



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado



**TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA ENTRE PEROXIDASE DE
RAÍZ FORTE, EM INGLÊS HORSERADISH PEROXIDASE, E
CARBONO VÍTREO**

Simone Reis Santos

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Maia

Campo Grande – 2011



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Exatas e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química - Mestrado



**TRANSFERÊNCIA ELETRÔNICA DIRETA ENTRE PEROXIDASE DE
RAÍZ FORTE, EM INGLÊS HORSERADISH PEROXIDASE, E
CARBONO VÍTREO**

Simone Reis Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado - da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Química (área de concentração: Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Maia

Campo Grande - 2011

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces.”

Aristóteles

Agradecimentos

- ▶ A Deus por estar sempre à espreita.
- ▶ Ao Prof. Dr. Gilberto Maia pela orientação, confiança e principalmente apoio para a realização deste trabalho.
- ▶ A Dra. Adriana Evaristo de Carvalho pelo grande incentivo e pela valiosa contribuição que me permitiram realizar esse trabalho.
- ▶ A todos os professores do Departamento de Química da UFMS pela minha formação acadêmica.
- ▶ Aos meus pais, Elenilza e Geraldo.
- ▶ A Tatiane, Tatiana e Kelen, por uma década de amizade, companheirismo e amor.
- ▶ Ao Filipe pelo companheirismo, amor e por fazer meus dias coloridos.
- ▶ Aos amigos dos Laboratórios de Pesquisa 5 e 6 (LP5/LP6): Fabinho, Gisele, Bruno, Antonio
- ▶ Marcos, Hebert, Andréia, Ricardo Caramit, Ricardo Jr., Luna, Rodrigo, JB, Adriana, Franklin, Alex, Carô, Daniela, Michelli, Jacqueline, Eiva.
- ▶ Aos amigos dos Laboratórios de Pesquisa 1, 3 e 4 (LP1/LP3 e LP4) pelos tantos momentos de descontração.
- ▶ A PROPP/UFMS pela bolsa de mestrado e apoio financeiro.
- ▶ A FUNDECT pelo apoio financeiro concedido.
- ▶ DQI/UFMS pelo espaço físico.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	<i>i</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>vi</i>
LISTA DE TABELAS.....	<i>x</i>
RESUMO.....	<i>xi</i>
ABSTRACT.....	<i>xiii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Ciclos bioeletrocatalíticos da peroxidase.....	02
1.2. Propriedades redox de heme peroxidases.....	04
1.2.1. Propriedades do par redox Fe^{3+}/Fe^{2+}	05
1.3. Peroxidases pertencentes à superfamília de plantas, fungos e bactérias.....	06
1.4. Alguns valores de $E^{\sigma}_{Fe^{3+}/Fe^{2+}}$ para HRP-C obtidos de resultados voltamétricos... 	07
1.5. CV vs. PGE.....	14
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Reagentes e soluções.....	21
4.2. Células eletroquímicas.....	21
4.3. Eletrodos.....	22
4.4. Equipamentos.....	22
4.5. Métodos de Limpeza.....	22
4.5.1. Eletrodos de referência e auxiliar e célula eletroquímica.....	22
4.5.2. Eletrodo de carbono vítreo.....	23
4.6. Procedimentos Experimentais.....	23
4.6.1. Preparação dos eletrodos modificados CV/HRP.....	23
4.6.2. Preparação dos eletrodos modificados de CV/HRP-PM/Nafion.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

5.1. Resultados para avaliação do perfil e da repetibilidade dos resultados ciclovoltagemétricos nas superfícies de CV limpa e modificada com HRP.....	24
5.1.1. Resultados para avaliação do perfil e da repetibilidade dos resultados ciclovoltagemétricos para o eletrodo de CV em soluções de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ com pHs 5,0 e 7,0.....	24
5.1.2. Resultados para avaliação do perfil e da repetibilidade dos resultados ciclovoltagemétricos para o eletrodo de CV modificado com HRP (CV/HRP, modificação realizada por adsorção de HRP na superfície de CV (ver tópico 4.6.1)	25
5.1.3. Resultados da eletrocatalise e repetibilidade para eletrodos CV/HRP em presença de 1 mM de H ₂ O ₂ , em soluções tampões com diferentes pHs.....	27
5.2. Influência da temperatura nas respostas ciclovoltagemétricas para eletrodos de CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato com pH 5,0.....	30
5.3. Resultados dos ciclos voltagemétricos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato com pH 5,0 e temperatura aproximada de 0° Celsius.....	31
5.4. Influência de cálcio exógeno (1 mM de CaCl₂) nas respostas ciclovoltagemétricas para eletrodos de CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato com pH 5,0.....	33
5.5. Resultados ciclovoltagemétricos para eletrodos de CV/HRP em presença de 0,1mol L⁻¹ de tampão fosfato com pH 5,0 em presença de O₂.....	38
5.6. Avaliação do perfil ciclovoltagemétrico e hidrodinâmico da superfície de CV/HRP-PM/Nafion.....	39
5.6.1. Resultados ciclovoltagemétricos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 0,1 mol L ⁻¹ de solução tampão fosfato com pH 5,0.....	40

