2007).

2.5.5. ANALISE ELÉTRICO: CURVAS CORRENTE-TENSÃO (I-V)

A medição e analise das curvas corrente-tensão, é uma técnica na qual a amostra sólida é colocada entre dois eletrodos, para logo ser submetida a uma aplicação de tensão elétrica. O objetivo desta técnica é observar o comportamento elétrico do sistema sólido e como é o transporte dos elétrons ou eventualmente dos íons como resultado da diferença de potencial aplicada (no caso de análise DC). Uma curva típica de corrente-tensão (I-V) para um material polimérico é apresentada na Figura 12.

No presente trabalho, esta técnica permitirá conhecer o transporte eletrônico nas membranas de quitosana e como este é modificado quando adicionadas as nanopartículas de ouro e posteriormente as enzimas. Também a traves das curvas corrente-tensão se pode observar a resposta elétrica do biossensor quando está em contato com diferentes concentrações de peroxido de hidrogênio (ZHAO; HENKENS; CRUMBLISS, 1996).

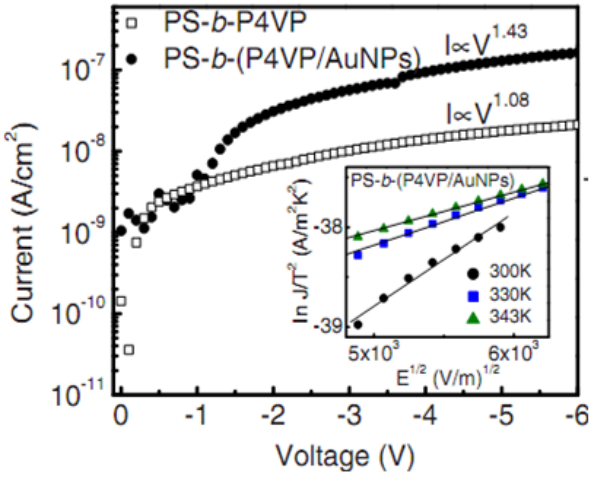


Figura 12. Curva corrente-tensão de um polímero sintético.

Fonte: LEONG et al., 2008.

2.5.6. ANALISE ELÉTRICO: ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA (EI)

A espectroscopia de impedância é uma técnica elétrica onde a amostra é colocada entre dois eletrodos, uma tensão alternada de amplitude fixa é aplicada variando a freqüência. Esta técnica permite conhecer as propriedades elétricas como condutividade, resistividade, constante dielétrica, entre outras, assim como a movimentação dos íons na amostra sólida ou eventualmente o transporte eletrônico, podendo ser analisados em função da temperatura (JONSCHER, 1983; MALLICK; SARKAR, 2000).

Nos circuitos elétricos polarizados com tensão alternada, a relação entre os fasores de corrente (**I**) e a tensão (**V**) está dada pela lei de Ohm generalizada: $\mathbf{V} = \mathbf{IZ}$, onde **Z** é a impedância complexa. A parte real da impedância é a componente resistiva (*R*) ou, e a parte imaginaria é a componente reativa (X), como apresentando

anteriormente na seção 2,3 (sensores impedimétricos). Para circuitos compostos por resistor-capacitor, a impedância é denotada pela equação $Z = \sqrt{R^2 + X^2}$, (JONSCHER, 1983; VALENZUELA, 2002). A resistência elétrica (*R*) é um fenômeno físico que faz referencia à oposição que tem um material ao ser atravessado por uma corrente elétrica. A reatância (*X*) faz referência à ao acúmulo de energia pelo capacitor em forma de campo elétrico, ou em forma de campo magnético no caso de um indutor. Em um circuito *RLC* (*R*, resistor, *L*, indutor, *C*, capacitor) conectado em serie, a reatância pode-se expressar como: $X = \omega L - 1/\omega C$, onde ω, denota a frequência angular (onde $\omega = 2\pi f$, sendo *f*, a frequência em hertz). L e C são os valores de indutância e capacitância respectivamente para um circuito (JONSCHER, 1983; VALENZUELA, 2002).

Na espectroscopia de impedância, os processos de dispersão mais simples são a relaxação e a ressonância, em alguns materiais estes processos se podem representar através de um circuito *RC* (*R*, resistor, *C*, capacitor) em paralelo (JONSCHER, 1983; VALENZUELA, 2002). No circuito *RC* em paralelo, R, representa a resistência do material e C, a capacitância geométrica do capacitor quando o material (exemplo um polímero) está preso entre os dois eletrodos (JONSCHER, 1983). A reatância se expressa como $Z_{imaginario}$, Z'' ou $-\mathrm{Im}\,Z$. A resistência é conhecida como Z_{real}, Z' ou $\mathrm{Re}\,Z$. Um gráfico de Z'' Vs. Z' se denomina como gráfico Cole-Cole ou de Nyquist (JONSCHER, 1983; VALENZUELA, 2002), os quais podem ser obtidos a diferentes isotermas.

Em materiais cujo comportamento elétrico é representado como um circuito *RC* (Figura 13), o gráfico Cole-Cole tem uma resposta similar à de um semicírculo e que representa a cinética de transporte das cargas na amostra, assim a intercepção de este

semicírculo com o eixo Z' permite determinar a resistência elétrica do material na temperatura na qual foi feita a medição, onde o incremento da temperatura pode gerar um decrescimento na resistência do material (Z_{real}) como apresentado na Figura 13. Na região de frequências menores, se observa uma línea adjacente ao semicírculo que representa duas possíveis situações: efeito dos eletrodos originado pelo contato entre os eletrodos e a amostra ou os processos de transporte de massa por difusão. O semicírculo denota a componente resistiva e capacitiva do material em estudo (CASTILLO et al., 2009; JONSCHER, 1983). Em alguns casos, o efeito dos eletrodos também podem ser descritos com um circuito RC paralelo.

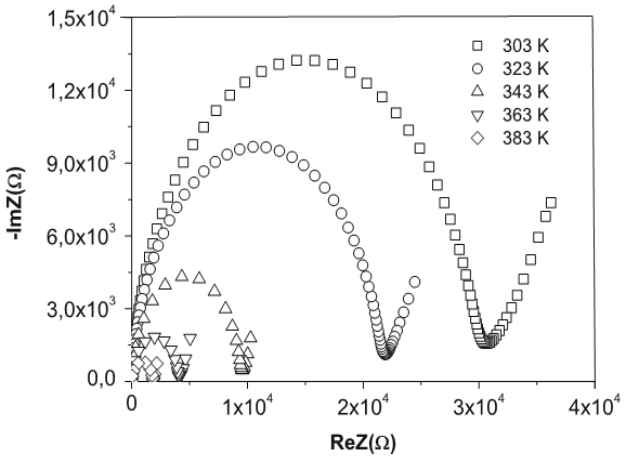


Figura 13. Diagrama Cole-Cole obtido a diferentes isotermas de uma membrana de amido de mandioca plastificada com glicerol.

Fonte: AYALA et al., 2009.

3. MODELOS TEÓRICOS NO ESTUDO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DOS MATERIAIS ORGÂNICOS

Em dispositivos orgânicos, a corrente pode estar controlada por dois fatores: injeção de carga desde os eletrodos até a amostra (1) ou mecanismo de transporte no interior do material (2). O mecanismo que for dominante (1 ou 2) determinará a dependência da corrente como função da tensão (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001). O presente trabalho, tem como objetivo estudar as curvas corrente-tensão das membranas de quitosana, quitosana/AuNP e quitosana/AuNP/HRP para conhecer qual é o possível mecanismo que predomina no transporte (injeção de carga ou transporte eletrônico no material). Dessa forma, os possíveis modelos que predominam os dois mecanismos de transporte são apresentados a continuação:

3.1. MODELOS TEÓRICOS PORPOSTOS PARA A INJEÇÃO DE CARGA NOS MATERIAIS ORGÂNICOS.

A injeção de carga entre os eletrodos e a amostra tem sido extensamente estudada, assim, são dois os modelos que descrevem este comportamento: a emissão termiônica de Richardson-Schottky (eq. 9) e o tunelamento de Fowler-Nordheim (eq. 10), na primeira se observa que a corrente depende exponencialmente da tensão aplicada e na segunda a corrente depende do produto da tensão aplicada ao quadrado pela exponencial do inverso da tensão (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001), assim:

$$I_{RS}(V)\,\alpha\, e^{\sqrt{AV}}. \qquad (9)$$

$$I_{FN}(V)\,\alpha\, V^2 e^{\frac{B}{V}}. \qquad (10)$$

3.2. MODELOS TEÓRICOS PORPOSTOS PARA O TRANSPORTE ELETRÔNICO NOS MATERIAIS ORGÂNICOS.

Na literatura a maioria dos modelos propostos para o estudo do transporte eletrônico está baseada nas equações sugeridas para o transporte em materiais inorgânicos semicondutores. Na literatura se reporta o transporte eletrônico em dispositivos com geometria simples do tipo: contato/membrana orgânica/contato, com simetria de translação nas direções paralelas às interfaces, onde o estudo destes pode-se fazer empregando modelos unidimensionais (direção do transporte). Para o analise, algumas leis fundamentais devem ser usadas, tais como a lei de continuidade para estado estacionário (eq. 11) que descreve a conservação da carga, a equação de Poisson (eq. 12) para a distribuição do potencial elétrico e a eq. (13), que relaciona o campo elétrico (E) com o potencial eletrostático (V), (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001; WANG, 1999):

$$\frac{dj}{dx} = 0, \tag{11}$$

$$\frac{dE}{dx} = \frac{q}{\varepsilon} n, \tag{12}$$

$$\frac{dV}{dx} = -E, \tag{13}$$

onde j é a componente da densidade de corrente na direção do transporte (x), n, a densidade dos portadores, E, a componente do campo elétrico na direção do transporte e q, a carga do elétron. Com as condições de contorno apropriadas, estas equações fornecem informação da densidade de corrente de elétron e buracos, assim como campo elétrico e potencial eletrostático.

Não todos os dispositivos apresentam transporte por buracos, e neste caso, podem-se aplicar modelos unipolares, o qual simplifica o estudo de estes sistemas (WALKER; KAMBILI; MARTIN, 2002).

Para a análise do transporte eletrônico em dispositivos, se faz necessário definir um volume de controle[1]. Ao ser aplicado uma diferença de potencial no volume de controle, os elétrons (carga negativa) vão se deslocar para a fronteira do volumem de controle com carga oposta de acordo com o expressado na equação de arraste (ou *drift*) (eq. 14). Se a diferença de potencial é mantida no tempo, acontecerá um acúmulo de elétrons na fronteira, gerando uma gradiente onde há regiões com maior densidade de carga. Nesta situação, ocorrerá um deslocamento dos elétrons em direção oposta ao campo aplicado, de regiões de maior densidade de carga para regiões com menor densidade de carga, a qual é descrita pela equação de difusão (eq. 15):

$$j_{drift} = qn\mu E, \tag{14}$$

$$j_{\text{difusão}} = qD\frac{dn}{dx}, \tag{15}$$

onde μ é a mobilidade de carga e D, o coeficiente de difusão. A eq. (16) apresenta o balance no transporte de carga para um volume de controle.

$$j = qn\mu E - qD\frac{dn}{dx}. \tag{16}$$

Esta eq. (16) é conhecida como aproximação de drift-difusão e junto às equações 11, 12 e 13, são usadas para o estudo do transporte eletrônico em dispositivos orgânicos. Em ausência de informação mais específica, estas equações podem ser empregadas para descrever o comportamento nos materiais derivados de fontes biológicas com transporte unidimensional e desconsiderando a presença de buracos na estrutura do material

[1] Volume de controle ou sistema aberto: é um espaço imaginário aonde vão se analisar como os elétrons se movimentam no sistema em estudo.

(BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001), sendo aplicadas para o analise das membranas de quitosana/AuNP e quitosana/AuNP/HRP que são objeto de estudo neste trabalho.

Quando os materiais orgânicos são avaliados através de curvas corrente-tensão, são percebidos diferentes mecanismos de transporte eletrônico que estão em função da tensão aplicada, sendo atribuídos à presença de armadilhas no material orgânico, que atuam como poços de potencial com níveis discretos de energia. Em um material constituído por um único componente, as armadilhas são devidas a irregularidades ou defeitos no mesmo e atuam como poços de potencial onde os elétrons podem ficar confinados. Em um material constituído por mais de um componente, os poços de potencial podem ser devidos à diferença de afinidade eletrônica ou da função trabalho entre os materiais[2] (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001).

Para tensões baixas, os materiais orgânicos apresentam um comportamento ôhmico da forma $j = \sigma E$. Nesta faixa de tensões não é percebido o feito das armadilhas devido a que a energia dos elétrons provenientes dos eletrodos é inferior à energia das armadilhas presente no material (as armadilhas não estão ativadas). Assim, a corrente registrada na faixa de tensões baixas é devida ao tunelamento dos elétrons através do material.

O efeito das armadilhas sob o transporte eletrônico é percebido unicamente quando a energia dos elétrons é igual à energia das armadilhas, este comportamento é reportado em materiais avaliados numa faixa de tensões não muito baixas. O modelo matemático que descreve este comportamento foi proposto por Mott-Gurney, conhecido como SCLC (*Space charge limited current*). Esta equação é uma solução analítica da

[2] Afinidade eletrônica pode-se entender como a quantidade mínima de energia que é necessária para retirar um elétron de um ânion para gerar um átomo neutro, no caso de metais é conhecido como função trabalho.

equação decontinuidade, que contempla uma série de condições como: o material deve ser um isolador perfeito com carga intrínseca e armadilhas, onde a difusão dos elétrons é negligenciada (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001). A continuação se descrevem os passos para deduzir esta equação:

O analise começa considerando o balance no transporte de carga em um volume de controle (eq. 16) e desconsiderando o termo da difusão das cargas, assim, rearranjando se obtém:

$$j = qn\mu E - \cancel{qD\frac{dn}{dx}} \Rightarrow n = \frac{j}{q\mu E}, \tag{17}$$

considerando a equação de Poisson para a distribuição do potencial elétrico (eq. 12) e substituindo o n pelo obtido na eq. (17), rearranjando:

$$\frac{dE}{dx} = \frac{j}{\mu\,\varepsilon\,E}, \tag{18}$$

a eq. (18) pode ser integrada considerando as condições de contorno para o campo elétrico $E(0) = 0$ e $E(L) = E$, na região entre $x = 0$ e $x = L$ (volume de controle) (eq. 19) e considerando a lei de continuidade para estado estacionário (j constante, eq. 11), resolvendo se obtém a eq. (20):

$$\int_0^E EdE = \frac{j}{\mu\varepsilon}\int_0^x dx \tag{19}$$

$$E = \left(\frac{2j}{\varepsilon\mu}\right)^{1/2}\sqrt{x}, \tag{20}$$

substituindo o campo elétrico da eq. (17), pelo obtido na eq. (20), rearranjando:

$$n = \left(\frac{\varepsilon\, j}{2q^2\mu}\right)^{1/2}\frac{1}{\sqrt{x}}. \tag{21}$$

Esta equação fornece a distribuição de n no espaço. Considerando a equação que relaciona o campo elétrico com o potencial eletrostático (eq. 13), e integrando com as condições de contorno para a tensão $V(0)=0$ e $V(L)=V$, temos que:

$$\int_0^V dV = \int_0^L E(x)dx, \tag{22}$$

onde o campo elétrico $E(x)$, pode ser substituído pelo obtido na eq. (20), resolvendo a integral (eq. 23) e rearranjando em função de j se obtém a eq. (24):

$$\int_0^V dV = \left(\frac{2j}{\varepsilon\mu}\right)^{1/2} \int_0^L x^{1/2}dx, \tag{23}$$

$$j_{SCLC} = \frac{9}{8}\varepsilon\mu\frac{V^2}{L^3}, \tag{24}$$

onde L é a espessura da membrana. A eq. (24) expressa que no caso de um modelo unipolar, o comportamento elétrico de um material isolante sem presença de cargas intrínsecas e com armadilhas quando aplicado uma diferença de potencial, apresentará uma dependência quadrática da corrente com tensão aplicada (BRÜTTING; BERLEB; MÜCKL, 2001).

Com o aumento da tensão e a ativação das armadilhas, os elétrones tem uma probabilidade de cair nos poços de potencial, podendo sair deles quando a energia do elétron é igual à energia do seguinte poço para onde vai se deslocar. Dessa forma, a corrente no material orgânico aumenta menos rapidamente ao proposto no modelo SCLC (onde aumenta proporcionalmente ao quadrado da tensão), isto porque a presença de armadilhas contribui à captura de elétrons. Estes poços de potencial estão distribuídos em níveis discretos de energia os quais são preenchidos em função do campo elétrico aplicado e do tempo. Brütting; Berleb; Mückl, (2001) reportaram uma relação entre as cargas livres (n) e o numero de cargas total no material ($n + n_t$), proposto com a finalidade de descrever o preenchimento das armadilhas:

$$\theta = \frac{n}{n + n_t}. \tag{25}$$

O transporte eletrônico pode ser estudado considerando o efeito do preenchimento das armadilhas, este modelo é conhecido como TCLC (*Trap Charge Limited Current*) e se apresenta a continuação:

$$I_{TCLC}(V) = N_C \mu q \left(\frac{\varepsilon l}{N_t q (l+1)} \right)^l \left(\frac{2l+1}{l+1} \right)^{l+1} \frac{V^{l+1}}{L^{2l+1}}, \tag{26}$$

onde l, é igual a E_t/K_BT, sendo E_t a energia referente à armadilha. Na análise dos diferentes regimes, deve ser levada em conta também o formato da barreira de potencial, trapezoidal ou triangular.

A Figura 14 representa o comportamento observado para um isolante contendo um único tipo de armadilhas. Assim, para tensões baixas se pode observar que a corrente apresenta um comportamento linear com a tensão aplicada, de acordo à lei de Ohm (região 1 na Figura 14). Com o aumento da tensão (e com a igualação das energias dos elétrons com as das armadilhas), o mecanismo de transporte muda, sendo agora descrito pelo modelo SCLC onde a corrente varia proporcionalmente ao quadrado da tensão (região 2 na Figura 14). O preenchimento total das armadilhas faz que a corrente no material seja maior, devido a que os elétrons podem atravessar o material sem ficar confinados nas armadilhas, contudo o comportamento neta situação ainda é descrito pela dependência quadrática com a tensão (região 4 na Figura 14). A transição entre um preenchimento de armadilhas parcial e o total, faz que para uma tensão fixa (V_{TFL}), no caso ideal, ou uma faixa de tensões no caso real, a corrente incremente em varias ordens de grandeza. Nesta faixa e corrente seria descrita pelo modelo TCLC (com $n = \alpha$), no caso ideal, como mostrado na Figura 14, $\alpha = \infty$.

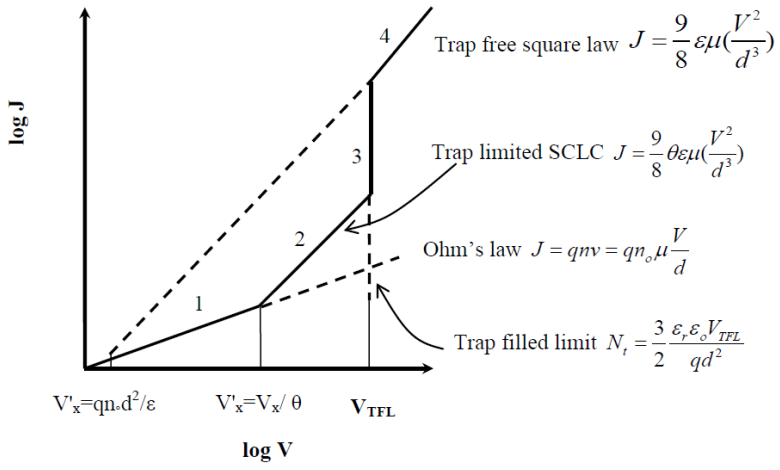


Figura 14. Comportamento elétrico de um isolador em função da tensão aplicada.

Fonte: SALEEM, 2010.

Os modelos SCLC e TCLC são caraterizados por serem unipolares e unidimensionais, em contraste com estes modelos, Zabet e Dhirani (2008), que reportaram uma equação para o transporte nos materiais orgânicos da forma: $I(V)\alpha(V - V_T)^{\xi}$, onde o parâmetro ξ é um exponente que este relacionado com a dimensionalidade do transporte (uni-, bi- ou tri-dimensional) e o parâmetro V_T, que é a tensão limiar, debaixo da qual não existe transporte (LEONG et al., 2008).

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo Geral:

- Desenvolver um biossensor de peroxido de hidrogênio usando peroxidasse da raiz-forte (Horse Radish Peroxidase, HRP) como biorreceptor e usando quitosana com nanopartículas de ouro como matriz polimérica.

4.2. Objetivos Específicos:

- Sintetizar nanopartículas de ouro (AuNP) usando métodos biológicos, baseados no uso de monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, extratos de cascas de frutas e folhas de hortelã como agentes redutores.
- Escolher o melhor agente redutor para a síntese de nanopartículas e caracterizar estes nanomateriais via espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis) assim como suas dimensões características, utilizando espalhamento de luz quase-elástico e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para determinação do tamanho de partícula e carga superficial (potencial zeta) para determinação de carga superficial.
- Produzir membranas de quitosana e caracterizá-las morfologia e eletricamente via microscopia eletrônica de varredura (MEV), curvas corrente-tensão (I-V) e espectroscopia de impedância (EI).
- Desenvolver membranas de quitosana/AuNP e caracterizá-las morfológica e eletricamente via microscopia eletrônica de varredura (MEV), curvas corrente-tensão (I-V) e espectroscopia de impedância (EI).
- Sintetizar membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP e caracterizá-las morfologia e eletricamente via microscopia eletrônica de varredura (MEV), curvas corrente-tensão (I-V) e espectroscopia de impedância (EI).

- Avaliar a atividade enzimáticas do HRP nas membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP.
- Avaliar a mudança das propriedades elétricas das membranas quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP ao contato de soluções de tampão fosfato contendo diferentes concentrações de peroxido de hidrogênio a traves de curvas I-V,
- Validar o princípio de operação do biossensor proposto.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAIS

No presente trabalho utilizou-se quitosana com um grau de desacetilação de 85% da Polymar (Brasil). O amido solúvel, glicose, sacarose e a frutose foram adquiridos pela Synth (Brasil). A maltose e a galactose foram adquiridas da VETEC QUIMICA FINA LTDA (Brasil). A lactose foi adquirida pela J.T. Baker Chemical (Estados Unidos). As cascas das frutas de abacaxi (*Ananas comosus*), banana (*Musa sp.*), maracujá (*Passiflora edulis*), tangerina (*Citrus reticulata*) e folhas de hortelã (*Mentha piperita*) foram adquiridas no mercado comercial de Pirassununga, São Paulo, Brasil. O ácido acético foi utilizado como solvente da quitosana (NEOBIO, Brasil). Para a síntese da AuNP, foi usado cloreto de ouro ($HAuCl_4$) da Synth (Brasil).

Peroxidasse (HRP Tipo VI-A) foi adquirida do SIGMA Aldrich (Brasil), esta enzima têm as seguintes características: faixa de temperatura de armazenado entre 2 e 8°C. Ótima atividade enzimática a pH entre 6,0 e 6,5. Massa molecular de aproximadamente 44kDa (SIGMA ALDRISH).

O peróxido de hidrogênio foi adquirido do LabCenter (Brasil), o guaiacol adquirido da VETEC QUIMICA FINA LTDA (Brasil).

5.2. SÍNTESES DAS NANOAPARTÍCULAS DE OURO (AuNP)

5.2.1. SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO MONO-, DI- E POLISACARIDEOS COMO AGENTES REDUTORES

As AuNP foram sintetizadas como previamente há sido reportado pelo nosso grupo de pesquisa (AYALA et al., 2012), este método está baseado no protocolo proposto por Wei e Quian (2008), onde a síntese de AuNP foi feita usando quitosana como agente redutor. Uma solução de quitosana a uma concentração de 6,92mg/mL foi preparada pela dissolução deste biopolímero em acido acético ao 1% (v/v). Posteriormente, 10 mL de esta solução foram misturados com 4 mL de solução de cloreto de ouro ($HAuCl_4$) com concentrações de 8 e 11mM, em seguida, estas misturas foram colocadas em agitação constante por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalmente a solução resultante foi colocada em banho-maria a 90°C por 3 horas, durante o aquecimento foram sintetizadas as AuNP pela reação do $HAuCl_4$ com a quitosana.

Este protocolo para a sínteses das AuNP foi usado para avaliar outros possível agentes redutores empregando-se três monossacarídeos (glicose, frutose e galactose), três dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose) e dois biopolímeros (amido solúvel e quitosana). No preparo das soluções foi utilizada água destilada como solvente, todas as soluções foram preparadas na mesma concentração reportada para quitosana (6,92 mg/mL). No caso do amido, esta solução foi aquecida até 90°C por 30 minutos com agitação constante, para garantir a uma completa gelatinização do mesmo (AYALA; AGUDELO; VARGAS, 2013). No preparo do hidrocoloide (solução de amido), empregou-se uma membrana plástica para tampar o béquer, evitando a perda de água por evaporação durante o aquecimento da mesma.

5.2.2 SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EXTRATOS DE CASCAS DE FRUTAS E FOLHAS DE HORTELÃ COMO AGENTES REDUTORES

Foram usados extratos de cascas de abacaxi (*Ananas comosus*), banana (*Musa sp.*), maracujá (*Passiflora edulis*), tangerina (*Citrus reticulata*) e folhas de hortelã (*Mentha piperita*). Estes materiais foram lavados com água destilada e secos por 5 dias em condições ambientais em uma estufa SOLAB (Brasil) com circulação de ar forçada. Após a secagem, os materias foram moídos e peneirados até um tamanho de partícula de 850 µm. O pó resultante foi colocado em frascos plásticos e armazenados a uma temperatura de 4°C.

Para a produção de extratos de folhas de hortelã, um grama do pó obtido foi disperso em 100 mL de água destilada previamente aquecida a 60°C em um béquer. A temperatura foi mantida por 10 minutos, durante todo o processo o béquer esteve fechado, para evitar perda de agua por evaporação. Esta solução foi esfriada até temperatura ambiente segundo o reportado por Mubarakali et al. (2011). A solução foi filtrada com papel filtro (com diâmetro de poro de 14 µm) e armazenada a uma temperatura de 4°C até seu uso.

O processo de produção dos extratos de cascas de frutas foi similar ao reportado para a obtenção de extratos de folhas de hortelã. Contudo, a temperatura da agua destilada foi de 90°C. Este processo apresenta algumas modificações de temperatura e tempo de síntese em relação à metodologia reportada por Bankar et al (2010[b]), quem sintetizou nanopartículas de ouro empregando extratos de cascas de banana como agente redutor e uma temperatura de 25°C por 24h.

Para a síntese de nanopartículas de ouro, todos os extratos foram misturados (10 mL de cada extrato) com uma solução de cloreto de ouro ao 8mM (4 mL), sendo homogenizados por 15 minutos e posta em banho-maria a uma temperatura de 90°C por

10 minutos, tempo no qual as amostras foram retiradas e mantidas ao abrigo de luz até esfriar, para logo ser analisadas.

5.3. PRODUÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP

Todas as membranas foram fabricadas usando a técnica de produção em placa (casting method), onde as soluções filmogênicas foram dispersas em placas plásticas de diferentes diâmetros. Primeiramente, 10 mL de uma solução de quitosana (20 mg/mL), previamente preparada foi misturada com 10 mL da solução contendo nanopartículas, as duas soluções foram misturadas por 15 minutos com agitação constante. Em seguida, os 20 mL da solução resultante foram colocados em placas plásticas de 9 cm de diâmetro. As soluções filmogênicas foram secas por 24 horas a temperatura ambiente e ausência de luz, em uma estufa SOLAB (Brasil) com circulação forçada de ar. As membranas sem AuNP foram preparadas nas mesmas condições, porém na ausência de AuNP. Estas membranas foram usadas para fazer os estudos preliminares de caraterização morfológica e elétrica.

Com a finalidade de evitar o uso excessivo de enzima, foram fabricadas membranas de menor diâmetro, assim estas membranas foram preparadas da mesma forma que o descrito previamente, com a única diferença que foi usada um volume menor de solução filmogênica de quitosana e quitosana/AuNP (6 mL), as quais foram dispersas em placas plásticas de 4,5 cm de diâmetro .

Após 24 horas todas as membranas foram retiradas para se medir sua espessura usando um micrometro de precisão e posteriormente armazenadas em papel alumínio até sua caracterização.

5.4. NEUTRALIZAÇÃO DAS MEMBRANAS E DAS SOLUÇÕES FILMOGÊNICAS

A neutralização das membranas e das soluções filmogênicas de quitosana e quitosana/AuNP foi feita como etapa previa para a imobilização da enzima, isto para garantir um pH ótimo para ação da HRP que logo será imobilizada. As membranas usadas para avaliar os diferentes métodos de neutralização foram de 4,5 cm de diâmetro.

Nesta etapa foram avaliados dois tratamentos para a neutralização: (1) neutralização por imersão das membranas em soluções e (2) neutralização da soluções filmogênicas. Em ambos os casos foram feitas comparações com membranas sem neutralizar. Os detalhes das metodologias encontram-se a seguir:

Membranas sem neutralizar: neste tratamento as soluções filmogênicas sem neutralizar foram colocadas nas placas para produzir membranas. Estas membranas foram consideradas como a amostra controle em comparação com as membranas submetidas ao processo de neutralização.

Membranas neutralizadas por imersão em soluções: a neutralização das membranas foi feita segundo o reportado por Huang, Y et al. (2005), assim, as membranas sem neutralizar foram imersas em álcool 99% para induzir a perda de água, posteriormente as membranas foram imersas em solução de NaOH dissolvido em álcool etílico (99%), propiciando a nivelação das cargas da membrana (cargas positivas) com a cargas negativas geradas pelo NaOH. Em seguida, os filmes foram imersos em diluições de álcool 70, 50, 30 e 0%. Cada etapa de imersão durou 4h e no final os filmes foram secos por 24h em uma estufa SOLAB (Brasil) com circulação forçada de ar.

Soluções filmogênicas neutralizadas: o pH destas soluções filmogênicas foi aumentado até 6,0 usando hidróxido de sódio (NaOH 1 M), e evitando aproximar-se a um pH de 6,3 onde acontece a precipitação da quitosana por causa do ponto isoelétrico

(pKa)[3] deste biopolímero (CAVALCANTE; MONTENEGRO; MONTENEGRO, 2006). Esta solução foi reservada para posterior incorporação da enzima.

5.5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA HRP NAS MEMBRANAS

A enzima HRP foi imobilizada seguindo quatro procedimentos: (1) imobilização em membranas não neutralizadas, (2) imobilização em membranas neutralizadas por imersão, (3) dispersão em soluções filmogênicas não neutralizadas e (4) dispersão em soluções filmogênicas neutralizadas.

Imobilização da HRP por imersão das membranas: As membranas sem neutralizar e neutralizadas foram imersas em béqueres contendo 14 mL de solução tampão fosfato (PBS) a 0,1 M e pH = 6,8; no qual previamente foi dispersa 0,14 mg da enzima (HRP). O processo de imersão das membranas levou 4h e foi feito numa geladeira para garantir a temperatura de 4°C e a ausência da luz. Em seguida estas membranas foram secas a temperatura ambiente por 24h numa estufa com circulação forcada de ar.

Dispersão da HRP na solução filmogênica: as soluções de quitosana e quitosana/AuNP sem neutralizar e neutralizadas foram enriquecidas com a enzima HRP. Assim, em 14 mL de solução filmogênica foram dispersas 0,14 mg da enzima. A enzima foi dispersa por agitação mecânica das soluções por 15 minutos. Durante o processo de dispersão, os béqueres foram recobertos com papel alumínio para evitar a degradação da enzima pela luz. Em seguida, as soluções filmogênicas foram dispersas nas placas plástica de 4,5 cm de diâmetro, e posteriormente secos a temperatura ambiente por 24h numa estufa com circulação forcada de ar.

[3] O pKa é o pH onde a molécula tem carga neta igual a zero.

5.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP CONTENDO HRP

Após a imobilização do biorreceptor, se faz necessário o teste do mesmo para garantir sua atividade. No caso da enzima peroxidasse, sua atividade enzimática pode ser testada pelo guaiacol, o qual é um teste qualitativo onde a peroxidasse reage com o guaiacol em presença de peroxido de hidrogênio e gera um composto conhecido como tetraguaiacol (por condensação do guaiacol). O tetraguaiacol apresenta uma coloração intensa que é percebida visualmente.

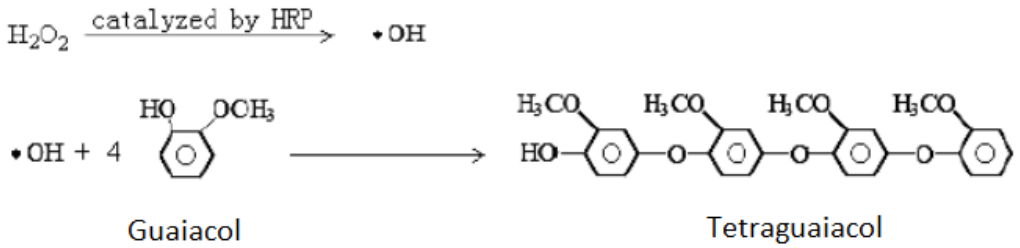


Figura 3. Esquema representativo da reação do guaiacol em presença de HRP (lado direito) e sua posterior condensação a tetraguaiacol (lado esquerdo).

Fonte: OUYANG; HUANG; JIANG, 2011.

As membranas de quitosana e quitosana/AuNP contendo a HRP foram imersas em béqueres com 3 mL de solução de peroxido de hidrogênio 3% (v/v), em seguida foram adicionadas 3 mL de guaiacol 0,5% (as soluções de peroxido de hidrogênio e guaiacol foram preparadas em uma solução de PBS 0,1M e pH 6,5). A HRP presente na membrana catalisará a reação de condensação do guaiacol em presença de H_2O_2 produzindo tetraguaiacol e mudando a cor da solução original de transparente a amarela, indicando a atividade da HRP.

5.7. CARATERIZAÇÃO DOS COLOIDES E DAS MEMBRANAS

5.7.1. CARATERIZAÇÃO DAS AuNP

As AuNP obtidas, primeiramente, foram caraterizadas através de espectroscopia de ultravioleta (UV-Vis) empregando um espectrofotômetro Beckman Coulter DU 800, dessa forma, os coloides foram diluídos em água destilada numa relação 1:10 (coloide:solvente) e logo foram medidos para uma faixa de comprimento de onda entre 200 e 800 nm. Como branco empregou-se água destilada. Cada determinação foi feita por triplicata.

Para a determinação do tamanho de partícula, empregou-se um analizador de potencial zeta com espalhamento de luz quase-elástico ZetaPlus-Zeta. Nesta, os coloides não foram diluídos, sendo determinado seu tamanho de partícula por triplicata.

Os valores de potencial zeta foram obtidos no mesmo aparelho, contudo, para esta determinação os coloides foram diluídos em água destilada previamente equilibrada ao mesmo pH do coloide (usando ácido clorídrico 1 M). A diluição foi feita em uma relação 1:10 (coloide:solvente).

Para a determinação do tamanho e forma das nanopartículas de ouro, foi usado um microscópio eletrônico de transmissão com alta resolução HR-TEM, Philips CM200 a 200 kV, no Instituto de Química da Unesp – Araraquara. As nanopartículas de ouro foram dispersas em álcool e em seguida gotejadas numa grelha de cobre recoberta com carbono, o coloide foi seco sob condições ambientais até obter uma membrana delgada que foi analisada.

5.7.2 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP

Inicialmente as membranas obtidas foram caraterizadas morfologicamente através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando o equipamento disponível na FZEA/USP (TM-3000, HITACHI) assim como o disponibilizado no Instituto de Química da Unesp – Araraquara (Jeol ISM 7500F). As amostras foram depositadas sobre uma fita de carbono e analisadas diretamente no MEV.

As medidas elétricas (curvas corrente-tensão) inicialmente foram feitas empregando um KEITHLEY 8009 *Resistivity Text Fixture* (U.S.A.) acoplado a um KEITHLEY 6517B *Electrometer/High resistance meter* (U.S.A.). Os eletrodos com diâmetro de 5 cm foram limpos com álcool isopropílico antes de começar o experimento. Também foi usado um conjunto de eletrodos com diâmetro de 2 cm, que foram acoplados diretamente ao KEITHLEY 6517B *Electrometer/High resistance meter*. As medidas elétricas foram feitas da seguinte forma:

Ensaios preliminares: As membranas de quitosana e quitosana/AuNP de 9 cm de diâmetro foram reduzidas até um diâmetro igual ao dos eletrodos (5 cm), em seguida as membranas foram limpas com álcool ao 70% e colocadas entre os eletrodos. Todas as medidas foram feitas a temperatura ambiente. Primeiramente foi aplicada uma tensão de 0 V por um minuto e em seguida uma rampa de tensão entre 0 e 15 V, finalmente uma rampa inversa de tensão foi aplicada, indo desde 15 até 0 V.

Ensaios específicos: os eletrodos de 2 cm de diâmetro foram empregados para avaliar todos os tipos de membranas produzidas: membrana de quitosana, quitosana/HRP, quitosana/AuNP e quitosana/AuNP/HRP. Para este ensaio as membranas foram cortadas, diminuindo o tamanho destas até 2 cm de diâmetro. As

medidas foram, também, feitas a temperatura ambiente, aplicando uma tensão de 0 V por um minuto, em seguida foi aplicada uma rampa de tensão entre 0 e 6 V e vice-versa.