5.6.2. Resultados da eletrocatalise para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H ₂ O ₂ e em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato com pH 5,0.....	41
5.6.3. Resultados da eletrocatalise para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de O ₂ e em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato com pH 5.....	43
5.7. Resultados dos ciclos voltamétricos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion apenas e em presença de 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato com pH 5,0 contendo hora 1 mM de.....	45
5.8. Avaliação de algumas dependências eletroquímicas a partir dos perfis ciclovolamétricos e de varredura linear de potencial hidrodinâmico da superfície de CV/HRP-PM/Nafion e CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato com pH 5,0, na presença ou ausência de 1 mM de H₂O₂, ou na presença ou ausência de O₂.....	47
5.9. Resultados dos experimentos de EIE para a superfície de CV/HRP-PM/Nafion e CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de solução tampão fosfato com pH 5,0, e contendo 1 mM de K₃Fe(CN)₆, ou 1 mM de H₂O₂, ou em presença de O₂	50
5.10. Uso do eletrodo de CV para estudos de adsorção de HRP.....	57
6. CONCLUSÕES.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	61
Apêndice.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% = porcentagem

(Ag/AgCl) = eletrodo de prata/cloreto de prata

(*pI*) = ponto isoelétrico

“a” = plano hexagonal

“c” = plano de borda

μA = microampère

μF = microfaraday

μg = micrograma

μm = micrometro

μM = micromolar

A = ampère

Å = angstron

A = área geométrica

ABTS = 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

APX = ascorbato peroxidase

ARP = peroxidase de *Arthromyces ramosus*

Au = ouro

BPPG = eletrodo de grafite de plano basal

bpy = bipyridina

C = concentração

CcP = citocromo c peroxidase

C_{dl} = capacitância da dupla camada

CiP = *Coprinus cinereus*

cm = centímetro

cm⁻² = centímetro quadrado

CMF = microfibras de carbono

CNT = nanotubo de carbono

cpd I = composto I

cpd II = composto II

cpd III = composto III

CV = carbono vítreo
 d_{002} = espaçamento interplanar
DET = direct electron transfer
DLC = carbono tipo diamante
DMF = dimetilformamida
DMPC = dimiristoilfosfatidilcolina
DMSO = dimetilsulfóxido
 e^- = elétron
E = potencial
 $E_{p/2}$ = potencial a meio pico
ECS = eletrodo de calomelano saturado
EIE = espectroscopia de impedância eletrônica
ENH = eletrodo normal de hidrogênio
 $E^{o'}$ = potencial de redução formal
 E_{pa} = potencial de pico anódico
 E_{pc} = potencial de pico catódico
EPPG = eletrodo de grafite de plano de borda
ET = electron transfer
F = constante de Faraday
g = grama
GOx = glucose oxidase
h = horas
 H_2O = água
 H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
 H_2SO_4 = ácido sulfúrico
HOPG = grafite pirolítico altamente ordenado
HRP = horseradish peroxidase
I = corrente
 i_0 = corrente de troca
 I_A = corrente de Levich
 I_l = corrente limite
 I_{pa} = corrente de pico anódica
 I_{pc} = corrente de pico catódica
ITO = eletrodo de óxido de índio dopado com estanho

k^0 = constante de velocidade heterogênea padrão

k_{app}^0 = constante de velocidade heterogênea padrão aparente

KatG = catalase-peroxidase bacteriana

KCl = cloreto de potássio

kDa = quilodalton

kHz = kiloHertz

k_s = constante de velocidade

L_a = tamanho do cristalino no plano

L_c = comprimento do cristalino perpendicularmente

LiP = lignina peroxidase

m/v = massa/volume

$M^{-1}s^{-1}$ = molaridade por segundo

mF = milifaraday

mg = miligrama

$mg\ ml^{-1}$ = miligrama por mililitro

min = minuto

mL = mililitro

mm = milímetro

mM = milimolar

MnP = manganês-peroxidase

mV = milivolt

$mV.s^{-1}$ = milivolt por segundo

n = número de elétrons

N_2 = gás nitrogênio

nm = nanometro

O_2 = gás oxigênio

$^{\circ}C$ = graus Celcius

OCP = potencial de circuito aberto

PBS = tampão fosfato

PG = grafite pirolítico

PGE = grafite pirolítico de borda

pH = potencial hidrogeniônico

PHA = ácido hexanóico pireno

pKa = constante de dissociação

PLL = poli-L-lisina
PM = polimixina
py = piridina
Q = quantidade de carga
 Q_{dl} = elemento de fase constante
R = constante universal dos gases
 R_{ct} = resistência a transferência de carga
Refs. = referências
RMN = ressonância magnética nuclear
rpm = rotações por minuto
RRO = região de redução do oxigênio
 R_s = resistência da solução
ET = electron transfer
 s^{-1} = segundo
SHE = eletrodo padrão de hidrogênio
SPE = eletrodo serigrafado de carbono
STM = microscopia de varredura de transmissão
T = temperatura
TBMPC = cloreto de tributilmetil fosfônio
TRIS = tris(hidroximetil) amino metano
V = volt
v/v = volume por volume
VC = voltametria cíclica
vs. = versus
 W_{lf} = impedância de Warburg
 Z' = impedância real
 Z'' = impedância imaginária
 Γ = concentração superficial
 ΔA = variação de absorbância
 μL = microlitro
 v = velocidade de varredura
 ω = velocidade de rotação

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da catálise enzimática homogênea e da bioeletrocatalálise heterogênea baseada em ET-direta com a enzima redox imobilizada na superfície do eletrodo [1]. (S = substrato, P = Produto, S[•] = substrato (mediador) e P[•] = produto (mediador)).....01
- Figura 2:** Apresentação esquemática dos ciclos bioeletrocatalíticos para peroxidase.....02
- Figura 3:** Ciclo catalítico para heme peroxidases.....05
- Figura 4:** Exemplos de óxidos superficiais que podem ocorrer na superfície de grafite de plano de borda ou em folhas de grafeno em materiais de carbono desordenados sp².....16
- Figura 5:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 24
- Figura 6:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 25
- Figura 7:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 26
- Figura 8:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 26
- Figura 9:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para quatro experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 28
- Figura 10:** Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 6,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para quatro experimentos realizados

em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	28
Figura 11: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em diferentes tampões com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	29
Figura 12: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em diferentes temperaturas da solução, para seis experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	30
Figura 13: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	32
Figura 14: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	32
Figura 15: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	35
Figura 16: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	36
Figura 17: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	36
Figura 18: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 e 1 mM de H_2O_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	37
Figura 19: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença ou ausência de O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	38
Figura 20: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$	40