5.7.3 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP E SUA RESPOSTA ELÉTRICA ÁS DIFERENTES CONCENTRACOES DE PEROXIDO DE HIDROGENIO

A reposta elétrica das membranas contendo HRP foi avaliada ao contato com soluções de peroxido de hidrogênio em diferentes concentrações usando eletrodos de 2 cm de diâmetro. O acoplamento destes eletrodos permite que uma superfície da membrana fique em contato com o meio como se apresenta na Figura 15-a. Desta forma, foi usada uma célula plástica a qual foi acoplada aos eletrodos como se apresenta na Figura 15-b. Dentro da célula plástica foram adicionados 5 mL da PBS (0,1M e pH = 6,8), em seguida foi acrescentado o peróxido de hidrogênio 3% (v/v), sendo avaliadas concentrações de H_2O_2 entre 0 e 35 mM na solução de PBS. A cada adição do H_2O_2 na solução de PBS, foi feita uma curva I-V entre 0 e 5 V.

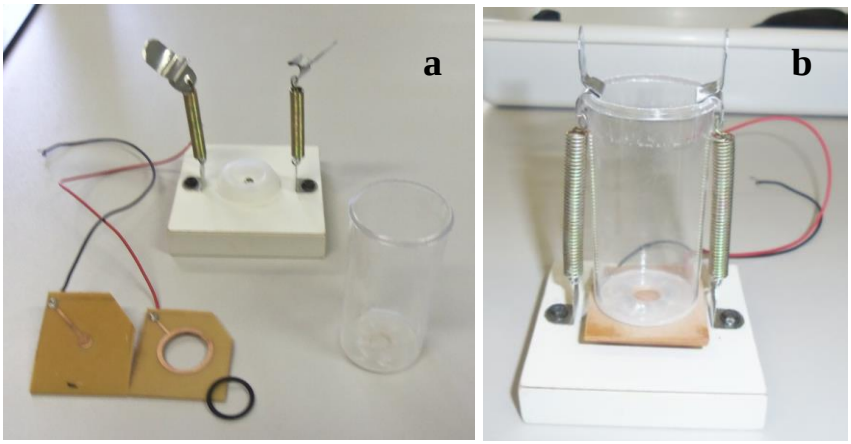


Figura 15. Fotografia do sistema empregado para o análise do biossensor.

5.7.4 CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSNA, QUITOSANA/HRP, QUITOSNA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA

As medidas de impedância foram feitas em um LCR meter (Wayne Kerr 6420, New Boston, USA) controlado computacionalmente para uma faixa de frequências entre 20Hz até 3MHz com sinal de excitação de 100mV. Foram usadas as membranas de quitosana, quitosana/HRP, quitosana/AuNP e quitosana/AuNP/HRP de 4,5 cm de diâmetro. O diâmetro destas membranas foi reduzido até 1 cm, em seguida foram presas em eletrodos de ouro de 1 cm de diâmetro.

As membranas de quitosana e quitosana/AuNP foram avaliadas em diferentes temperaturas, sendo as membranas contendo HRP analisadas somente a temperatura pois o aquecimento leva a desnaturação do HRP.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ESTUDO DE SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO A PARTIR DE DIFERENTES CARBOIDRATOS.

A viabilidade na utilização de monossacarídeos (glicose, frutose e galactose), dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose) e polissacarídeos (amido solúvel e quitosana) como agentes redutores para a biossínteses de nanopartículas de ouro foi avaliada. Previamente ao processo de síntese de nanopartículas, a coloração (visualmente) das soluções utilizadas foram:

- Solução de $HAuCl_4$: coloração amarela intensa.
- Soluções de mono- e dissacarídeos: sem coloração (transparente).
- Solução de amido: sem coloração (transparente).
- Solução de quitosana: coloração amarela escura.

Quando foram misturadas as soluções de carboidratos com o cloreto de ouro, a cor final das soluções a temperatura ambiente foi amarela (devido ao sal de ouro), indicando que nestas condições, não há síntese de nanopartículas. Em seguida, todas as soluções foram aquecidas em banho Maria a 90°C por 3h, tempo no qual a cor amarela das soluções mudou para transparente e vermelha para os seguintes sistemas:

- Soluções de monossacarídeos/$HAuCl_4$, dissacarídeos/$HAuCl_4$ e amido//$HAuCl_4$: sem coloração (transparente).
- Solução de quitosana/$HAuCl_4$: coloração vermelha.

As soluções contendo monossacarídeos, dissacarídeos e amido como agente redutor, passaram de ter uma coloração amarela (devida ao sal de ouro) a ser totalmente transparentes, o qual é um indicativo da ausência de nanopartículas de ouro, em estas mesmas soluções, foi observada a presença de precipitados no fundo dos tubos de ensaio, o qual indicou que o Au proveniente do sal foi reduzido, mas não foi estabilizado, precipitando durante o processo. Em contraste, as soluções contendo quitosana desenvolveram uma cor vermelha a qual é característica em coloides que contem nanopartículas de ouro (AYALA et al., 2012; WEI; QUIAN, 2008). A coloração final das soluções após o aquecimento é apresentado na Figura 16.

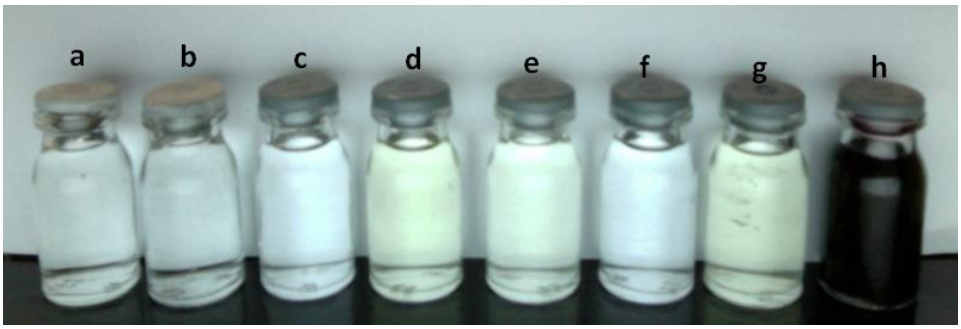


Figura 16. Coloração final das soluções de cloreto de ouro com glicose (a), frutose (b), galactose (c), sacarose (d), maltose (e), lactose (f), amido (g), e quitosana (h), esta última apresentando a coloração típica de um coloide com AuNP.

Como se apresenta na Figura 17, os espectros ultravioletas confirmaram o observado visualmente nos coloides, é dizer, as nanopartículas de ouro unicamente foram sintetizadas em presença de quitosana como agente redutor, onde se observou uma RPS com absorbância máxima em 520nm (λ_{max}), característico das AuNP (WEI; QUIAN, 2008).

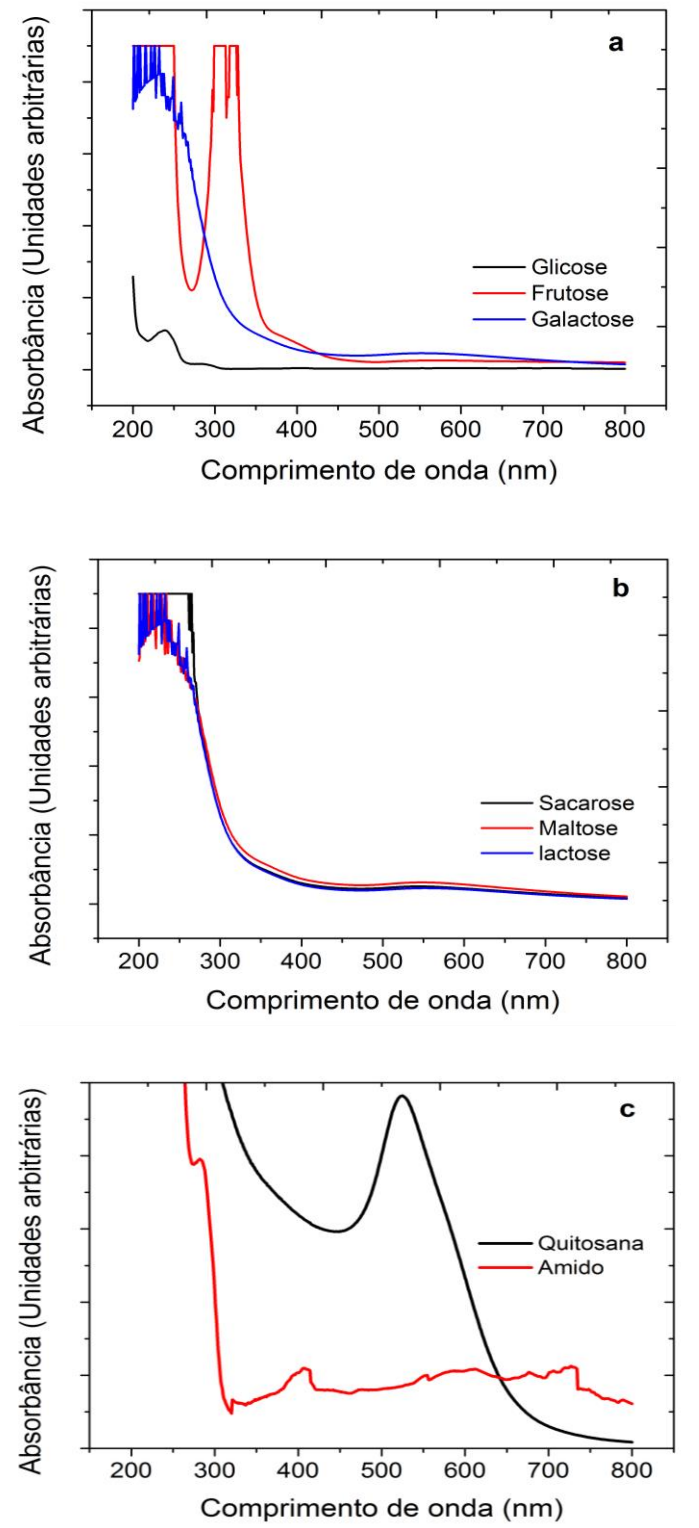


Figura 17. Espectros UV-Vis resultados do aquecimento do sal ($HAuCl_4$) usando como agentes redutores monossacarídeos (a), dissacarídeos (b) e polissacarídeos (c) a 90°C por 3h.

A partir de estes resultados, se formulou a hipótese uma hipótese sobre a possível influência do pH da solução sobre a síntese das nanopartículas de ouro dependendo da natureza do agente reduto. O pH de todas as soluções foram medidas, sendo:

- pH do sal de ouro: 2,1 ± 0,2.
- pH das soluções de monossacarídeos, dissacarídeos e amido: 3,9 ± 0,1.
- pH da solução de quitosana: 3,2 ± 0,1.

O pH final produto da mistura do sal com os carboidratos foi:

- pH da solução sal-monossacarídeos: 3,2 ± 0,1.
- pH da solução sal-dissacarídeos: 3,3 ± 0,2.
- pH da solução sal-amido: 3,3 ± 0,1.
- pH da solução sal-quitosana: 2,4 ± 0,1.

No caso da quitosana, esta é um biopolímero que se solubiliza em condições acidas, onde seu grupo $–NH_2$ se protona passando a ser $–NH_3^+$. Segundo Jin-Lan; Chun; Zhen-Yuan, (2005) e Jing An, et al. (2011), a presença do grupo amino protonado permite a estabilização das nanopartículas metálicas. Em contrate, monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos como amido não apresentam grupos amino na sua estrutura, sendo solúveis em água (pH neutro). A ausência de síntese de nanopartículas metálicas empregando monossacarídeo, dissacarídeos e amido é similar ao reportado nos trabalhos de Engelbretk et al. (2009) e Katti et al. (2009), que concluíram que a síntese de AuNP não acontece ou acontece pouco quando o pH é acido (pH ≤ 5).

Baseado no reportado na literatura, o seguinte passo foi avaliar o efeito do pH na sínteses de AuNP usando monossacarídeos, dissacarídeos e amido. Dessa forma o pH final da soluções (carboidrato/$HAuCl_4$) foi ajustado a 3, 5, 7 e 9 usando hidróxido de sódio 0,1M e HCl 1M. Os melhores resultados foram obtidos ao usar glicose, sacarose e amido como agentes redutores (Figura 18).

Quando foi usado sacarose e frutose na faixa de pH entre 5 e 7, se observou nos espectros UV-Vis um pico bem definido entre 512 e 519nm, que indicou a presencia de AuNP nos colides. A adição do NaOH faz com que este composto se dissocie nos seus íons Na^+ e OH^- os quais contribuem à oxidação do grupo aldeído da glicose (-CHO) a grupo carboxila (-COOH), esta oxidação gera a liberação de elétrons que logo servem na redução do ouro Au^{3+} a nanopartícula de ouro (Au^0). O processo é descrito a continuação em quatro etapas.

Etapa 1. Dissociação do cloreto de ouro na água.

$$2HAuCl_4 \xrightarrow{H_2O} 2AuCl_3 + 2HCl.$$

Etapa 2. De forma paralela o NaOH se dissocia na água:

$$6NaOH \xrightarrow{H_2O} 6Na^+ + 6OH^-$$

Etapa 3. Os íons OH^- produzidos da dissociação do NaOH podem oxidar os carboidratos passando do grupo aldeído a carboxila:

$$3CH_2OH(CHOH)_4CHO + 6OH^-$$
$$\downarrow$$
$$3CH_2OH(CHOH)_4COOH + 3H_2O + 6e^-.$$

Etapa 4. Os íons Na^+ produzidos da dissociação do NaOH, junto aos elétrons na etapa anterior servem para reduzir o Au^{3+} do $AuCl_3$ a Au^0 (nanopartícula de ouro), assim:

$$2AuCl_3 + 6Na^+ + 6e^- \rightarrow 2Au^0 + 6NaCl.$$

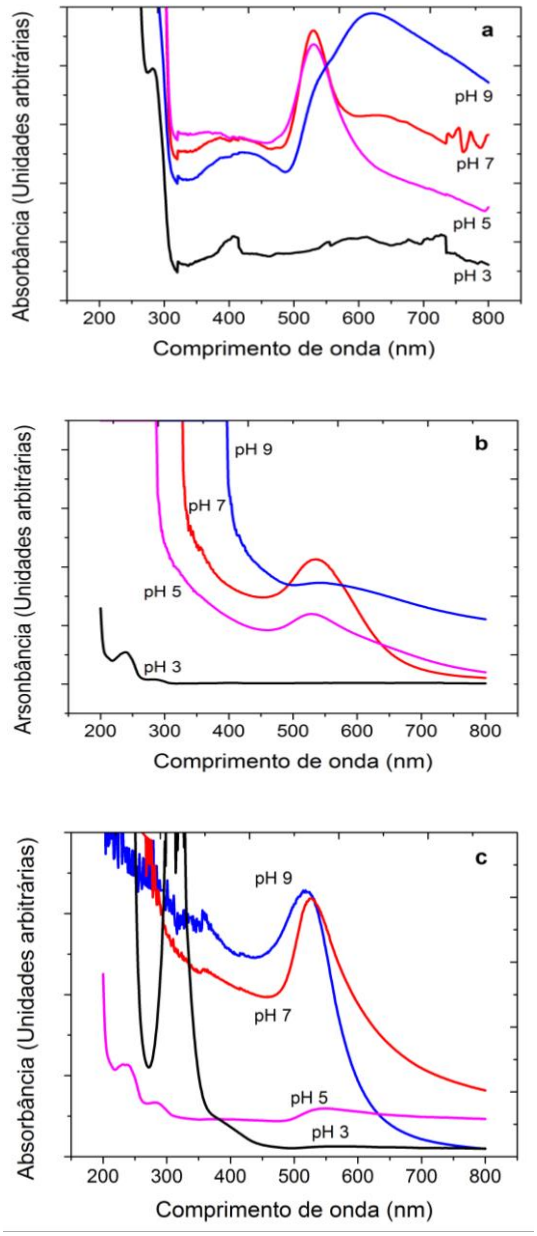


Figura 18. Efeito do pH na síntese de AuNP usando glicose (a), sacarose (b) e amido (c) como agentes redutores. A síntese foi desenvolvida a 90°C por 3h.

Quando as soluções foram expostas em meios com pH 3 a síntese de AuNP não foi percebida pela pouca presença de íons no meio. Contudo, quando as amostras foram submetidas a um pH de 9, tampouco foi observada a síntese de AuNP. Segundo Shervani; Yamamoto (2011[b]), quando a glicose é exposta a um excesso de NaOH na solução, o grupo carboxila da glicose é oxidado até hexanol, conhecido também como D-glucitol ($CH_2OH(CHOH)_4CH_2OH$) que é um composto que não permite a estabilização das nanopartículas metálicas.

As soluções de $HAuCl_4$ contendo monossacarídeos como frutose e galactose não apresentaram síntese de AuNP a nenhuma faixa do pH avaliado, isto é devido ao menor poder redutor destes açúcares em comparação com a glicose. De forma similar as soluções de $HAuCl_4$ contendo dissacarídeos como maltose e lactose não apresentaram síntese de AuNP, contudo, a solução de $HAuCl_4$ com sacarose apresentou formação de nanopartículas na mesma faixa do pH reportado para a glicose como agente redutor. Este comportamento se deve à dissociação da sacarose nos seus componentes (glicose e frutose), onde esta ligação é facilmente desestabilizada pela temperatura, levando a que a glicose participe na síntese das AuNP (PANIGRAHI et al., 2005).

Quando o amido foi usado como agente redutor, se observou a presença de picos nos espectros UV-Vis em uma faixa de pH entre 5 e 9. O incremento do pH gerou um deslocamento do pico no UV-Vis, assim, quando as AuNP foram sintetizadas a pH 5, estas apresentaram um espectro com absorbância máxima (λ_{max}) em 540 nm, a qual se deslocou para 530 e 520 nm quando o meio foi estabilizado a pH 7 e 9, respetivamente.

Em todos os espectro UV-Vis, um incremento da intensidade da RPS esta associado com um incremento da concentração de AuNP sintetizadas, também uma diminuição do λ_{max} é atribuído a AuNP com menor tamanho (JIANG, P. et al., 2006).

A partir dos resultados obtidos, se escolheu o melhor reagente para fazer a síntese de AuNP, para isso se teve presente a facilidade no processo de síntese, assim como as características do pico (λ_{max} e largura do pico).

O uso da quitosana como agente redutor mostrou-se como a melhor opção entre todos os agentes redutores, isto porque na sua produção, só basta com dissolver a quitosana em uma solução levemente ácida (1% ácido acético). No caso dos monossacarídeos, dissacarídeos e o amido, estes precisam logo ser estabilizados em um pH básico, fazendo que este processo seja mais elaborado. Os picos UV-Vis das AuNP sintetizadas com quitosana apresentaram um λ_{max} menor em comparação com os outros carboidratos o qual significa que estas nanopartículas apresentam tamanhos menores. Além disso, a intensidade dos picos foi maior em comparação com as dos outros coloides, o que indicou uma maior síntese das AuNP.

6.2. ESTUDO DE PARAMENTOS DA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM QUITOSANA

Como foi dito na seção 6,1; o uso da quitosana como agente redutor foi o que permitiu a melhor síntese de nanopartículas de ouro. Nesta etapa trabalhou-se com duas concentrações do sal de ouro (8 e 11 mM) mantendo fixa a concentração de quitosana em solução (6,92 mg/mL). Assim primeiramente foi avaliado para um período de 3h o efeito de diferentes temperaturas de aquecimento (40, 60, 80 e 90°C). Posteriormente se escolheu a melhor temperatura para a síntese e se fez um estudo do tempo de aquecimento sob a síntese das AuNP. De acordo com as Figuras 19-a e 19-b, a síntese de AuNP incrementou em função da temperatura de aquecimento.

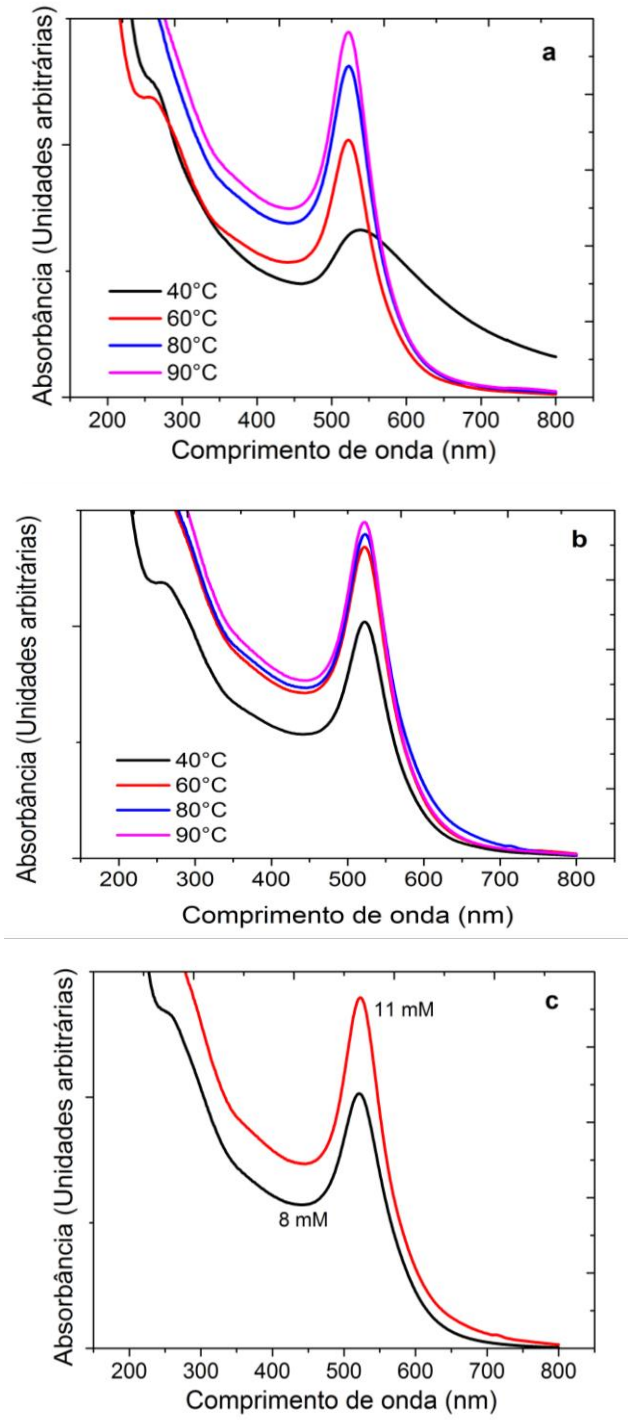


Figura 19. Espectros UV-Vis da síntese de AuNP obtidas a diferentes temperaturas de aquecimento por 3h, usando uma concentração de cloreto de ouro de 8mM (a) e 11mM (b). Comparação dos espectros UV-Vis obtidos a 90°C por 3h para as duas concentrações do sal (c).

Como dito previamente, um aumento da intensidade do pico esta associada com uma maior síntese de AuNP (AYALA et al., 2012; JIANG, P. et al., 2006). Similar comportamento é percebido com o aumento na concentração do sal, onde a intensidade também aumentou devido a uma maior concentração do $HAuCl_4$ na solução (Fig 19-c). Amostras contendo sal de ouro a uma concentração de 8 mM e aquecidas a 40°C por 3 h apresentaram uma RPS com λ_{max} em 541 nm, a qual foi deslocada com o aumento da temperatura, com picos em 520 nm quando as amostras foram aquecidas a 60, 80 e 90°C.

Para as duas concentrações do sal, se observou que a RPS apresentou um valor de λ_{max} quase independente do tempo de processo, com exceção da amostra contendo sal do ouro a uma concentração de 8 mM e aquecida a 40°C. Finalmente, se percebeu que o valor de λ_{max} nos espectros UV-Vis não mudou com a concentração do sal em estudo (Figura 19-c).

A síntese de AuNP foi melhor para uma temperatura de 90°C, assim esta temperatura foi fixada para avaliar o efeito do tempo na síntese das AuNP. As amostras de quitosana contendo as duas diferentes concentrações do sal de ouro (8 e 11mM) foram avaliadas por 3 horas. Cada 30 minutos uma amostra foi retirada, esfriada e analisada via UV-Vis. o mesmo processo foi feito até atingir as 3 horas. Como se apresenta na Figura 20, a síntese das AuNP aumentou durante os primeiros 60 minutos, após deste tempo, os valores de absorbância permaneceram quase constantes até as 3 horas de aquecimento, o que indicou que a síntese da AuNP acontece nos primeiros 60 minutos e depois se estabiliza. As amostras aquecidas por mais de 3 horas apresentaram valores de absorbância menores, o qual poderia indicar uma possível aglomeração das AuNP (BANKAR et al., 2010[b]; DUBEY; LAHTINEN; SILLANPÄÄ, 2010[a]).

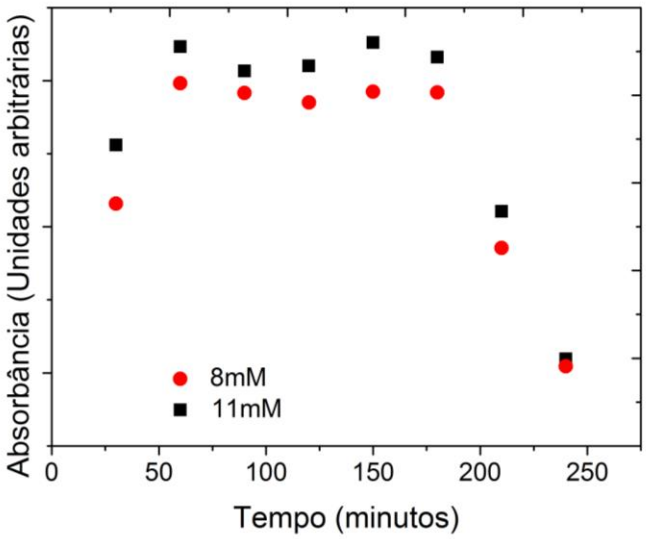


Figura 20. Efeito do tempo de aquecimento sob a síntese de AuNP.

Com o objetivo de ter uma boa referência na síntese das AuNP, se escolheu como o protocolo padrão para a síntese de AuNP, o tempo de aquecimento de 3 h (a 90°C) reportado por Wei; Quian (2008). Estes nanomateriais posteriormente foram caracterizadas por espalhamento de luz quase-elástico e da carga superficial (potencial zeta).

A Figura 21 apresenta o tamanho de partícula obtido para as AuNP sintetizadas a 8 e 11 mM com quitosana a 90°C por 3 h. Este método de produção das nanopartículas de ouro gerou uma população uni-modal com tamanhos entre 20 e 50 nm, sendo o tamanho de partícula independente da concentração inicial do sal. Estes resultados são parecidos ao reportado por Wei; Quian (2008) e Bhumkar et al. (2007), que empregaram quitosana na produção de AuNP em condições similares, reportando tamanhos de partícula entre 10 e 50 nm.

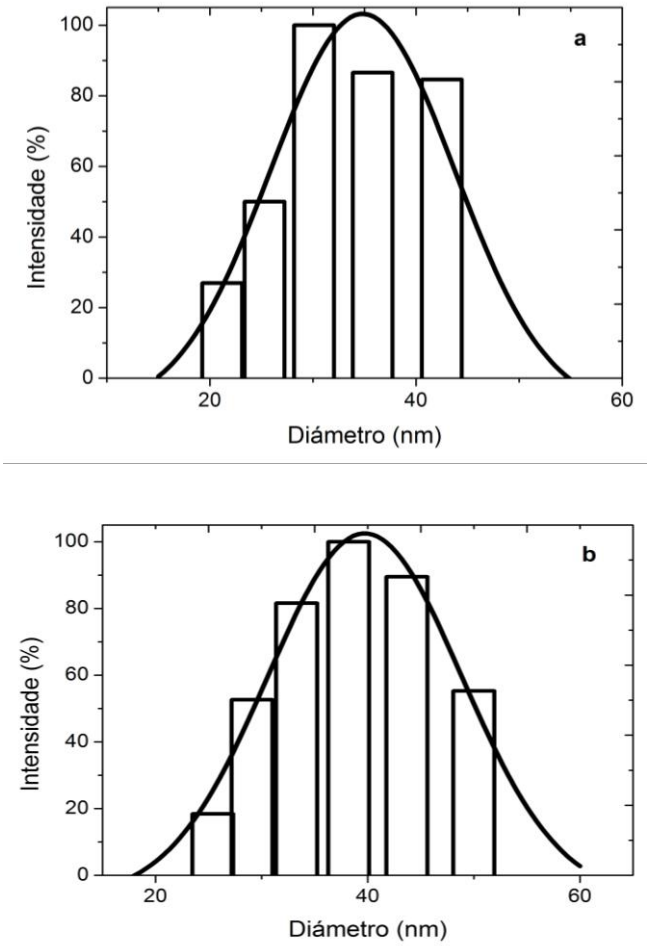


Figura 21. Distribuição de tamanho de partículas obtidos na síntese de AuNP ao usar quitosana e cloreto de ouro a 8mM (a) e 11mM (b).

Os resultados de tamanhos de partícula foram comparados com os tamanhos de partícula teóricos calculados a través da equação proposta por Khlebtsov; Dykman (2010), que permite obter uma estimativa do diâmetro das nanopartículas de ouro usando o valor de absorbância máxima λ_{max} obtido por espectroscopia UV-Vis:

$$d = 3 + 7.5E - 5x^4, x \prec 23$$
$$d = \frac{\sqrt{x-17} - 1}{0,06}, x \geq 23. \quad (27)$$

Onde x é a diferença entre o valor máximo do pico observado nos espectros UV menos um valor constante de 500 assim: $x = \lambda_{máx} - 500$.

Os espectros UV-Vis reportados na Figura 19-c apresentaram valores de $\lambda_{máx}$ de 522 e 519 nm para as duas concentrações de nanopartículas (8 e 11mM). Estes valores de $\lambda_{máx}$ foram usadas na determinação do diâmetro teórico, sendo de 20,57 e 12,77 nm para os dois coloides em estudo. Estas estimativas do diâmetro estão dentro da faixa de tamanhos de partícula reportadas nas Figuras 21-a e 21-b. Contudo, estes valores teóricos estão no limite desta faixa de valores, o que poderia indicar que os resultados de tamanho de partícula podem não ser representativos, indicando uma possível interferência das cadeias poliméricas da quitosana na medição.

Os valores de carga superficial obtidos por potencial Z foram similares para os dois colides contendo AuNP a 8 e 11mM, sendo de +54,01 ± 4,79 e +54,65 ± 3,15 mV respectivamente. Estes resultados são similares aos reportados por Bhumkar et al. (2007), quem empregou quitosana na produção de AuNP em condições quase similares, e são maiores a outros sistemas contendo AuNP (DUBEY et al., 2010[a]; 2010[b]). De acordo com a literatura, estes coloides contendo AuNP apresentam alta estabilidade ao possuir valores de potencial Z maior a 30 mV (em modulo), onde a carga superficial evita a desestabilização dos colides por coalescência e aglomeração das AuNP (HUANG; YUAN; YANG, 2005; ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL, 2004).

6.3. ROTEIROS ALTERNATIVOS NA SINTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO

Outros roteiros alternativos para a síntese de AuNP foram explorados usando extratos de cascas de abacaxi (*Ananas comosus*), banana (*Musa sp.*), maracujá (*Passiflora edulis*), tangerina (*Citrus reticulata*) e folhas de hortelã (*Mentha piperita*). Igual ao que aconteceu com o uso de glicose, sacarose e amido, os extratos de cascas de frutas reduziram o sal de ouro quando o meio foi mantido com pH básico (maior a 5). A Figura 22 apresenta os espectros UV-Vis usando os diferentes extratos como agentes redutores e estabilizados a pH 7. Segundo Gondim et al. (2005), as cascas das frutas são materiais ricos em mono- e dissacarídeos; assim, estes compostos em presença do NaOH podem server como reagentes para a síntese das nanopartículas. A presença de outros compostos típicos das frutas presentes nas cascas, tais como pectinas, proteínas e fibras, assim como o tipo e quantidade de carboidrato podem alterar o mecanismo de síntese, o que explicaria as diferenças nos espectros obtidos por UV-Vis.

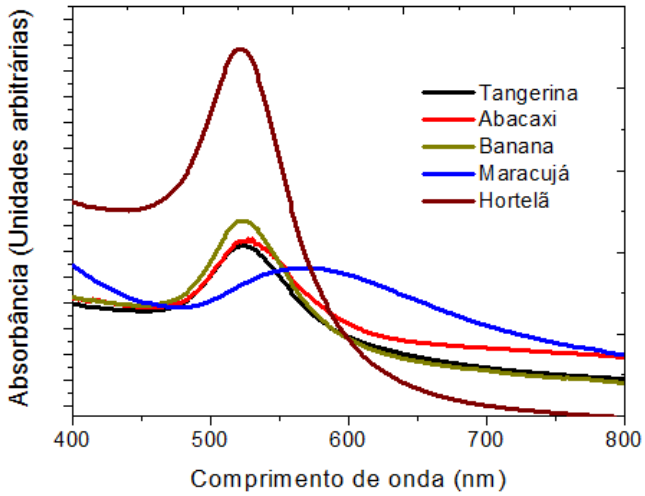


Figura 22. Espectros UV-Vis das AuNP sintetizadas com extratos de cascas de frutas e folhas de hortelã e aquecidas a 90°C por 10 min.

Na Figura 22, se pode observar que o espectro que teve maior intensidade foi o das amostras que empregaram extrato de folhas de hortelã na sua formulação. A diferença dos extratos de cascas de frutas, o extrato de folhas de hortelã não precisou da adição de NaOH para a síntese de AuNP. Mubarakali et al. (2011), previamente reportou a viabilidade do extrato de hortelã na síntese de AuNP. O método que se reporta no trabalho realizado envolve um processo de sínteses de AuNP em tempo menor ao reportado por Mubarakali et al (2011), quem obteve estes nanomateriais após de 24h com uma temperatura de aquecimento de 28°C, enquanto que os resultados aqui apresentados foram obtidos com processos de alguns poucos minutos de duração (aproximadamente 10 minutos). Além disso, observou-se uma mudança na coloração das soluções imediatamente após a mistura de reagentes, o que sugere uma síntese parcial quase instantânea.

As AuNP sintetizadas com extrato de hortelã foram examinadas via MET, estas fotografias (Figura 23) revelaram a presença de AuNP com formatos esféricos e triangulares e com tamanhos entre 10 e 50 nm, sendo menores aos informados por Mubarakali et al (2011) quem reportou AuNP com tamanho médio de 150nm.

A eq. (27), foi usada para comparar a estimativa de tamanho de partículas, com o tamanho das AuNP observado por MET, estes coloides apresentaram espectros UV-Vis com $\lambda_{máx}$ aos 525 nm, assim pela eq. (27), a estimativa de tamanho de partícula é de 30,47 nm, tamanho que esta dentro das dimensões observadas nas fotografias da Figura 23.

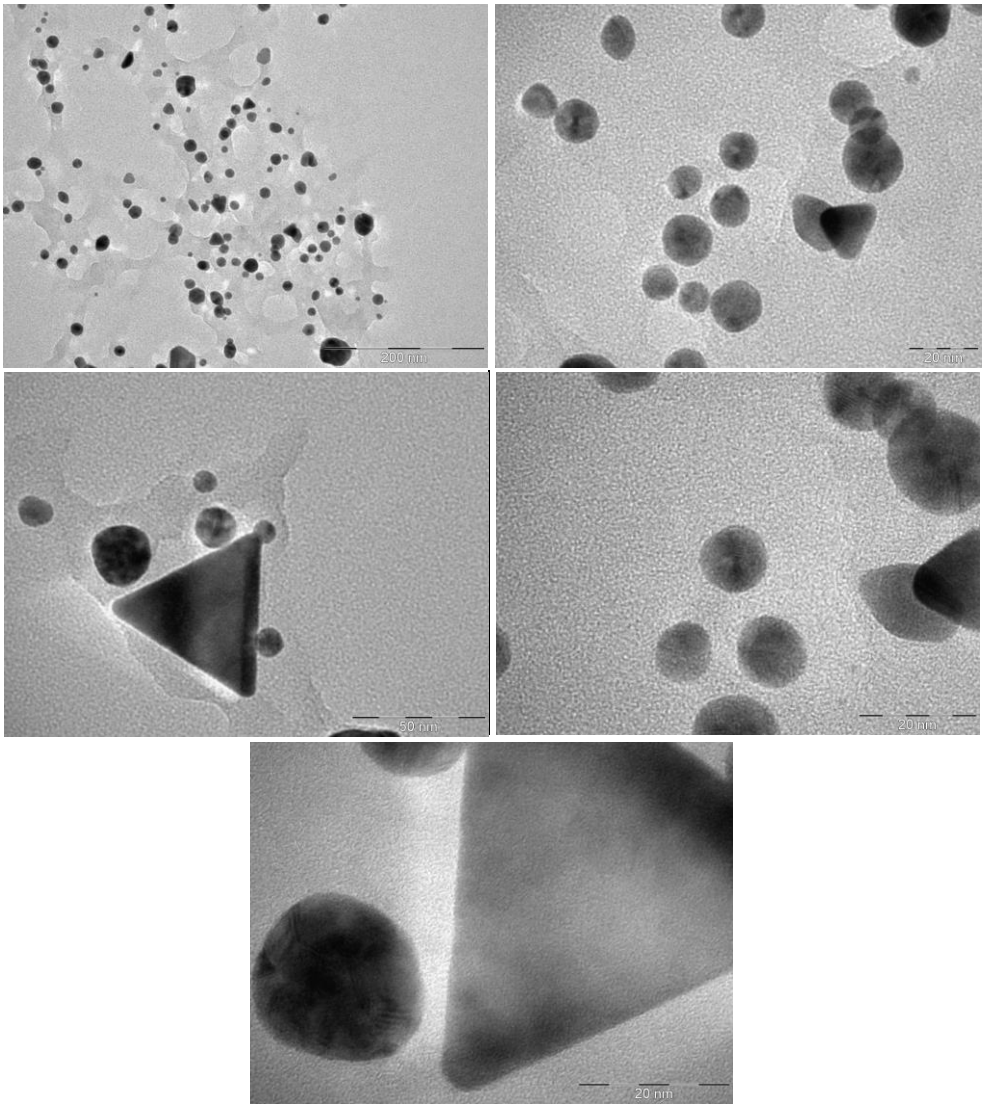


Figura 23. Microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas de ouro sintetizadas com extrato de hortelã.