- Figura 21:** Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV, CV/HRP, CV/Nafion, CV/PM, CV/HRP/Nafion, CV/HRP-PM, CV/PM/Nafion e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 41
- Figura 22:** Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 42
- Figura 23:** Voltamogramas hidrodinâmicos (1/2 ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $\omega = 400 \text{ rpm}$43
- Figura 24:** Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, em presença ou ausência O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 43
- Figura 25:** Voltamogramas hidrodinâmicos (1/2 ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, em presença ou ausência O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $\omega = 400 \text{ rpm}$44
- Figura 26:** Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 45
- Figura 27:** Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 contendo 1 mM de H₂O₂, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 46
- Figura 28:** Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, saturado com O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$ 46
- Figura 29:** Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Figura inserida: I_{pa} e I_{pc} vs. v48
- Figura 30:** Varreduras lineares de potencial hidrodinâmico para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em presença ou ausência de 1 mM de H₂O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Figura inserida: Γ^1 vs. $\omega^{-1/2}$ para diferentes potenciais.....49

Figura 31: Varreduras lineares de potencial hidrodinâmico para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂ ou O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Figura inserida: I⁻¹ vs. ω^{-1/2} para diferentes potenciais.....49

Figura 32: Gráfico de planos de impedância para: CV (□), CV/HRP (○), CV/HRP-PM/Nafion (△), CV após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (▽), CV/HRP após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (ver figura 12) (◇), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (ver figura 24) (◊), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 contendo 1 mM de K₃Fe(CN)₆, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Potencial de perturbação: 25 mV (rms). Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. Potencial constante para a aquisição dos EIE: OCP vs. ECS. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})], ou R_s[Q_{dl}(R_{ct}Q_{lf})]. Valores médios para: R_s = 127 Ω, Q_{dl} = 6,2 μF sⁿ⁻¹, n = 0,84, W_{lf} = 410 μF.....52

Figura 33: Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em presença ou ausência de 1 mM de K₃Fe(CN)₆, e em temperatura aproximada de 0 °C. v = 50 mV s⁻¹.....52

Figura 34: Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em presença ou ausência de 1 mM de K₃Fe(CN)₆, e em temperatura aproximada de 0 °C. v = 100 mV s⁻¹.....53

Figura 35: Gráfico de planos de impedância para: CV (□), CV/HRP-PM/Nafion (○), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (△), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 contendo 1 mM de H₂O₂, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Potencial de perturbação: 25 mV (rms). Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. Potencial constante para a aquisição dos EIE: -0,35 V vs. ECS. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]. Valores médios para: R_s = 109 Ω, Q_{dl} = 14 μF sⁿ⁻¹, n = 0,81, W_{lf} = 61 μF.....53

Figura 36: Gráfico de planos de impedância para: CV (□), CV/HRP-PM/Nafion (○), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (△), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Potencial de perturbação: 25 mV (rms). Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. Potencial constante para a aquisição dos EIE: -0,33 V vs. ECS. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]. Valores médios para: R_s = 106 Ω, Q_{dl} = 11,7 μF sⁿ⁻¹, n = 0,84, W_{lf} = 877 μF.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades de vários materiais de carbono.....	18
---	----

RESUMO

Dado que, para o nosso conhecimento, encontramos apenas uma referência onde foi abordada a adsorção de HRP (peroxidase de raiz forte) em superfície de CV (carbono vítreo) a partir de solução da HRP em dimetilsulfóxido e formamida, e que a maioria dos outros estudos é realizada em superfície de carbono, grafite, e principalmente grafite pirolítico com borda (PGE), onde se encontra na literatura que este seria o material mais promissor para estudos de voltametria de filmes de proteínas, resolvemos investigar a adsorção de HRP comercial em superfície de CV a partir de soluções aquosas em diferentes pHs tentando identificar a ocorrência de DET e a possibilidade de bioeletrocatalise para H_2O_2 e O_2 , com a principal idéia de uso de HRP em eletrodos de células a combustível enzimáticas, e para isso traçamos os seguintes objetivos: adsorver HRP em CV e verificar a ocorrência (ou não) de DET, via repetibilidade de experimentos; identificar e determinar a magnitude do potencial formal da heme $\text{Fe}_{\text{III}}/\text{Fe}_{\text{II}}$ na HRP adsorvida em CV bem como, verificar a ocorrência de algum outro comportamento voltamétrico relacionado, por exemplo, aos pares cpd I/ Fe^{3+} , cpd I/cpd II e cpd II/ Fe^{3+} ; construir eletrodos de CV recobertos com filmes de HRP em presença de polimixina (a ligação de proteínas com superfícies carregadas negativamente é bastante reforçada pela presença de poliaminas, tais como neomicina ou polimixina (PM)), e adicionalmente recobertos por Nafion (eletrodos nomeados como CV/HRP-PM/Nafion); verificar a bioeletrocatalise da HRP, diretamente adsorvida em CV ou adsorvida nos eletrodos CV/HRP-PM/Nafion, para H_2O_2 e O_2 ; discutir o mecanismo de DET à luz das propriedades do CV em comparação com o PEG; e discutir o mecanismo de DET à luz da HRP em solução e adsorvida em superfície eletródica. Esses objetivos foram alcançados usando-se as técnicas de voltametria cíclica (VC), varredura linear de potencial hidrodinâmica, e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Obtivemos assim, no nosso presente trabalho, evidências que: a HRP adsorve efetivamente em superfície de CV a partir de soluções aquosas tamponadas e apresenta DET com repetibilidade experimental; as melhores respostas eletroquímicas para HRP adsorvida em CV ocorrem em temperaturas próximas a 0°C e tampão com pH 5; a HRP é bioeletrocatalítica para a redução de H_2O_2 e essa bioeletrocatalise é melhorada (parcialmente) pela presença de CaCl_2 – essa melhoria deve-se a uma diminuição, durante um intervalo de tempo, da mudança conformacional da HRP devido a presença de CaCl_2 ; a adição de polimixina reforça sobremaneira a adsorção de HRP em CV e