A síntese de nanopartículas usando cascas e extratos de hortelã foram viáveis> Contudo, estas vias de síntese alternativa foram descartadas no presente estudo, já que sendo possível a síntese de AuNP usando quitosana esta oferece duas vantagens em comparação com os outros compostos estudados, estas são:

- A possibilidade de sintetizar as AuNP em solução de quitosana, sendo esta mesma solução empregada na produção das membranas em futuras pesquisas. Em contrastes, os outros reagentes após da síntese das AuNP

precisam ser dispersados sobre uma matriz polimérica que permita gerar as membranas.

- Sendo a quitosana usada na síntese de AuNP e posteriormente na produção das membranas, se evita a inclusão de impurezas produtos de outros reagentes (caso for usado açúcares, amido ou estratos de cascas de frutas ou folhas de hortelã). O qual minimiza as possíveis interferências quando as propriedades elétricas das membranas sejam avaliadas.

6.4. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP

6.4.1. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP

As membranas obtidas de quitosana e quitosana/AuNP a 8 e 11mM são apresentadas na Figura 24. Como se pode observar, as membranas de quitosana sem AuNP apresentam uma coloração amarela escuro que é dada pelo biopolímero (Figura 24-a). Com a adição das AuNP a coloração final da membrana muda a vermelho com intensidade dependente da concentração das AuNP. Assim para uma concentração de 8mM de AuNP, as membranas apresentaram uma coloração mais clara em comparação com a membrana contendo AuNP a 11mM (Figura 24-b e 24-c). A adição da enzima não alterou a cor nas membranas.

A espessura das membranas foi medida usando um micrometro. As membranas produzidas em placas plásticas de 9,0 e 4,5 cm de diâmetro apresentaram similar espessura, sendo de 2,1 ± 0,1 µm.

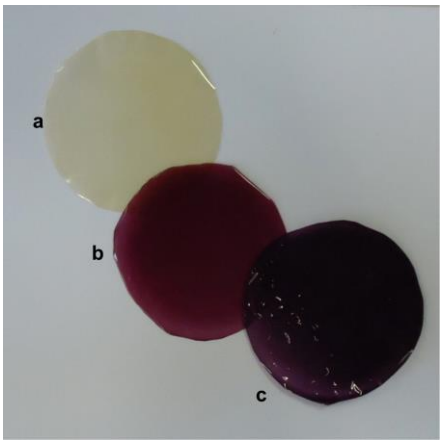


Figura 24. Fotografia das membranas com diferentes concentrações de AuNP, Membrana de quitosana (a), membrana de quitosana/AuNP a 8mM (b) e membrana de quitosana/AuNP a 11mM (c).

As membranas foram caraterizadas morfologicamente através de MEV (TM-3000, HITACHI). Pode-se observar que a membrana de quitosana sem AuNP apresentou uma superfície lisa, esta superfície não foi modificada ao adicionar uma concentração de AuNP de 8mM (Figura 25-a e 25-b), mas, quando a concentração de AuNP aumentou a 11mM (Figura 25-c), as membranas apresentaram uma aparência rugosa que foi devida à presença das AuNP na membrana. As analise de espectrofotometria de dispersão de energia (EDS) foram feitas no mesmo equipamento e confirmaram a presença de ouro nas membranas que aumentou com a concentração de nanopartículas.

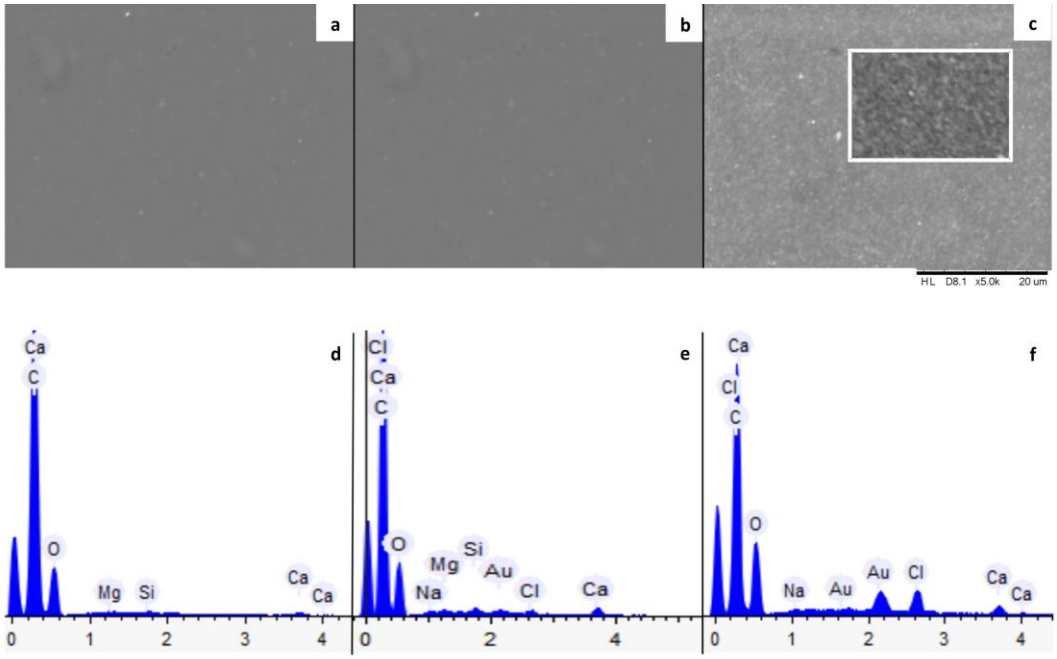


Figura 25. Microscopia eletrônica de varredura das membranas de quitosana (a), quitosana/AuNP a 8mM (b) e quitosana/AuNP a 11mM (c). Espectrofotometria de dispersão de energia da membrana de quitosana (da), quitosana/AuNP a 8mM (e) e quitosana/AuNP a 11mM (f).

A microscopia eletrônica de varredura com espalhamento elástico, imagens apresentadas na Figura 26, mostram que a membrana de quitosana sem AuNP apresentou novamente uma superfície lisa (Figura 26-a); nenhuma região com maior eletronegatividade foi observada, o qual é coerente, pois o único componente da membrana é a quitosana. Em contrate, a membrana de quitosana/AuNP com 11mM apresentou na sua superfície e na sua seção transversal (Figura 26-b e 26-c) pontos claros associados às AuNP, que possuem maior eletronegatividade em relação com a quitosana e que oferecem um maior contraste na amostra devido à concentração de elétrons nas AuNP. Estas duas últimas imagens de superfície e da seção transversal da

membrana com AuNP permitem observar uma distribuição homogênea das nanopartículas no volume da matriz polimérica.

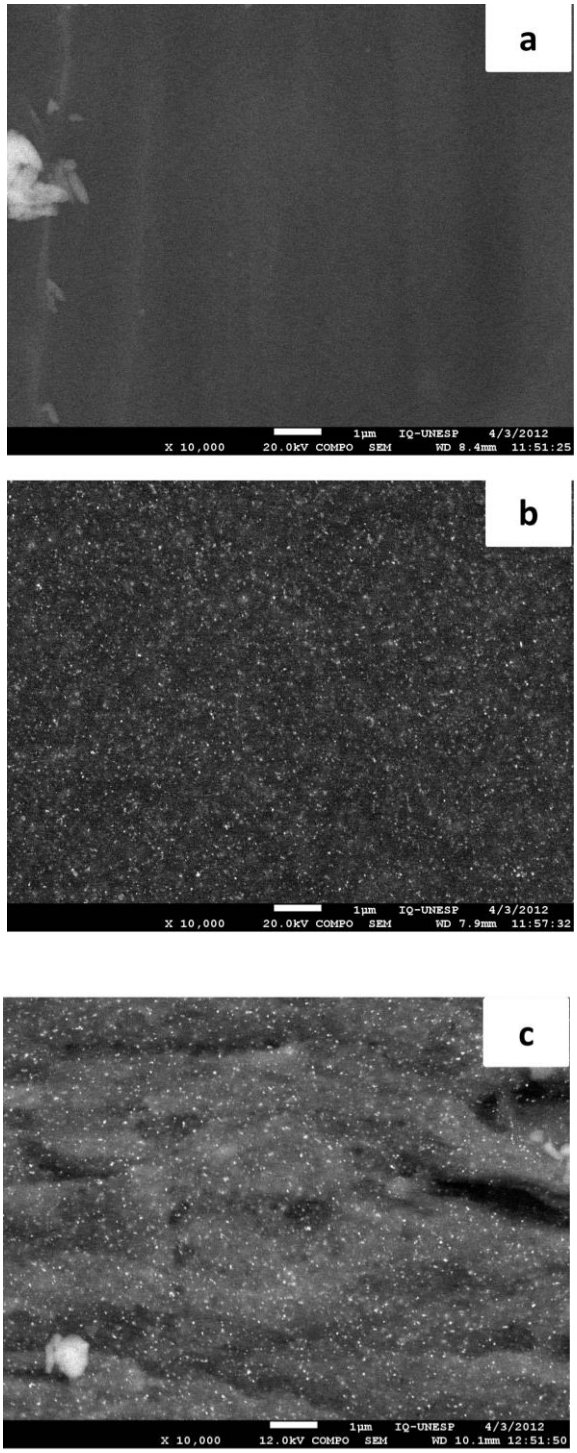


Figura 26. Analise de espalhamento elástico da luz feito na superfície da membrana de quitosana (a), na superfície da membrana de quitosana/AuNP a 11mM (b) e na sua seção transversal (c).

Quando um material não é totalmente homogêneo, o mesmo possui diferentes regiões causadas por aglomeração de plastificante, das nanopartículas inclusas ou da matriz polimérica. Portanto, neste tipo de materiais as propriedades elétricas, mecânicas, de permeabilidade, etc, não são homogêneas no mesmo (GRIMVALL; ANDERSSON, 1985).

6.4.2. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP

As curvas corrente-tensão entre 0 e 15 V foram obtidas nos eletrodos de 5 cm de diâmetro e são apresentadas na Figura 27-a onde é observado que a adição das AuNP modula a condutividade deste materiais, provocando uma maior condução com o aumento na concentração de AuNP. A Figura 27-b mostra as mesmas curvas I-V em escala doble logarítmica, e no caso da membrana de quitosana/AuNP 11 mM mostra-se na Figura 27-c os diferentes regimes esperados para o transporte e mostrados na Figura 14: SCLC com preenchimento parcial, TCLC e SCLC com preenchimento de armadilhas completo, As retas na figura são guias para identificar estes regimes. De acordo com isso, diferentes ajustes foram feitos nas curvas I-V, as quais foram analisadas a partir do gráfico log(I) vs. log(V), apresentado na Figura 27-b. Como foi exposto na eq. (24), o modelo SCLC prevê uma dependência quadrática da corrente em função da tensão, isto é: $j \alpha V^2$, que é similar ao comportamento que apresentou a membranas de quitosana sem AuNP onde $j \alpha V^{1,89}$. Com a inclusão das AuNP se observou que na região onde deve ocorrer o regime TCLC a corrente é fortemente dependente da concentração de AuNP (Figura 27-d). Para a amostra com 8mM a

corrente em função da tensão da exibiu a forma $j \alpha V^{2,43}$, que apesar de não ser estritamente um regime SCLC o expoente está próximo do valor esperado (*n*=2). Já quando a concentração das AuNP na membrana de quitosana foi de 11 mM, o comportamento elétrico da membrana mudo drasticamente ($j \alpha V^{3,63}$), sendo claramente descrito pelo modelo TCLC (eq. 26) onde a corrente aumentou em função da tensão da forma $j \alpha V^{l+1}$. Assim a membrana de quitosana/AuNP com 11mM apresentou um valor de *l*+1 = 3,63 que está na faixa reportada por Brütting; Berleb; Mückl, (2001), para materiais cujo comportamento elétrico esta descrito por este modelo (*l*+1 entre 3,4 e 4,4).

Ao analisar as curvas I-V nas duas rampas de tensão aplicadas (Figura 28-a), se percebeu que a membrana de quitosana sem AuNP apresentou uma condutividade similar para as tensões aplicadas entre 0 e 15 V e sua rampa inversa, contudo uma leve diferença na condutividade desta membrana quando aplicada as duas rampas de tensões indicou um comportamento biestável que poderia ser devido as impurezas ou defeitos de estrutura na mesma. O comportamento biestável foi modulado pela presença de AuNP nas membranas de quitosana, sendo maior quando a concentração de AuNP foi de 11mM. O comportamento biestável esta associado ao acumulo de elétrons nos poços de potencial devidos às AuNP. Este comportamento é mais evidente ao desenhar o gráfico de log(voltagem) vs. log(corrente) para as duas rampas de tensão, onde é percebido que, no caso da amostra com 11mM, a inclinação para uma voltagem entre 0 e 15V é diferente em comparação à da voltagem inversa (Figura 28-b). As diferentes inclinações no gráfico log-log da Figura 28-b, indicariam diferentes dinâmicas de preenchimento das armadilhas.

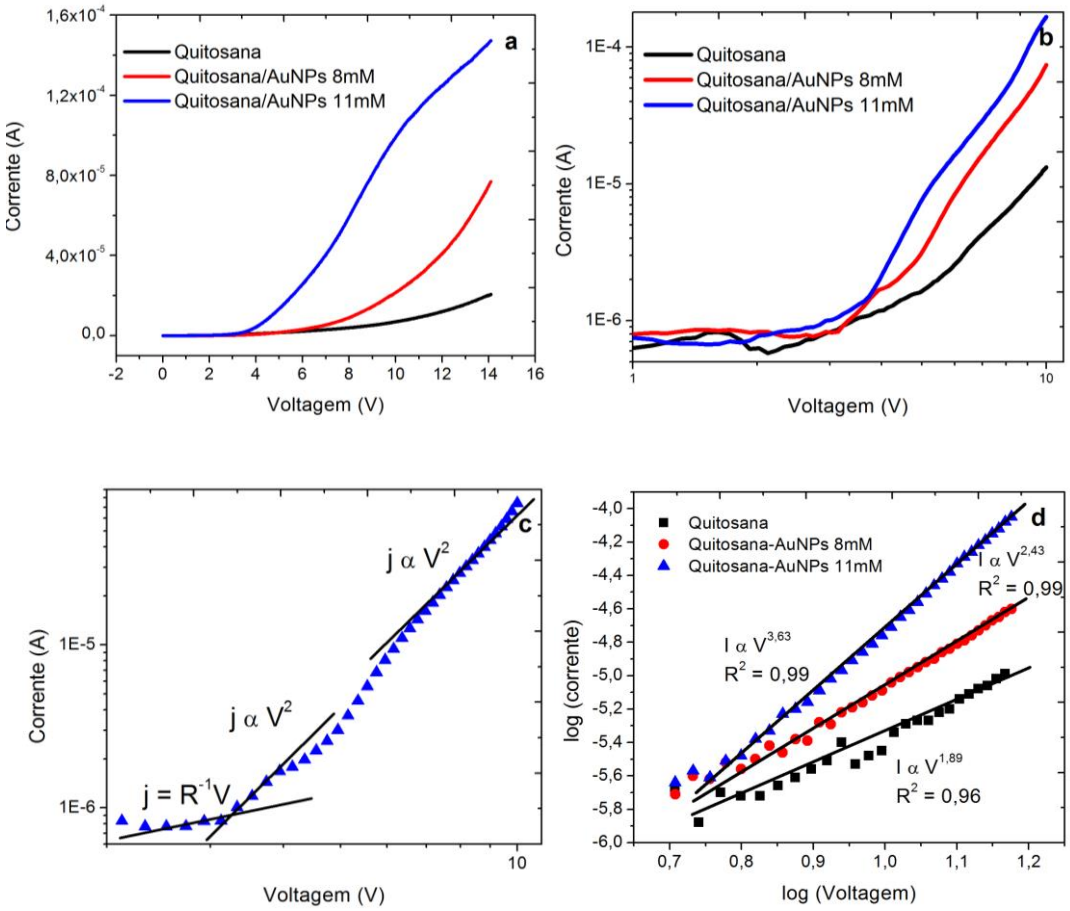


Figura 27. Curvas I-V nas membranas a diferentes concentrações de AuNP (a), log(voltagem) vs. log(corrente) das membranas com seus respetivos ajustes matemáticos (b). Corrente vs. Tensão em escala doble logarítmica das membranas feitas a diferentes concentrações de AuNP (c) e da membrana de quitosana/AuNP 11mM (d).

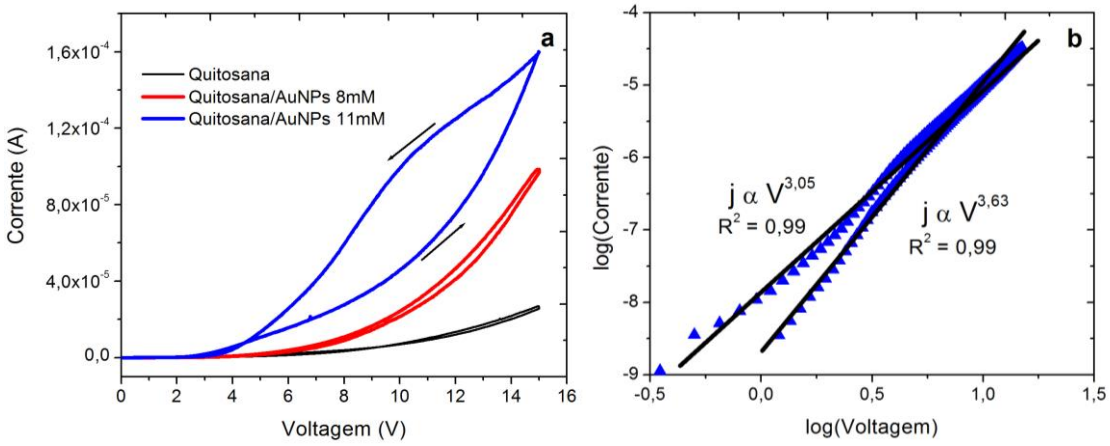


Figura 28. Curvas I-V das membranas avaliadas para duas rampas de tensões, entre 0 e 15V, em seguida entre 15 e 0V (a), log(voltagem) vs. log(corrente) para a membrana de quitosana/AuNP 11mM nas duas rampas de tensão aplicadas (b).

Uma possível explicação do comportamento biestável nas membranas com AuNP pode estar relacionado com o acúmulo de carga nos estados confinados nos poços de potencial das NPs, de maneira análoga a o que se observe em superredes e dispositivos de tunelamento ressonante (FEU et al., 2009). O acúmulo de carga nos poços de potencial modifica a distribuição de potencial vindo de uma situação de armadilhas que são carregadas durante a rampa ascendente ou vindo de uma situação de armadilhas descarregadas pela extração de carga a tensão alta, durante a rampa descendente (AHMAD et al., 2011). Este tipo de comportamento é conhecido para filmes orgânicos (LEE; DAI, 2010; OUYANG; YANG, 2010), mas observado por primeira vez no sistema quitosana/AuNP neste trabalho.

6.5. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP

6.5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NAS MEMBRANAS DE QUITOSANA E QUITOSANA/AuNP CONTENDO HRP

Como foi apresentado na seção 5.5, foram usadas quatro metodologias para a imobilização da HRP (procedimentos 1, 2, 3 e 4). A metodologia 1) consistiu em imobilizar a enzima por imersão das membranas de quitosana e quitosana/AuNP., na metodologia 2), as membranas foram neutralizadas antes de fazer a imobilização da enzima por imersão. No tratamento 3) a enzima foi dispersa nas soluções filmogênicas

de quitosana e quitoana/AuNP, em seguida foram submetidas a secagem para formação dos filmes. No tratamento 4) as soluções filmogênicas foram neutralizadas com NaOH, para posteriormente dispersar a enzima e formar os filmes.

A enzima HRP apresentou atividade enzimática pelo teste do guaiacol quando foi imobilizada usando os tratamentos 1 e 2; houve mudança de cor (de transparente para amarelo), sendo mais intenso quando a enzima foi imobilizada pelo tratamento 2, indicando que a neutralização destas membranas gerou um melhor ambiente onde a enzima teve maior atividade. No entanto, houve perda da integridade do filme inviabilizando sua posterior utilização. As membranas produzidas por estes dois tipos de tratamento perderam flexibilidade e apresentaram alta rugosidade na superfície, dificultando o acoplamento no biossensor. Assim estas membranas foram descartas, não sendo avaliadas eletricamente (curvas I-V) ao contato com soluções de peroxido de hidrogênio.

O tratamento 4 não permitiu manter a atividade do HRP provavelmente pela presença de íons Na^+ produto da dissociação do NaOH, os quais induzem a desnaturação do HRP ao interagir com resíduos da enzima.

As membranas feitas pelo tratamento 3 apresentaram uma forte mudança da cor ao contato com o peroxido de hidrogênio em presença do guaiacol (Figura 29), estas membranas apresentara uma superfície lisa e alta flexibilidade, sendo usadas nos seguintes ensaios.

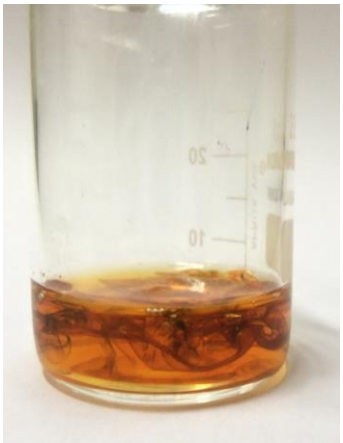


Figura 29. Foto obtida da reação entre a membrana de quitoana-HRP em presença de H_2O_2 e guaiacol com sua respectiva geração de tetraguaiacol.

Inicialmente se esperava que o tratamento 3 não permitisse manter a atividade da enzima devido ao pH das soluções filmogênicas (pH= 3,2). Ao contrário do esperado, o tratamento 3 foi o melhor método para a produção das membranas contendo HRP. É muito provável que nestas condições (pH ~3,2), a enzima não esteja no seu pH ótimo para catalisar as reações, já que a ficha técnica do fornecedor reporta que o pH ótimo do HRP esta entre 6,0 e 6,5. Apesar disso, as condições não foram tão agressivas para que a enzima perdesse a atividade.

Investigações futuras nesta área poderiam tentar a neutralização das soluções filmogênicas com outras bases tipo o hidróxido de potássio (KOH), para tentar aumentar o pH das soluções sem que os íons da dissociação do sal desnaturem a enzima, isto com a finalidade de que a atividade enzimática seja maior, ou desenvolver uma metodologia adequada para que as membranas sejam neutralizadas em solução sem que estas fiquem rugosas e percam suas características mecânicas.

Também se faz necessário adoptar um protocolo que permita avaliar a atividade da enzima de forma quantitativa.

6.5.2. CARATERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP

A morfologia das membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP foram estudadas usando MEV (Jeol ISM 7500F), nestas foi observada a presença da enzima nas membranas (Figura 31). Esta imagem foi similar as reportadas por Zhou et al. (2010), quem trabalhou no desenvolvimento de um biossensor de cobalto/quitosana e Yardimci; Senel; Baykal, (2012) os quais trabalharam na construção de um biossensor de AuNP/grafeno/quitosana, ambos contendo peroxidasse.

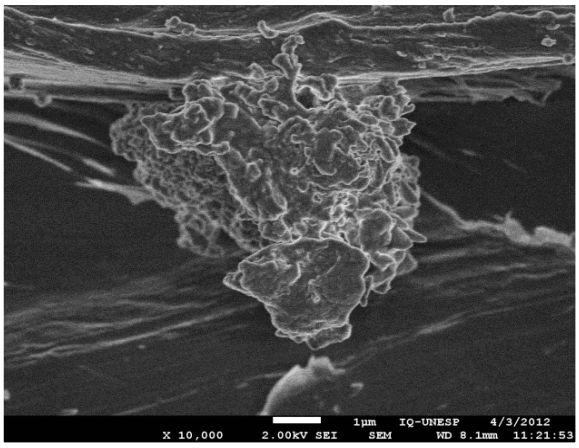


Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura das membranas de quitosana/AuNP/HRP, mostrando a enzima.

6.5.3. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA/HRP E QUITOSANA/AuNP/HRP

As curvas corrente-tensão entre 0 e 6 V foram obtidas nos eletrodos de 2 cm de diâmetro e são apresentadas na Figura 31. Ao igual que no reportado para as membranas com AuNP, a adição de HRP gerou um aumento da condutividade nas membranas de quitosana e quitosana/HRP, além de um aumento da biestabilidade, ambos fenômenos foram mais percebidos ao comparar a membrana de quitosana/AuNP com a membrana de quitosana/AuNP/HRP. A peroxidasse tem como centro ativo íons de ferro (Fe^{3+}) os quais são os possíveis responsáveis pelos dois acontecimentos observados, indicando que o transporte eletrônico além de ser modulado pela presença de AuNP também foi afetado pela adição de HRP nas membranas.

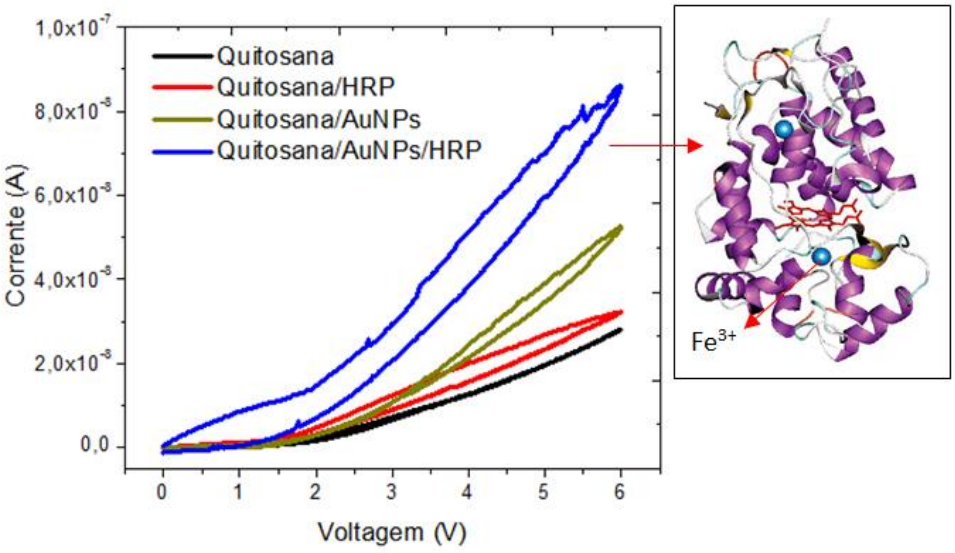


Figura 31. Curvas I-V das membranas d quitosana e quitosana/AuNP com e sem HRP. Como figura inserida, se presenta uma representação da enzima HRP adaptada pelo autor do trabalho de VEITCH, 2004.

6.5.4. CARATERIZAÇÃO ELETRICA DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/HRP, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP E SUA RESPOSTA AO CONTATO COM O PEROXIDO DE HIDROGENIO

As membranas de quitosana e quitosana/AuNP com e sem peroxidasse foram avaliadas nas diferentes concentrações de H_2O_2 como no descrito na seção 5.7.2. Inicialmente foram estudadas as membranas sem HRP as quais foram postas em contato com soluções de PBS contendo diferentes concentrações de H_2O_2. Observa-se que estas membranas não apresentaram mudança perceptíveis da sua resposta elétrica com o aumento da concentração do H_2O_2 devido a ausência do biorreceptor, como se apresenta na Figura 32.

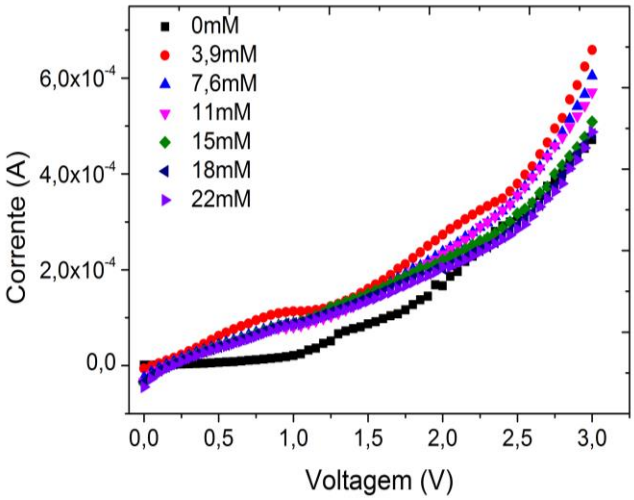
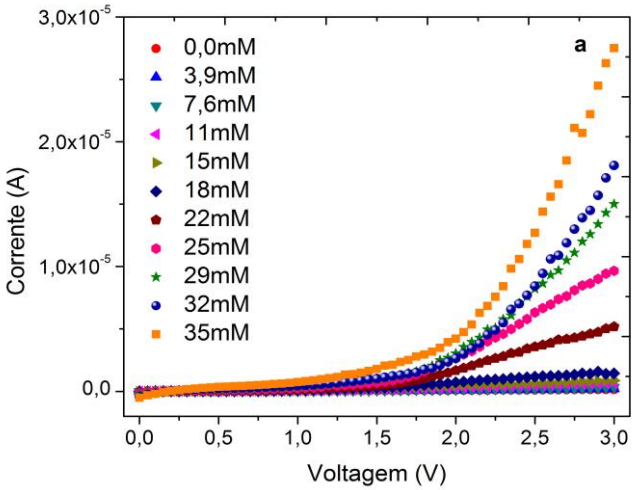


Figura 32. Curvas I-V da membrana de quitosana exposta a diferentes concentrações de H_2O_2.

Em seguida, foram avaliadas as membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP para as diferentes concentrações de H_2O_2, onde foi observado um aumento da corrente com a concentração do peroxido de hidrogênio (Figura 33), comportamento que se deve à geração de elétrons produto da reação da enzima com o peróxido de hidrogênio. Estes resultados indicam que as membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP podem-se aplicar como dispositivos para o futuro desenvolvimento de biossensores.



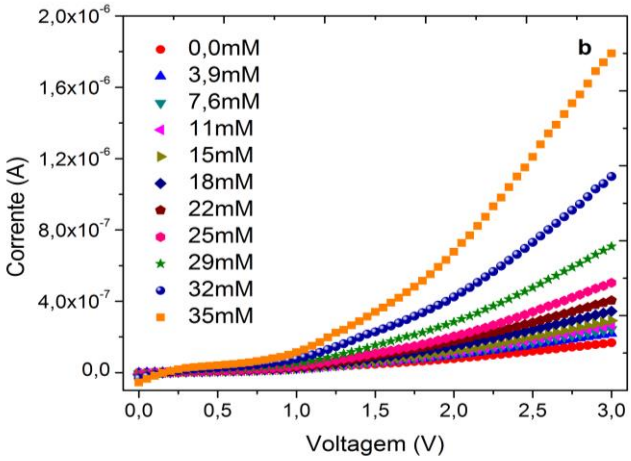


Figura 33. Curvas I-V das membranas de quitosana/HRP (a) e quitosana/AuNP/HRP (b) expostas as diferentes concentrações de H_2O_2.

Em sistemas amperométricos a corrente medida deve-se à reação da enzima com o H_2O_2, esta reação é reversível e envolve a geração de compostos intermediários tais como o composto I e composto II, os quais apresentam estados de oxidação de +4 e +5 (oxoferryl porfirina). O oxoferryl porfirina finalmente pode ser reduzido ao aceitar dois elétrons, retornando a ser HRP novamente (REN; YAN; ZHONG, 2012) como se apresenta na Equação 28.

Nas membranas usadas para o desenvolvimento de biossensores amperométricos, o processo de reação entre o HRP e o H_2O_2 envolve o fluxo de elétrons os quais atravessam a membranas para assim reduzir o composto intermediário (composto II) com estado de oxidação +5 até HRP (Fe^{+3}) como se apresenta na Figura 34. Este fluxo de elétrons é a corrente medida nos biossensores amperométricos.

$$\begin{aligned} &HRP\left(Fe^{3+}\right)+H_2O_2 \rightarrow Composto I\left(Fe^{4+}=O\right)+H_2O \\ &Composto I\left(Fe^{4+}=O\right)+e^{-}+H^{+} \rightarrow Composto II\left(Fe^{5+}\right) \\ &Composto II\left(Fe^{5+}\right)+e^{-}+H^{+} \rightarrow HRP\left(Fe^{3+}\right)+H_2O \end{aligned} \tag{28}$$

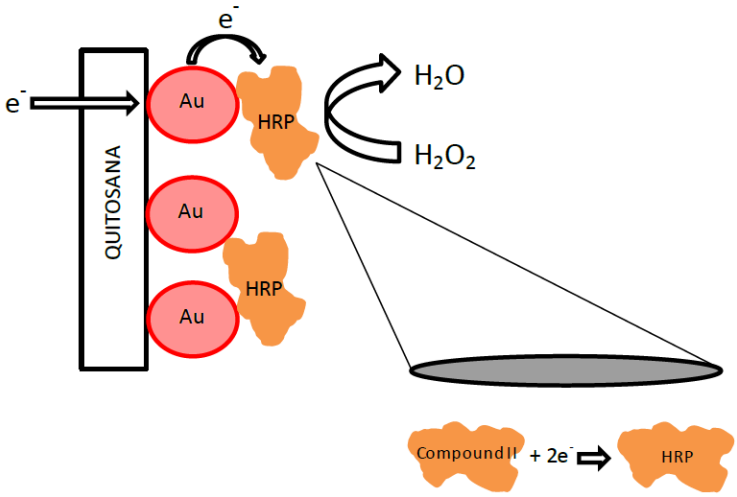


Figura 34. Transferência dos elétrons no biossensor amperométrico durante a redução do composto II até HRP.

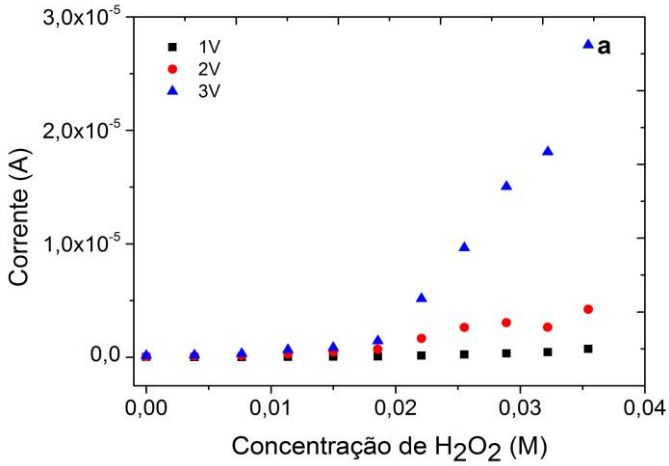
Fonte: KANG, X.B. et al. 2011. Modificado pelo autor.

Nos biossensores condutométricos, o mecanismo de reação entre o HRP e o H_2O_2 é diferente ao reportado para sistemas amperométricos. Em um sistema condutométrico a peroxidasse reage com o H_2O_2 formado o compostos I antes descrito. Neste tipo de sistemas não se espera que exista geração de íons H^+, e portanto as subsequentes reações não acontecem (formação do composto II e finalmente de HRP). Assim o composto I é uma transição onde o HRP compartilha um elétron com o oxigênio que é produto da dissociação do H_2O_2. Esta transição é altamente instável e poderia atuar como estados transitórios a través dos quais os elétrons podem se movimentar, apresentando comportamento análogo ao observado como as AuNP.

A membrana de quitosana/HRP sem AuNP apresentou maior sensibilidade à mudanças na concentração de H_2O_2, isto é oposto ao esperado e reportado na literatura

para biossensores amperométricos. Este fato pode-se dever a que o transporte eletrônico entre as enzimas é mais eficiente, em comparação a quando as enzimas ficam ligadas às AuNP. O ouro ao igual que o ferro presente no HRP são semi-metais, onde a única diferença entre eles é o seu estado de oxidação; as nanopartículas de ouro estão no seu estado neutro (Au^0), enquanto o ferro esta em um estado excitado (Fe^{3+}), esta diferença no estado de oxidação possivelmente gera uma diferença no transporte eletrônico das membranas com e sem AuNP acopladas as enzimas.

Para as membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP se pode observar que a condutividade aumenta com a concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 35), sendo bem ajustadas a um modelo polinomial de terceira ordem. Os parâmetros de cada modelo matemático assim como os coeficientes de correlação são apresentados na Tabela 3.



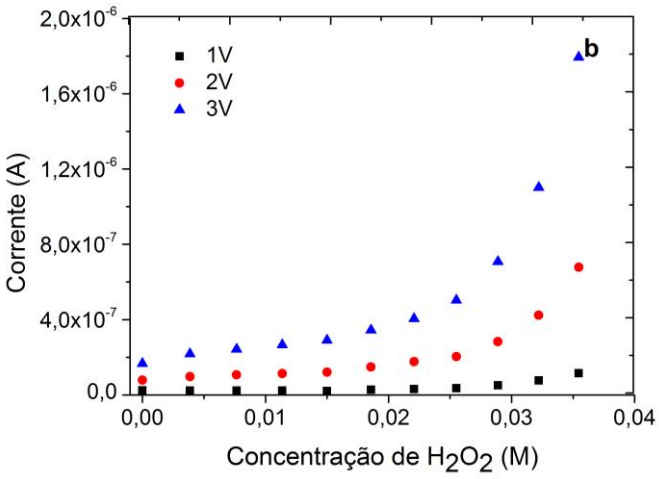


Figura 35. Curvas corrente vs. Concentração de HRP para as membranas de quitosana/HRP (a) e quitosana/AuNP/HRP (b).