atua como “polímero” para estabilizar a conformação da mesma – o recobrimento desse filme com uma película de Nafion atua como estabilizador adicional da conformação ativa da HRP; o potencial formal encontrado no presente trabalho para o par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ foi de aproximadamente $-0,217$ V vs. ECS e ele está próximo aos valores reportados na literatura – não encontramos nenhuma resposta voltamétrica relacionada, por exemplo, aos pares redox cpd I/ Fe^{3+} , cpd I/cpd II ou cpd II/ Fe^{3+} , diferentemente de outros autores; o eletrodo modificado de CV/HRP-PM/Nafion apresentou-se bem mais bioeletrocatalítico para O_2 do que para H_2O_2 – esse mesmo eletrodo quando ciclado inúmeras vezes permanece bioeletrocatalítico tanto para O_2 (melhor bioeletrocatalisador) como para H_2O_2 ; em um cálculo grosseiro e aproximado, encontramos valores de k_{app}° de $3,4 \times 10^{-6}$ e $4,6 \times 10^{-6}$ cm s^{-1} , respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de H_2O_2 , enquanto que para o mesmo tipo de eletrodo em presença de O_2 , encontramos os valores de $5,3 \times 10^{-6}$ e $6,5 \times 10^{-6}$ cm s^{-1} , respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, reforçando uma forte dependência da cinética da HRP confinada na superfície do eletrodo, no entanto, mais efetiva para a redução de O_2 em comparação com H_2O_2 ; e o comportamento “promissor” de PGE em detrimento ao CV deve-se muito mais, em nossa visão, a espaços vazios onde a enzima acaba sendo “confinada” e não propriamente adsorvida, comportando-se assim muito mais como uma enzima em solução, o que pode dificultar sobremaneira o uso da HRP como bioeletrocatalisador em células a combustível enzimáticas ou em sensores.

ABSTRACT

Since, to our knowledge, we found only one reference which dealt with the adsorption of HRP on the surface of CV from the HRP solution in DMSO and formamide, and most other studies is performed on the surface of carbon, graphite, and especially with pyrolytic graphite edge (PGE), where is in literature that this would be the most promising material for studies of protein film voltammetry, we decided to investigate the adsorption of commercial HRP on the surface of CV from aqueous solutions at different pHs trying to identify the occurrence of DET and the possibility of bioelectrocatalysis to H_2O_2 and O_2 , with the main idea of using HRP electrodes in fuel cell enzyme, and for that we establish the following goals: to adsorb HRP in CV and verify the occurrence (or not) of DET via repeatability of experiments; to identify and determine the magnitude of the formal potential of heme $\text{Fe}_{\text{III}}/\text{Fe}_{\text{II}}$ adsorbed on HRP in CV and to verify the occurrence of some other voltammetric behavior related, for example, with redox couples of cpd I/ Fe^{3+} , cpd I/cpd II and cpd II/ Fe^{3+} ; build CV electrodes coated with films of HRP in the presence of polymyxin (binding protein with negatively charged surfaces is greatly enhanced by the presence of polyamines, such as neomycin or polymyxin (PM)), and additionally covered by Nafion (electrodes named as CV/PM-HRP/Nafion); check HRP bioelectrocatalysis directly adsorbed on the electrodes or adsorbed on CV as CV/PM-HRP/Nafion to H_2O_2 and O_2 ; to discuss the mechanism of DET in light of the properties of CV in comparison with PEG; and discuss the mechanism of DET in the light of HRP in solution or adsorbed on the electrode surface. These objectives were achieved by using the cyclic voltammetry (CV), hydrodynamic linear sweep of potential and electrochemical impedance spectroscopy (EIS). We thus, in our present work, evidence that: HRP adsorbs effectively on the surface of CV from aqueous solutions buffered and presents DET with experimental repeatability; the best electrochemical response for HRP adsorbed in CV occurs at temperatures around 0°C and buffer pH 5; HRP is bioelectrocatalyst to reduce H_2O_2 and this bioelectrocatalysis is improved (partially) by the presence of CaCl_2 - this improvement is due to a decrease during a time interval, of HRP conformational change; the addition of polymyxin greatly enhances the adsorption of HRP in CV and acts as a "polymer" to stabilize the conformation of the same - the coating with a Nafion film acts as an additional stabilizer of active conformation of HRP; the formal potential found in this study for the redox couple of $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ was approximately -0.217 V vs. ECS and it is near the values

reported in the literature - no additional voltammetric response is related, for example, to the redox couples cpd I/Fe³⁺, cpd I/cpd II or cpd II/Fe³⁺, unlike found by other authors; the modified electrode CV/HRP-PM/Nafion presented much more bioelectrocatalyst for O₂ than to H₂O₂ - the same electrode when cycled repeatedly remains bioelectrocatalyst for both O₂ (better bioelectrocatalyst) and H₂O₂; in a rough and approximate calculation, we find values for k_{app}° of 3.4×10^{-6} and 4.6×10^{-6} cm s⁻¹, respectively before and after several voltammetric cycles, for the CV/PM-HRP/Nafion electrode in the presence of H₂O₂, while for the same type of electrode in the presence of O₂, we find the values of 5.3×10^{-6} and 6.5×10^{-6} cm s⁻¹, respectively before and after several voltammetric cycles, reinforcing a strong dependence of the kinetics of HRP confined to the electrode surface, however, more effective for the reduction of O₂ in comparison with H₂O₂; and "promising" behavior to PGE in detriment of CV should be much more, in our view point, due to the empty spaces present in PGE where the enzyme ends up being "confined" and not specifically adsorbed, thus behaving more like an enzyme in solution, which can greatly hinder the use of HRP as bioelectrocatalyst in enzymatic fuel cells or sensors.