Tabela 3. Parâmetros de ajuste para um modelo polinomial de terceira ordem ($I = aC^3+bC^2+cC+d$) da corrente como função da concentração de H_2O_2.

Membrana	Voltagem (V)	a	B	c	d	R^2
Quitosana/HRP	1	$3x10^{-2}$	$-7\ x10^{-4}$	$5\ x10^{-6}$	$3\ x10^{-8}$	0,99
	2	$-9,2\ x10^{-2}$	$8,4\ x10^{-3}$	$-8\ x10^{-5}$	$2\ x10^{-7}$	0,95
	3	$7,4\ x10^{-1}$	$-2,9\ x10^{-3}$	$-8\ x10^{-5}$	$4\ x10^{-7}$	0,99
Quitosana/AuNP/HRP	1	$6,4\ x10^{-3}$	$-2\ x10^{-4}$	$1\ x10^{-6}$	$2\ x10^{-8}$	0,99
	2	$4,4\ x10^{-2}$	$-1,6\ x10^{-3}$	$2\ x10^{-5}$	$6\ x10^{-8}$	0,99
	3	$1,2\ x10^{-1}$	$-4,4\ x10^{-3}$	$5\ x10^{-5}$	$1\ x10^{-8}$	0,99

Uma das vantagens dos biossensores amperométricos é usa linearidade na resposta elétrica em função da concentração do analito em estudo, no caso da detecção do H_2O_2, a linearidade dos dispositivos amperométricos há sido percebida em concentrações na faixa dos micro-mol ou mili-mol de H_2O_2 (LUO et al., 2005; SALIMI et al., 2007).

Analisando o comportamento da corrente a baixas concentrações de H_2O_2 (0-15 mM) nas membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP, foi observado que a corrente mudou linearmente com as concentrações de H_2O_2 na faixa entre 0 e 15 mM. A

resposta linear da corrente como função da concentração de H_2O_2 a baixas tensões é apresentada na Figura 36. A importância da resposta linear deste tipo de dispositivos radica na maior facilidade para a sua calibração sendo apenas necessárias duas concentrações conhecidas. Por est emotivo costuma ser uma característica desejada também no desenvolvimento de dispositivos biossensores. Além disso, os biossensores desenvolvidos neste trabalho são sustentáveis, pois tem maior rigidez e não precisam de substrato para serem imobilizados.

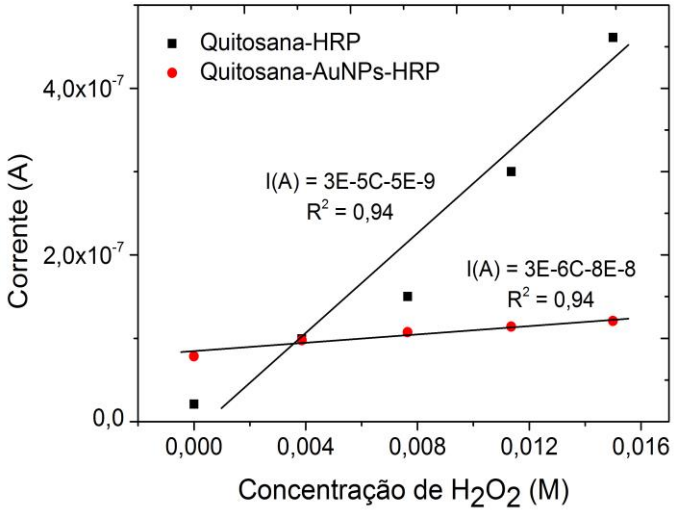


Figura 36. Detecção da região linear das curvas corrente vs. Concentração de HRP para as membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP.

Observou-se que quando a concentração de peroxido de hidrogênio foi superior a 35mM, as membranas contendo HRP se deterioraram mais rapidamente, contudo este resultado não é conclusivo por que há múltiplas variáveis tais como: tempo de exposição ao H_2O_2, concentração do H_2O_2 e tensão aplicada, entre outras. Seria necessário um estudo sistemático para entender o mecanismo de deterioração das membranas com HRP, o qual está além do escopo deste projeto.

Futuras pesquisas na área devem visar as aplicações das membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP como biossensores para a detecção de H_2O_2, assim se prevê a aplicação destes dispositivos na detecção de mastitis no gado leiteiro. Existem outras possíveis aplicações destes dispositivos tais como a quantificação de H_2O_2 nas águas residuais das indústrias ou a detecção de microrganismos nos alimentos.

6.5.5. CARATERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS DE QUITOSANA, QUITOSANA/HRP, QUITOSANA/AuNP E QUITOSANA/AuNP/HRP POR ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA

As membranas de quitosana e quitosana/AuNP foram avaliadas por espectroscopia de impedância para uma faixa de temperaturas entre 25 e 110°C, as membranas contendo HRP foram medidas a uma única isoterma de 25°C, posto que o aquecimento levaria a uma desnaturação da enzima. A Figura 37-a apresenta o gráfico ReZ' vs. –ImZ'' para uma membrana de quitosana e quitosana/AuNP, nesta duas curvas não há presença de um semicírculo bem definido como o apresentado na seção 2.5.6., devido ao fato que a região de transporte de massa por difusão (línea adjacente ao semicírculo) esta misturada com as componentes resistiva e capacitiva da membrana (semicírculo). Contudo, a membrana de quitosana/AuNP em comparação com a membrana de quitosana apresentou uma resposta elétrica diferente, o que é atribuído à presença das AuNP na sua estrutura. Nas duas membranas, o comportamento elétrico é típico de materiais onde a condutividade é determinada pelo movimento de prótons, e neste caso, atribuído à presença do acido acético usado no preparo da solução

filmogênica de quitosana e pelo grupo $–NH_3^+$ característico da quitosana (DU et al., 2009).

As curvas ReZ' vs. –ImZ'' nas membranas de quitosana e quitosana/HRP para uma isoterma de 25°C (Figura 37-b), apresentaram uma resposta similar ao reportado anteriormente na Figura 37-a, mas permitiu inferir que a adição da enzima não modificou o transporte iónico previamente registrado nas membranas sem HRP. Como se reportou na seção 6.5.3., a adição da HRP nas membranas de quitosana e quitosana/AuNP gerou um aumento da condutividade e da biestabilidade que foi observado nas curvas corrente-tensão, sendo relacionado ao transporte eletrônico nestes materiais. Contudo, através das curvas ReZ' vs. –ImZ'' obtidas por espectroscopia de impedância se observou que o transporte protônico não foi modificado com a adição da HRP nas membranas. Isto indicaria que a mudança nas curvas I-V, em particular a corrente medida para tensão diferentes de zero deve ser associada ao transporte eletrônico.

Finalmente, a Figura 37-c apresenta as curvas ReZ' vs. –ImZ'' da membrana de quitosana/AuNP a diferentes isotermas, foi percebido que o aumento da temperatura gerou uma modificação destas curvas, comportamento também observado nas membranas de quitosana. Jonscher (1999) relatou que o aumento da temperatura nos materiais poliméricos induz um aumento da condutividade por íons produto do rompimento de enlaces iônicos ou pela presença de impurezas no material. Assim, nas membranas de quitosana e quitosana/AuNP o aumento da condução protônica pode ser causado pela rompimento de enlaces no grupo $–NH_3^+$ da quitosana, geração de íons H^+ do ácido acético ou rompimento da interação quitosana-AuNP.

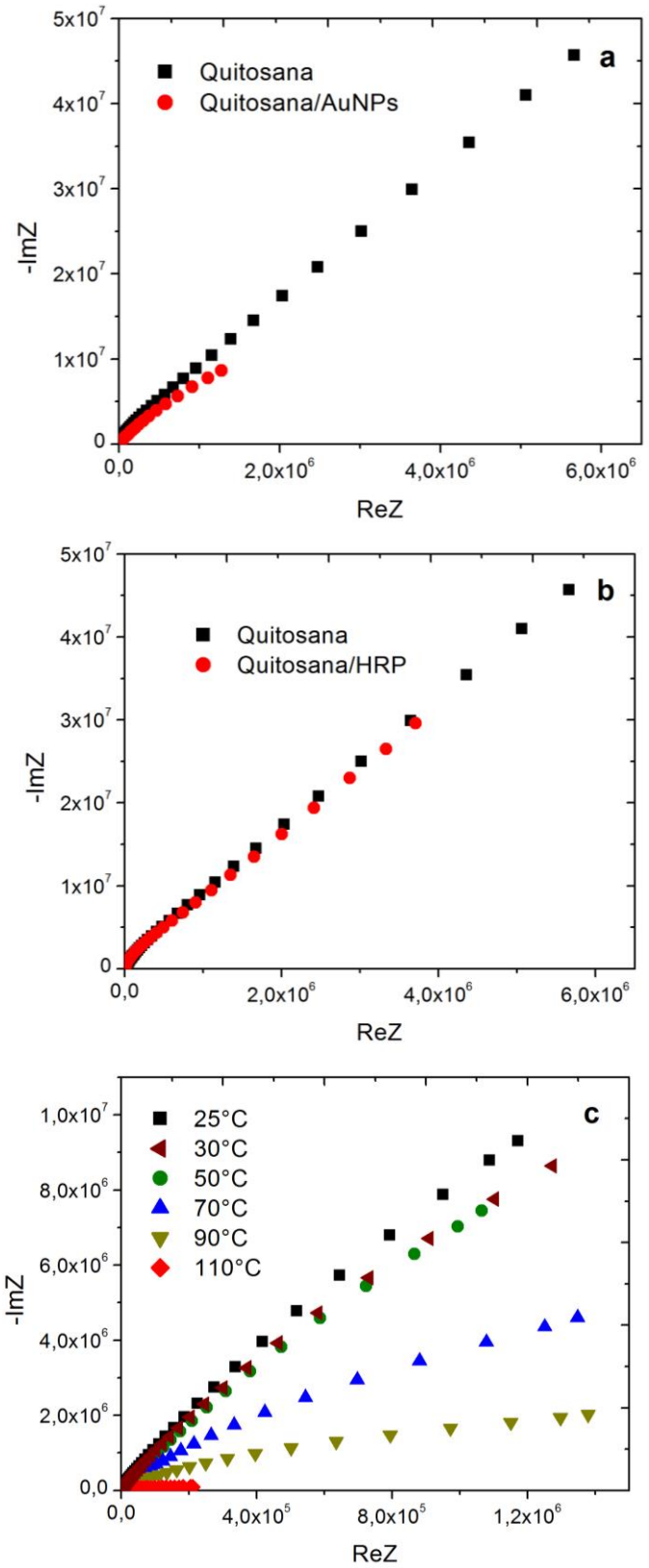


Figura 37. Curvas ReZ' vs. –ImZ'' para uma membrana de quitosana e quitosana/AuNP a 25°C (a), quitosana e quitosana/HRP a 25°C (b) e quitosana/AuNP a diferentes isotermas (c).

7. CONCLUSÕES

Este trabalho visou o desenvolvimento de um biossensor condutométrico para a detecção de peroxido de hidrogênio, e a verificação da viabilidade do princípio de operação proposto. Para atingir este objetivo final, tiveram que ser abordadas três grandes áreas: síntese de nanopartículas de ouro (1), produção de membranas de quitosana/AuNP (2) e membranas quitosana/AuNP/HRP (3). Com base nos resultados pode-se concluir que:

- As AuNP foram sintetizadas ao usar carboidratos como monossacarídeos, dissacarídeos e biopolímeros, contudo o processo de síntese e afetado pelo tipo de carboidrato e o pH da solução. O uso de outros reagentes como extratos de folhas de hortelã e cascas de frutas também se mostraram viáveis na síntese de AuNP que foi conseguida em períodos de tempo curtos (10 min).
- Ao usar quitosana como agente redutor do cloreto de ouro, se observou que o processo de síntese das AuNP foi favorecido pelo aquecimento das soluções, sendo melhor quando a reação foi feita a 90°C. Esta reação incrementou também com a concentração do cloreto de ouro. Para uma temperatura de 90°C o processo de síntese de AuNP se estabilizou após da primeira hora de aquecimento, em seguida esta reação permaneceu quase constante até um tempo de 3h. Tempos maiores de aquecimento levaram a uma diminuição da absorbância nos espectros UV-Vis que podem ser atribuídas à precipitação ou aglomeração das nanopartículas.
- A metodologia utilizada para a obtenção de membranas com AuNP permitiu obter materiais onde as nanopartículas ficaram dispersas de forma homogênea.

- A presença de AuNP em membranas de quitosana modula o transporte eletrônico no material, assim as nanopartículas aumentaram a condutividade e biestabilidade na membrana de quitosana, o qual é devido a que este nanomaterial atua como uma armadilha de carga. As AuNP podem melhorar a condução ao estabelecer estados intermediários donde os elétrons podem atravessar a membrana com maior facilidade.
- Diferentes modelos teóricos foram discutidos no referente ao transporte eletrônico, podendo ser regido pela injeção (entre o eletrodo e a membrana) ou pelo transporte de carga no material. Acorde aos gráficos obtidos pelas curvas I-V, o transporte nestes materiais é dominado pela condução dos elétrons através do material, onde uma combinação de mecanismos do tipo TCLC e SCLC foi percebida com o aumento na concentração da AuNP.
- Duas metodologias foram avaliadas para a neutralização das membranas, como etapa previa à imobilização do HRP. Assim foi percebido que o tratamento baseado na neutralização das soluções filmogênicas com NaOH gerou a desnaturação da enzima na etapa posterior (imobilização do HRP).
- As membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP se mostraram sensíveis as concentrações de H_2O_2, podendo servir para o futuro desenvolvimento de biossensores.
- No caso das membranas quitosana/AuNP/HRP testadas a diferentes concentrações de H_2O_2, as AuNP prejudicaram a condução pois a captura de elétrons nas AuNP interfere na sensibilidade do biossensor.
- Neste estudo foi avaliado com sucesso o principio de funcionamento de um protótipo de biossensor condutométrico contendo peroxidasse. Contudo, visando o aprimoramento do mesmo, alguns estudos sistemáticos são propostos:

(1) Estudar o efeito do NaOH (durante a neutralização) sobre a desnaturação da enzima HRP durante a etapa de imobilização da mesma, assim como quais sais poderiam evitar a desnaturação do HRP; (2) desenvolver uma metodologia que permita garantir a manutenção das propriedades mecânicas e de morfologia nas membranas durante a neutralização por imersão em soluções; (3) melhorar a integridade das membranas de quitosana/HRP e quitosana/AuNP/HRP para torná-las mais resistentes às concentrações de H_2O_2. Os itens anteriores poderiam ser melhorados, caso o intumescimento das membranas fosse diminuído; (4) melhorar a sensibilidade das membranas de quitosana/AuNP/HRP, onde as AuNP não atrapalhem a resposta elétrica do biossensor.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARNELA, K. et al. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. **Food Science and Technology**, Oxford, v.40, p.1041–1048, 2007.

AHMAD, Z. et al. Electrical characteristic of poly(methylsilsesquioxane) thin film for non-volatile memory. **Solid State Communication**, v.151, p.297-300, 2011.

AN, J. et al. Preparation and characterization of silver-chitosan nanocomposite particles with antimicrobial activity. **Journal of Applied Polymer Science**, v.120, p.3180-32189, 2011.

ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v.3, p.203-230, 2009.

AVELLANEDA, C.O. et al. Solid-state electrochromic devices with Nb_2O_5:Mo thin film and gelatin-based electrolyte. **Electrochemica Acta**, v.53, p.1648-1654, 2007.

AYALA, G. et al. Study of dc conductivity, transport mechanism, and dielectric relaxation in cassava starch membranes plasticized with glycerol. **Ionics**, v.17, p.647-652, 2011.

AYALA G. et al. A simple and green method for synthesis of Ag and Au nanoparticles using biopolymers and sugars as reducing agent. **Materials Research Society proceedings**, v.1386, 2012.

AYALA, G.V.; AGUDELO, A.C.H.; VARGAS, R.A.Z. Effect of glycerol concentration and temperature on the rheological properties of cassava starch solutions. **Journal of Polymer Engineering**, 2013. No prelo.

AZIZ, S.B.; ABIDIN, Z.H.Z.; AROF, A.K. Effect of silver nanoparticles on the DC conductivity in chitosan-silver triflate polymer electrolyte. **Physica B**, v.405, p.4429-4433, 2010.

BANKAR, A. et al. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,** v.368, p.58-63, 2010[a].

BANKAR, A. et al. Banana peel extract mediated synthesis of gold nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v.80, p.45-50, 2010[b].

BERBERAN, M.N.; SANTOS. **Espectroscopia, principios de Química Física.** Instituto Superior Técnico, 2012.

BERNI-NETO, E.A. **Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Física. 2010.

BHUMKAR, D.R., et al. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carries for transmucosal delivery of insulin. **Pharmaceutical Research**, v.24, p.1415-1426, 2007.

BURN, P.L. et al. Chemical tuning of electroluminescent copolymers to improve emission efficiencies and allow patterning, **Nature**, v.356, p.47-49, 1992.

BURROUGHES, J.H. et al. Light-emitting diodes based on conjugated polymers. **Nature**, v.347, p. 539-541, 1990.

BRÜTTING, W; BERLEB, S; MÜCKL, A.G. Device physics of organic-emitting diodes based on molecular materials. **Organic Electronics**, v.2, p.1-36, 2001.

CAMPOS, G. et al. Morbimortalidade infantil por diarréia aguda em área metropolitana da região Nordeste do Brasil, 1986-1989. **Revista de Saúde Pública**, v.29, p. 132-139, 1995.

CANEVAROLO, S.V. Jr. **Técnicas de caracterização de polímeros**. 1 ed. Artliber Editorial Ltda. 2007.

CASTILLO, J. Electrical relaxation in proton conductor composites base on $(NH_4)H_2PO_4/TiO_2$. **Ionics,** v.15, p.329-336, 2009.

CAVALCANTE, A.E.F.; MONTENEGRO, T.C.S.; MONTENEGRO, T.L.S. Produção e caracterização de esfera de quitosana modificada quimicamente. **Revista Iberoamericana de Polimeros**, v.9, p.435-451, 2006.

CENTER FOR SCIENCE IN THE PUBLIC INTEREST, 2009. Disponível em: < http://cspinet.org/new/pdf/outbreakalertreport09.pdf>. Acesso em: 4 de fevereiro 2013.

CHEMICAL HERITAGE FOUNDATION. Disponível em: < http://www.chemheritage.org/discover/online-resources/chemistry-in-history/themes/microelectronics-and-nanotechnology/macdiarmid-heeger-shirakawa.aspx>. Acesso em: 4 de fevereiro 2013.

CHEN, J.R. et al. The temperature dependent physical and electrical characteriscitcs of a polymer/RAFT-polymer stabilized nanoparticle system for organic nonvolatile memory. **Nanotechnology**, v.20, p.255706, 2009.

CLARK, B.J.; FROST, T.; RUSSELL, M.A. **UV Spectroscopy. Techniques, instrumentation data handling**. 6 ed. Chapman & Hall, 1993.