1. INTRODUÇÃO

A eletroquímica direta de metaloenzimas tem despertado enorme interesse, tanto para estudos fundamentais de transferência de elétrons (em inglês, ET) em proteínas como para o desenvolvimento de bioeletrocatalisadores altamente seletivos operando sob condições moderadas de reação [1 e refs. dela]. Um dos principais requisitos para esse tipo de pesquisa é a imobilização de enzimas redox com a conservação de sua estabilidade e atividade no estado heterogêneo, na superfície do eletrodo. A imobilização pode então fornecer eficiente bioeletrocatalise direta resultante de direta ET (em inglês, DET) entre o eletrodo e o sítio ativo da enzima (figura 1).

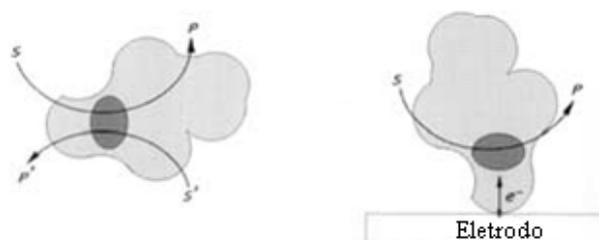


Figura 01: Representação esquemática da catálise enzimática homogênea e da bioeletrocatalise heterogênea baseada em ET-direta com a enzima redox imobilizada na superfície do eletrodo [1]. (S = substrato, P = Produto, S* = substrato (mediador) e P* = produto (mediador)).

Na ausência de qualquer molécula mediadora redox capaz de transportar elétrons entre o eletrodo e a enzima (bioeletrocatalise mediada), a atividade redox da enzima imobilizada pode ser correlacionada com as relações estrutura-função específicas entre a estrutura molecular 3D da enzima e a morfologia da superfície do eletrodo, que são importantes de serem reveladas [1].

A peroxidase pode ser encarada como uma enzima modelo para estes estudos, uma vez que depende da atividade da heme [1-3]. Muitas enzimas para as quais a DET com eletrodos foi demonstrada são também heme contendo mais de uma estrutura complexa [1 e refs. dela]. Peroxidases catalisam a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou compostos relacionados. A característica comum de todas as peroxidases heme é que seus sítios ativos contêm grupos prostéticos muito semelhantes. Para a maioria das peroxidases conhecidas de plantas elas são uma heme *b*, ou ferriprotoporfirina IX [1,2]. Peroxidase de raiz-forte ou rábano-silvestre (em inglês, horseradish peroxidase (HRP)) é

um dos membros mais estudados dessa família de enzimas heme [1,2]. Ela possui dois íons de cálcio e quatro pontes dissulfeto; a glicosilação de HRP está perto de 18% [1 e ref. dela]. Existem várias isoenzimas de HRP na natureza, no entanto, a forma dominante, geralmente presentes em formulações comerciais, é uma forma neutra, designada como isoenzima C, com ponto isoeleétrico (pI) de 8,8 e um peso molecular de aproximadamente 42 kDa [1,2].

Quando imobilizada na superfície do eletrodo, a HRP pode apresentar uma actividade bioeletrocatalítica notável devido à DET entre o eletrodo e o heme da HRP [1 e refs. dela].

1.1. Ciclos bioeletrocatalíticos da peroxidase

O ciclo básico bioeletrocatalítico da peroxidase envolve a oxidação da HRP inicial por H_2O_2 ao composto I (cpd I, representa uma forma oxidada da HRP e consiste de ferro oxiferril ($Fe^{4+}=O$) e um cátion radical porfirina π), e ainda a eletrorredução direta envolvendo $2e^-/2H^+$ do cpd I na superfície do eletrodo para o estado inicial da HRP, ferriperoxidase (figura 02, zona clara) [1]. Este eletrorredução direta de cpd I, quando o eletrodo funciona como um substrato doador de elétrons, é considerado como DET e é caracterizada por uma constante de velocidade de ET heterogênea, k_s [1 e ref. dela]. No caso da bioeletrocatalise mediada a enzima oxidada é reduzida pelo doador de elétrons S, que é posteriormente re-reduzida no eletrodo [1 e refs. dela]. A redução do cpd I para ferriperoxidase pode ocorrer na realidade via a formação de composto intermediário II (cpd II, contém um próton adicional em comparação com a forma nativa e cpd I) e, em seguida, gradualmente para o estado ferriperoxidase inicial, como no caso da catálise homogênea envolvendo peroxidase [1,2].

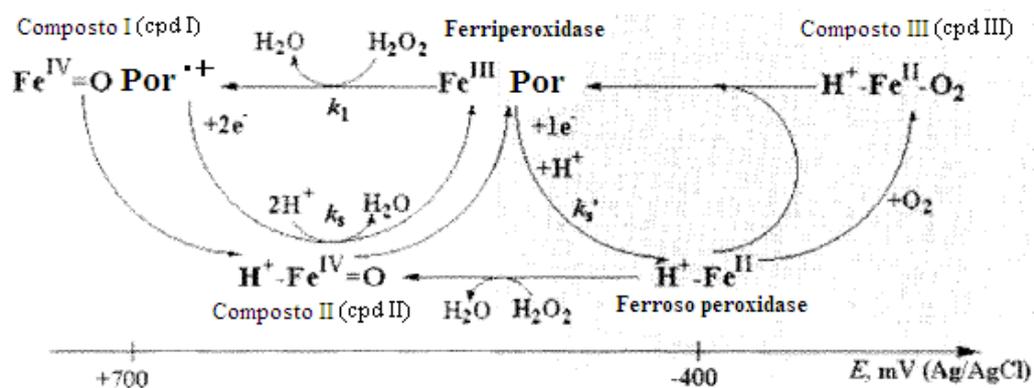


Figura 02: Apresentação esquemática dos ciclos bioeletrocatalíticos para peroxidase [1].

Os potenciais de redução para os pares redox cpd I/cpd II e cpd II/HRP(Fe(III)) determinados por titulação espectroeletróquímica com mediadores têm valores muito semelhantes em soluções ácida e neutra e aproximam-se de 700 e 680 mV (Ag/AgCl), respectivamente, em pH 7,0 e força iônica de 0,1 [1 e refs. dela]. Esses potenciais redox são dependentes do pH e deslocam-se para valores mais positivos com a diminuição do pH, correspondentemente para 790 e 770 mV em pH 6,0 [1 e ref. dela].

Outra interconversão redox de HRP férrica nativa é a sua transformação envolvendo $1e^-$ à enzima ferrosa, que envolve também a protonação da forma reduzida Fe(II) (figura 02, zona cinza). Por este meio, ferriperoxidase pode ser diretamente reduzida na superfície do eletrodo para o estado ferroso. O potencial de redução formal E° para o par Fe (III/II) da HRP é -467 mV (Ag/AgCl) em pH 7,0 e -417 mV em pH 6,0, respectivamente [1 e refs. dela]. Semelhante a outras peroxidases de plantas, os valores de E° para o par Fe (III/II) da HRP são dependentes do pH [1,2] visto que o processo redox envolve uma transferência de um próton. A enzima ferrosa tem um valor de pK_a de 7,17, e seu próton adicional é perdido em soluções básicas [1,2]. A forma ferrosa da HRP (mas não ferriperoxidase) é capaz de se ligar a oxigênio molecular, o que resulta na formação do composto III (cpd III, uma forma de ferrosa de HRP, contém um próton adicional, em comparação com a enzima nativa, e oxigênio molecular). Assim, a HRP ferrosa, cpd II e cpd III têm um próton adicional em comparação com a forma ferriperoxidase nativa e cpd I. Esse próton é susceptível a estar localizado no sítio ativo em um resíduo de aminoácido distal, e a localização desse sítio ativo pode desempenhar um papel catalisador importante [1,2].

Além da bioeletrocatalise para a redução de H_2O_2 , que pode ocorrer via o ciclo catalítico básico da HRP (figura 02, zona branca), a possibilidade de uma redução bioeletrocatalítica de O_2 molecular e H_2O_2 molecular em potenciais de transformação de Fe (III/II) da peroxidase deve ser considerada (figura 02, zona cinza). Isso pode ocorrer tanto a partir da reação entre a HRP ferrosa e cpd III ou pela reação da enzima ferrosa com H_2O_2 [1,2] (figura 02, zona cinza). Por um lado, a reação entre a peroxidase ferrosa e oxigênio ligado em cpd III produz ferriperoxidase original, que pode ser sucessivamente re-reduzida na superfície do eletrodo de volta para a forma ferrosa. Por outro lado, a enzima ferrosa é convertida para cpd II por reação com H_2O_2 com uma constante de velocidade de $10^5 M^{-1} s^{-1}$, e cpd II ainda pode ser eletroquimicamente reduzido ao estado inicial de peroxidase [1 e ref. dela]. Na presença de um grande excesso de peróxido, cpd II é convertido em cpd III [1 e ref. dela]. Essas não são todas as transformações possíveis de

peroxidase redox [1,3], mas aqueles que são essenciais para a interpretação da bioeletrocatalise por peroxidase (figura 02).

1.2. Propriedades redox de heme peroxidases

As peroxidases de fungos, plantas e bactérias são classificados em três classes, com base na similaridade de seqüência [4 e refs. dela]. A Classe I é formada por peroxidases intracelulares e inclui o citocromo c peroxidase de levedura (em inglês CcP, uma proteína mitocondrial solúvel, que exerce uma função protetora contra os peróxidos tóxicos [4 e refs. dela]), ascorbato peroxidase (em inglês, APX, que remove peróxido de hidrogênio em cloroplastos e citosol em plantas superiores [4 e refs. dela]) e catalase-peroxidase bacteriana (em inglês, KatG, que apresenta atividade tanto para peroxidase como catalase [4 e refs. dela]). Essas proteínas não são glicosiladas e não contém pontes dissulfeto ou íons de cálcio.

As peroxidases fúngicas secretoras formam a Classe II. Os membros mais estudados dessa classe são as ligninas peroxidases (em inglês, LiP) e peroxidases dependentes de manganês (em inglês, MnP), ambos das quais estão envolvidas na degradação oxidativa de lignina, e a peroxidase de *Arthromyces ramosus* (também conhecida como *Coprinus cinereus*, em inglês, ARP ou CiP) [4 e refs. dela]. Essas peroxidases são glicoproteínas monoméricas, com quatro pontes dissulfeto conservadas e dois sítios de cálcio ligados conservados [4 e ref. dela]. A Classe III inclui as peroxidases de plantas secretoras, tais como HRP-C. Essas enzimas são glicoproteínas monoméricas, contendo dois íons de cálcio e quatro pontes dissulfeto conservadas, cuja posição é diferente da observada nas enzimas da classe II [4 e refs. dela]. As peroxidases da Classe III estão envolvidos em diferentes funções tecido-específicas, tais como a remoção de H₂O₂ a partir de cloroplastos e citosol, a oxidação de compostos tóxicos, a biosíntese de paredes celulares, a defesa contra feridas, e o catabolismo do ácido indol-3-acético [4 e refs. dela].