CREMER, M. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von Polyphasischen Elektrolytketten. **Z. Biol.**, v.47, p.56, 1906.

CUI, Z. et al. Chitosan/heteropolyacid composite membranes for direct methanol fuel cell. **Journal of Power Source**, v.188, p.124-129, 2009.

DANCIL, K.P.S.; GRENIER, D.P.; SAILOR, M.J. A porous silicon optical biosensor: detection of reversible binding of IgG to a protein a-modified surface. **Journal of the American Chemical Society**, v.121, p.7925-7930, 1999.

DENNLER, G.; SARICIFTCI, N.S. Flexible Conjugated Polymer-Based Plastic Solar Cells: From Basics to Applications, **IEEE,** v.93, p.1429-1439, 2005.

DORNELLES, L.M.; TATSUO, L.K. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. Analytical. **Nutritional and Clinical Methods**, v.77, p.237-256, 2002.

DU, J.F. Synthesis and performance of proton conducting chitosan/NH_4Cl electrolyte. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v.48, p.260-266, 2010.

DUBEY, S.P.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochesmistry**, v.45, p.1065-1071, 2010[a].

DUBEY, S.P.; LAHTINEN, M.; SILLANPÄÄ, M. Green synthesis and characterizations of silver and gold nanoparticles using leaf extract of Rosa rugosa. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.364, p.34-41, 2010[b].

DURKUT, M. et al. Electrical transport measurements on self-assembled organic molecular wires. **The Journal of Chemical Physics**, v.124, p.154704, 2006.

DUTTA, P.K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V.S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Science & Industrial Research**, v.63, p.20-31, 2004.

ELAVAZHAGAN, T; ARUNACHALAM, K.D. *Memecylon edule* leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine,** v.6, p.1265-1278, 2011.

ENGELBREKT, C. et al. Green synthesis of gold nanoparticles with starch-glucose and applications in bioelectrochemistry. **Journal of materials Chemistry**, v.19, p.7839-7847, 2009.

FARIAS-FIRMO, C.E. **Ocorrência de surtos alimentares em escolas de educação básica**. 2010. 32 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Ambiental e Industrial. 2010.

FEDOTOV, V.A. et al. Optical properties of closely paked nanoparticles films: spheroids and nanoshells. **Journal of Optics A: Pure and Applied optics**, v.6, p.155-160, 2004.

FENG, D.; WANG, F.; CHEN, Z. Electrochemical glucose sensor based on one-step construction of gold nanoparticle-chitosan composite film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.138, p.539-544, 2009.

FERNANDES, J.C.B.; KUBOTA, L.T. Electrodos ions-seletivos: Histórico, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Quimica Nova,** v.24, p.120-130, 2001.

FEU, W.H.M., et al. Current bistability in a weakly coupled multi-quantum well structure: a magnetic field induced 'memory effect'. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.42, p.145109, 2009.

FILIPPO, E. et al. Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.356, p.344-350, 2010.

GHASEMINEZHAD, S.M.; HAMEDI, S.; SHOJAOSADATI, S.A. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. **Carbohydrate Polymers,** v.89, p.467-472, 2012.

GONDIM, J.A.M., et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p.825-827, 2005.

GRANIER, F. et al. All-Polymer Field-Effect Transistor Realized by Printing Techniques. **Science**, v.265, p.1684-1686, 1994.

GRIMVALL, G.; ANDERSSON, T.G. Electrical conductivity of non-homogeneous Au films on glass. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.16, p.1985-1991, 1985.

HAISS, W. et al. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV- spectra. **Analytical Chemistry,** v.79, p.4215-4221, 2007.

HABER, F.; KLEMENSIEWICZ, Z. Über elektrische Phasengrenzkräft. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v.28, p.385, 1909.

HOUILI, H.; TUTIS, E.; IZQUIERDO, R. Modeling nanoparticle embedded organic memory devices, **Organic Electronics**, v.11, p.514-520, 2010.

HUANG, J. et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v.18, p.105104, 2007.

HUANG, H.; YUAN, Q.; YANG, X. Morphology study of gold–chitosan nanocomposites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.282, p.26-31, 2005.

HUANG, Y. et al. In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, p.7616-7627, 2005.

HUET, A.C. et al. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v.29, p.1281-1294, 2010.

JAMALUDIN, A.; MOHAMAD, A.A. Applications of liquid gel polymer electrolyte based on chitosan-NH_4NO_3 for proton batteries. **Journal of Applied Polymer Science**, v.118, p.1240-1243, 2010.

JIANG, P. et al. PVP-capped twinned gold plates from nanometer to micrometer. **Journal of Nanoparticles Research**, v.8, p.927-934, 2006.

JIN-LAN, X.; CHUN, W.; ZHEN-YUAN, N. structure, properties and applications to water-soluble coatings of complex antimicrobial agent Ag-carboxymethyl chitosan-thiabendazole**. J. Cent. South Univ. Technol**., v.12, p.526-530, 2005.

JING An. et al. Preparation and characterization of silver-chitosan nanocomposites particles with antimicrobial activity. **Journal of Applied polymer Science**, v.120, p.3180-3189, 2011.

JIN, X. et al. The effect of the chitosan properties on the enzyme adsorption and performance for the construction of horseradish peroxidase biosensors. **Carbohydrate Polymers**, v.85, p.786-791, 2011.

JONSCHER, A.K. Dieletric relaxation in solids. **J.Phys. D: Appl. Phys**, v.32, p.R57-R70, 1999.

JONSCHER, A.K. **Dielectric relaxation in solids**. Chelsea Dielectric. London, 1983.

KANG, X.B. et al. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan. **Electrochimica Acta**, v.62, p.327-324, 2011.

KASTHURI, J.; KATHIRAVAN, K.; RAJENDIRAN, N. Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach. **Journal of Nanoparticles Research**, v.11, p.1075-1085, 2009.

KASSAEE, M.Z.; AKHAVAN, A.; BETESHOBABRUD, S.R. γ-Ray synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles with antibacterial activities. **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, p.1074-1078, 2008.

KASTHURI, J.; KATHIRAVAN, K.; RAJENDIRAN, N. Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach. **Journal of Nanoparticles Research**, v.11, p.1075-1085, 2009.

KATTI, K.K. et al. Facile and general method for synthesis of sugar coated gold nanoparticles. **Int. J. Green Nanotechnol. Biomed**., v.1, p.B53-B59, 2009.

KHIAR, A.S.A.; AROF, A.K. Electrical properties of starch/chitosan-NH_4NO_3 polymer electrolyte. **World Academic Science, Engineering and technology**, v.59, p.23-27, 2011.

KHLEBTSON, N.G.; DYKMAN, L.A. Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. **Journal of Quantitative Spectroscopy & Radioactive Transfer**, v.11, p.1-35, 2010.

KHLEBTSOV, N.G. et al. Spectral extinction of colloidal and its bioespecific conjugates. **Journal of Colloidal and Interface Science**, v.180, p.436-445, 1996.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-basedmaterials for enzymeimmobilizations: areview. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126-139, 2004.

KYURI, L. et al. Optical imaging of intracellular reactive oxygen species for the assessment of the cytotoxicity of nanoparticles. **Biomaterials**, v.32, p.2556–2565, 2011.

LEE, P.F.; DAI, J.Y. Memory effect of an organic based trilayer structure with Au nanocrystals in an insulating polymer matrix. **Nanotechnology**, v.21, p.295706, 21.

LEI, C.X. et al. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer supported by sol-gel derived carbono ceramic electrode. **Bioelectrochemistry**, v.65, p.33-39, 2004.

LEONG, W.L. et al. Charging dynamics of discrete gold nanoparticle arrays self-assembled within a poly(styrene-b-4-vinylpyridine) diblock copolymer template. **Applied Physics Letters,** v.93, p.222908, 2008.

LIU, C.C. **Electrochemical Sensors, The Biomedical Engineering Handbook**. 2.ed. CRC Press LLC, 2000.

LIU, Y. et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode. **Sensors and Actuators B**, v.115, p.109-115, 2006.

LIN, J.; QU, W.; ZHANG, S. Disposable biosensor based on enzyme immobilized on Au-chitosan-modified indium tin oxide electrode with flow injection amperometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v.360, p.288-293, 2007.

LIANOS, P.; THOMAS, J.K. Cadmium sulfite of small dimensions produced in inverted micelles. **Chemical Physical Letters**, v.125, p. 299-302, 1986.

LISIEKI, I.; PILENI, M.P. Synthesis of copper metallic clusters using reverse micelles as microreactors. **Journal of the American Chemical Society,** v.115, p. 3887-3892, 1993.

LO, S.C. et al. Encapsulated cores: Host-free organic light-emitting diodes based on solution-processible electrophosphorescent dendrimers, **Advance Materials**, v.17, p. 1945-1948, 2005.

LUE, J.T. A review of characterization and physical property studies of metallic nanoparticles. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v.62, p.1599-1612, 2001.

LU, X. et al. Direct electron transfer of horseradish peroxidase and it biosensor based on chitosan and room temperature ionic liquid. **Electronichemistry Communications**, v.8, p.874-878, 2006.

LUO, X.L. et al. Electrochemical deposited chitosan hydrogel for horseradish peroxidase immobilization through gold nanoparticles self-assembly. **Biosensors and Bioelectronics**, v.21, p.190-196, 2005.

MALHOTRA, B. et al. Recent trends in biosensors. **Current Applied Physics**, v.5, p.92-97, 2005.

MALLICK e SARKAR, A. An experimental investigation of electrical conductivities in biopolymers. **Bull Mater. Sci**., v23, p.319-324, 2000.

MILK FACTS, 2012. Disponível em: < http://milkfacts.info/Milk%20Microbiology/Disease%20Outbreaks.htm>. Acesso em: 4 de fevereiro 2013.

MIZUKANI, M. et al. Flexible AM OLED panel driven by bottom-contact OTFTs. **IEEE Electron Device letters**, v.27, p.249-251, 2006.

MUBARAKALI, D. et al. Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.85, p.360-365, 2011.

MUKOMA, P.; JOOSTE, B.R.; VOSLOO, H.C.M. Synthesis and characterization of cross-linked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane materials in fuel cells. **Journal of Power Sources**, v.136, p.16-23, 2004.

MÜLLER, C.D. et al. Multicolour organic light-emitting displays by solution processing, **Nature**, v.42, p. 829-832, 2003.

MÜLLER, K.H. et al. Percolation model for electron conduction in films of metal nanoparticles linked by organic molecules. **Physical Review,** v.66, p.075417, 2002.

MURUGARAJ, P. et al. Influence of thermal stresses on electron transport in carbon-polymer nanocomposite films. **Composites Part A: Applied Science and Manufacturing**. v.39, p.308-313, 2008.

NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. **Materials Letters**, v.62, p.4588-4590, 2008.

NERNST, W.; LOEB, K.Z. Zur kinetic de in lösung betindichen körper. Zwetitc abhandlung überführungszahlen und leitvermögen einiger silbersalze. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v.2, p.948-963, 1888.

NERNST, W.; GLEICHGEWICHT, U.C. Elektromotorische Wirksamkeit und elektrolytische Abscheidung von Metallgemischen. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v.22, p.539-542, 1897.

OUYANG, H.; HUANG, S.; JIANG, Z. Enzyme catalytic resonance scattering spectral detection of trace hydrogen peroxide using guaiacol as substrate. **Bull. Chem. Soc. Ethiop.,** v.52, p.161-168, 2011.

OUYAND, J.; YANG, Y. Polymer:metal nanoparticle devices with electrode-sensitive bipolar resistive swichings and their application as nonvolatile memory devices. **Applied Physics Letters**, v. 96, p.063506, 2010.

PANIGRAHI, S. et al. Sugar assisted evolution of mono- and bimetallic nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v.264, p. 133-138, 2005.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy**. 3 ed. Stanley Thormes, 2000.

PATEL, P.D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety; a review. **Trends in analytical chemistry**, v.21, p.96-115, 2002.

PEI, Z.; SU, A.Y.K.; HWANG, H.L. Room temperature tunneling transport through Si nanodots in silicon rich silicon nitride. **Applied Physics Letters**, v.86, p.063503, 2005.

PHILIP, D. Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** v.73, p.650-653, 2009.

RAGUSE, B. et al. Gold nanoparticle chemiresistor sensors in aqueous solution: comparison of hydrophobic and hydrophilic nanoparticle films. **Journal of Physical Chemistry**, v.113, p.15390-15397, 2009.

REDDY, V.S. et al. Carrier transport mechanism in aluminum nanoparticles embedded AlQ3 structures for organic bistable memory devices, **Organic Electronics**, v.10, p.138-144, 2009.

REN, L.; YAN, D.; ZHONG, W. Enhanced enzyme activity through electron transfer between single-walled carbon nanotubes and horseradish peroxidase. **Carbon**, v.50, p.1303-1310, 2012.

RICCI, F. et al. A review on novel development and applications of immunosensors in food analysis. **Analytica Chimica Acta**, v.605, p.111-129, 2007.

SADIK, O.A.; ALUOCH, A.O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosensors and bioelectronics**, v.24, p. 2749-2765, 2009.

SALEEM, M. **Investigation of organic materials for the fabrication of electric, electronic and photonic devices**. 2010. 247 f. Teses (Doutorado). Topi, District, Swabi, Khyper Pukhtoonkhwa, Pakistan. Ghulam Ishaq Khan Institute of Engineering Sciences & Technology. 2010.

SALIMI, A. Immoilization of glucose oxidase on electrodeposited nickel oxide nanoparticles: Direct electron transfer and electrocatalityc activity. **Biosensors & Bioelectronics**, v.22, p.3146-3153, 2007.

SEO, J.H. et al. Highly efficient white organic light-emitting diodes using two emitting materials for three primary colors (red, green, and blue). **Applied Physics Letters,** v.90 p. 203507, 2007.

SHANKAR, S.S.; AHMAD, A.; SASTRY, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. Biotechnol Progress, v.19, p.1627-1631, 2003.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloids Interfaces Science**, v.145, p.83-96, 2009.

SHERVANI, Z.; YAMAMOTO, Y. Size and morphology controlled synthesis of gold nanoparticles in green solvent: Effect of reducing agents. **Materials Letters**, v.65, p.92-95, 2011[a].

SHERVANI, Z.; YAMAMOTO, Y. Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. **Carbohydrate Research**, v.346, p.651-568, 2011[b].

SIGMA ALDRISH. Disponível em: < http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p8375?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 7 de fevereiro 2013.

SIVARAMAN, S.K. et al. A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. **Research Communications**, v.97, p. 1055-1059, 2009.

SONG, J.Y.; JAN, H.K.; KIM, B.S. Biological synthesis of gold nanoparticles using Magnolia kokus and Diopyros kaki leaf extracts. **Process Biochemistry**, v.44, p.1133-1138, 2009.

STEFANAC. Z.; SIMON, W. In-vitro Verhalten von Makrotetroliden in Membranen als Grundlage fur hochselektive Kationen spezifische Elektro-densysteme. **Chimia**, v.20, p.436, 1966.

STEFANAC, Z.; SIMON, W. Ion specific electrochemical behavior of macrotretolides in membranes. **Microchemical Journal**, v.12, p.125-132, 1967.

TANG, C.W.; SLYKE, S.A.V. Organic electroluminescent diodes. **Applied Physics letter**, v.51, p. 913-915, 1987.

THÉVENOT, D.R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, p. 121-131, 2001.

TOUMEY, C. Reading Feynman Into Nanotechnology: A Text for a New Science. **Techné**, v.12, p. 133-168, 2008.

VALENZUELA, R. Caracterización de materiales por espectroscopia de impedancias. Universidad Nacional Autónoma de México. **Revista Cubana de física**, v.19, p.81-84, 2002.

VASILEVA, P. et al. Synthesis of starch-stabilized silver nanoparticles and their application as a surface plasmon resonance-based sensor of hydrogen peroxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.382, p.203-210, 2011.

VASILEVA, N. et al. Application of immobilized horseradish peroxidase onto modified acrylonitrile copolymer membrane in removing of phenol from water. **International Journal of Biological Macromolecules,** v.44, p.190-194, 2009.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of classic enzyme. **Phytochemistry**, v.65, p.249-259, 2004.

VELUSAMY, V. et al. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. **Biotechnology Advances**, v.28, p.232-254, 2010.

VIEIRA, S.B. **Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de hepatopatitas**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Química. 2007.

VIGNESHWARAN, R.P. et al. A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. **Carbohydrate Research**, v.341, p.2012-2018, 2006.

VINOD, V.T.P. et al. A facile synthesis and characterization of Ag, Au and Pt nanoparticles using a natural hydrocolloid gum kondagogu (Cochlospermum gossypium). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.83, p.291-298, 2011.

WALKER, A.B.; KAMBILI, A.; MARTIN, S.J. Electrical transport modeling in organic electroluminescent devices. **J. Phys. Condens. Matter**., v.14, p.9825-9876, 2002.

WANG, B. et al. Amperometric enzyme electrode for the determination of hydrogen peroxide based on sol-gel/hydrogel composite film. **Analytica Chimica Acta**, v.407, p.111-118, 2000.

WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.19, p.47-53, 1999.

WEE, K.R. et al. New technique for measuring carrier mobility using a modified boxcar integrator. **Review of Scientific Instruments**, v.80, p.096106, 2009.

WEI, D.; QUIAN, W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v.62, p. 136-142, 2008.

WEISS, E.A. et al. The study of charge transport through organic thin films: mechanism, tools and applications, Philosophical Transactions of the Royal Society A, v.365, p.1509–1537, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012 Disponível em: < http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/communicable-diseases/outbreaks-of-e.-coli-o104h4-infection>. Acesso em: 4 de fevereiro 2013.

YAHYA, M.Z.A.; AROF, A.K. Effect of oleic acid plasticizer on chitosan–lithium acetate solid polymer electrolytes. **European Polymer Journal**, v. 39, p.897-902, 2003.

YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering C**, v.30, p.891-897, 2010.

ZABET-KHOSOUSI, A.; DHIRANI, A.A., Charge Transport in Nanoparticle Assemblies, **Chemical Reviews**, v.108, p.4072-4124, 2008.

ZAZOUA, A. et al. A new HRP/catalase biosensor on microconductometric transduction for nitrite determination. **Materials Science and Engineering C**, v.29, p.1919-1922, 2009.

ZETASIZER NANO SERIES USER MANUAL. MAN 0317, 21, capítulo 16, 2004. Disponível na web em: <http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20Manual.pdf>. Acesso em: 7 de fevereiro 2013.

YARDIMCI, F.S.; SENEL, M.; BAYKAL, A. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on cobalt ferrite-chitosan nanocomposite. **Materials Science and engineering C**, v.32, p.269-275, 2012.

ZHAO, J.; HENKENS, R.W.; CRUMBLISS, A.L. Mediator-free amperometric determination of toxic substances based on their inhibition of immobilized horseradish peroxidase, **Biotechnol. Prog**., v.12, p.703-708, 1996.

ZHOU, K. et al. A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites. **Electrochimica Acta**, v.55, p.3055-3060, 2010.