Apesar das heme peroxidases apresentarem diferentes especificidades para os substratos oxidáveis, os quais incluem indóis, fenóis, aminas aromáticas, lignina, íons Mn⁺², íons haletos e outras proteínas, como o citocromo c, elas compartilham o mesmo ciclo catalítico (figura 03), com base em três etapas redox consecutivas [4 e refs. dela]. Na primeira, a enzima reage com uma molécula de H₂O₂ em um processo de oxidação/redução envolvendo dois elétrons, onde o peróxido de hidrogênio é reduzido à água e a enzima é oxidada ao cpd I, que contém um centro oxiferril (Fe (IV) = O) e um cátion radical orgânico localizado na heme (cátion radical porfirina

π), ou, como foi observado apenas em CcP, em um resíduo de triptofano. O cátion radical, em seguida, passa por uma redução de um elétron, oxidando uma molécula de substrato, formando cpd II, que mantém o centro oxiferril. Finalmente, cpd II é reduzido para o estado de repouso de ferro (ferriperoxidase) com a oxidação concomitante, envolvendo um elétron, de uma segunda molécula do substrato [4 e refs. dela], em um processo que é a etapa determinante da velocidade [4 e refs. dela].

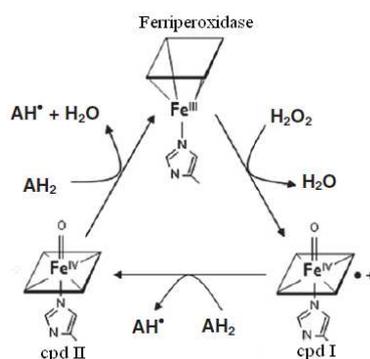


Figura 03: Ciclo catalítico para heme peroxidases.[4]

Os potenciais de redução dos três pares redox das proteínas envolvidas nas etapas anteriores, ou seja, cpd I/ Fe^{3+} , cpd I/cpd II e cpd II/ Fe^{3+} , influenciam sobremaneira a termodinâmica e a cinética do ciclo catalítico [4 e refs. dela]. De fato, o poder oxidativo das heme peroxidases depende do potencial de redução (elevado) dos últimos dois pares, os quais, portanto, controlam os substratos oxidáveis por enzimas individuais [4 e refs. dela]. Por isso, é provável que os valores de $E^{\circ}_{\text{cpd I}/\text{Fe}^{3+}}$, $E^{\circ}_{\text{cpd I}/\text{cpd II}}$ e $E^{\circ}_{\text{cpd II}/\text{Fe}^{3+}}$ apresentados por diferentes heme peroxidases são adaptados para as suas atividades catalíticas [4 e refs. dela]. A “afinação” delas pode permitir uma maior especificidade na resposta, bem como para um aumento na eficiência de transferência eletrônica [4 e refs. dela]. A funcionalidade de peroxidases *in vivo* é influenciada também pelo comportamento de oxidação do par redox heme $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, embora isso não esteja diretamente envolvida no ciclo catalítico. De fato, a rápida oxidação mediada de dois elétrons para H_2O_2 , a partir das peroxidases, resultando no cpd I requer um estado férrico estável em condições fisiológicas, o que depende do potencial de redução do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ [4 e refs. dela].

1.2.1. Propriedades do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$

Embora não diretamente envolvidos no ciclo catalítico, o comportamento do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em peroxidases tem sido analisado em maior detalhe do que os pares redox de elevados potenciais, cujos potenciais de redução são bem mais difíceis de medir experimentalmente, e há um consenso geral de que os fatores moleculares que determinam os valores $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ influenciam também os pares redox cataliticamente relevantes [4 e refs. dela].

Os valores de E° do par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ em heme peroxidases nativas e do tipo selvagem recombinante [4 e refs. dela] são apresentados na Tabela 1 da referência 4. A variabilidade dos valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ obtidos para a mesma proteína são, pelo menos em parte, uma consequência das diferentes técnicas empregadas e das condições experimentais em que as medições foram realizadas [4]. Em particular, alguns procedimentos utilizados para imobilizar as proteínas na superfície do eletrodo parecem influenciar significativamente os valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ de forma dependente da proteína (Tabela 1 da referência 4), conforme relatado para ET de metaloproteínas [4 e refs. dela]. Com a importante exceção da mieloperoxidase humana, cujas propriedades redoxes são profundamente influenciadas pela sua peculiar ligação heme íon sulfônico à proteína, em todas as heme peroxidases o par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ apresenta potenciais de redução negativos, o que garante que a forma de Fe^{2+} é estável em condições fisiológicas. Esse é o pré-requisito chave para a funcionalidade dessas enzimas *in vivo*, já que apenas a forma de Fe^{+3} pode se oxidada eficientemente por H_2O_2 para cpd I [4 e refs. dela]. No entanto, os valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ exibem uma variabilidade considerável, variando entre $-0,028$ ($-0,060$) V para *Mycobacterium tuberculosis* KatG e $-0,320$ V para uma peroxidase da Classe III isolada de cascas de pepino (Tabela 1 da referência 4). Esses potenciais são referenciados versus um eletrodo padrão de hidrogênio (em inglês, SHE). Isso indica que a proteína matriz desempenha um papel significativo no ajuste fino das propriedades redox do grupo heme, contribuindo assim para a especificidade catalítica das proteínas. Em particular, é digno de nota que as lignina e Mn-peroxidases, assim como peroxidases humanas, as quais oxidam os substratos com maior potencial de redução (álcool veratril, íons Mn^{2+} e haletos, respectivamente [4 e refs. dela]), são as que apresentam os maiores valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$. Os dados disponíveis indicam que o $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ em peroxidases, assim como em outras proteínas heme com diferentes funções [$E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$], é controlado principalmente pelas propriedades doadoras dos ligantes axiais de ferro, pela polaridade do ambiente da proteína e pelas interações eletrostáticas entre o centro redox e os resíduos polares e carregados, e o solvente [4].

1.3. Peroxidases pertencentes à superfamília de plantas, fungos e bactérias

As peroxidases da superfamília de plantas e globinas compartilham a mesma coordenação no ferro heme, com um Fe^{+3} coordenado cinco vezes, cuja posição da coordenação axial é ocupada pelo N ϵ imidazole da histidina proximal. Essas proteínas têm valores negativos (peroxidases) e positivos (globinas) de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ (Tabela 1 da referência 4) [4 e refs. dela]. Na última família, os potenciais de redução positivos são necessários para estabilizar a forma de O_2 ligada a Fe^{+2} sob condições fisiológicas [4 e refs. dela]. As propriedades doadoras de elétrons da histidina proximal têm sido sugeridas para contribuir significativamente para as diferenças de comportamento redox descritas acima [4 e refs. dela]. De fato, em globinas, o imidazol N δ da histidina axial é fracamente H ligado a um grupo carbonila da cadeia principal [4 e refs. dela], enquanto que em peroxidases ela forma uma forte ligação H com o carboxilato da cadeia lateral do aspartato evolutivamente conservado [4 e refs. dela]. Daí resulta que na primeira classe de proteínas o anel imidazol é neutro, enquanto nas peroxidases possui um caráter aniônico, o qual é modulada pela força de interação do H-ligado com o resíduo Asp adjacente [4 e refs. dela]. Acredita-se que esse recurso contribui significativamente para o potencial de redução negativo do heme Fe^{+3} em peroxidases, uma vez que um ligante forte axial tendo uma carga (parcial) negativa seletivamente estabiliza o ferro sobre a forma ferrosa da heme [4 e refs. dela]. Esse efeito tem sido proposto como fundamental também para a estabilização dos elevados estados de oxidação, caracterizado pelo ferro heme no cpd I e cpd II [4 e refs. dela]. De acordo com a hipótese acima, as diferenças nas propriedades elétron doadoras da histidina proximal, que depende do caráter aniônico de seu anel imidazol e na interação do H-ligado com o carboxilato da cadeia lateral do aspartato vizinho, têm sido propostas para contribuir significativamente para a variabilidade entre os $E^{\circ}_{\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}}$ de peroxidases de plantas nativas [4 e refs. dela].

De forma geral, dados de Ressonância Raman e RMN (ressonância magnética nuclear) demonstram que os menores valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}}$ estão associados com a aumentada doação de elétrons pela histidina proximal para o átomo de ferro, de acordo com a hipótese de que um maior caráter de imidazolato seletivamente estabiliza a forma de ferro [4 e refs. dela]. Adicionalmente, confirmaram que os potenciais de redução do grupo heme são influenciados por fatores adicionais, incluindo as propriedades eletrostáticas e de solvatação do ambiente heme [4].

A hidroflicidade do sítio heme distal é comum a todos os tipos de peroxidases de planta [4 e refs. dela] e depende da presença de histidina distal conservada e arginina. Esses resíduos

participam de uma extensa rede de ligações de hidrogênio conectando os sítios proximal e distal da heme, que também envolve um conjunto de moléculas de água conservado, os propionatos heme e um resíduo conservado hidrofílico próximo ao lado da heme exposta ao solvente [4 e refs. dela]. Todas as estruturas de raios-X de tipos de peroxidases de plantas mostram quatro ou mais moléculas de água ordenadas no sítio heme ativo [4 e refs. dela]. Pelo menos três delas estão localizados na cavidade distal, enquanto que uma molécula se encontra no lado proximal, H-ligado ao Asp proximal. A polaridade do sítio heme distal distingue peroxidases de globinas, que possuem uma histidina distal também, mas são caracterizadas por uma cavidade hidrofóbica [4 e refs. dela]. O ambiente polar da heme em peroxidases contribui também para os valores negativos de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$, uma vez que ele estabiliza eletrostaticamente o heme férrico, que tem um carga global de +1, em relação à forma ferrosa neutra [4 e refs. dela].

1.4. Alguns valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ para HRP-C obtidos de resultados voltamétricos

Zhang *et al.* [5] estudaram filmes de dimiristoilfosfatidilcolina (em inglês, DMPC) e *M. tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG), diversas peroxidases, mioglobina, e catalase, e mostraram voltametrias de $\text{Fe}_{\text{III}}/\text{Fe}_{\text{II}}$ desses filmes em eletrodos de grafite pirolítico de plano basal (em inglês, PG) bem como, correntes catalíticas para peróxido de hidrogênio e oxigênio. Eles prepararam as dispersões de vesículas de DMPC por sonicação e usaram normalmente, 10 μL de 2 mM de dispersão da vesícula DMPC contendo 50-150 μg de enzima, espalhado-os uniformemente sobre PG. O eletrodo era então coberto com um pequeno frasco e seco durante a noite. Soluções de tampão fosfato de 20 mM, pH 6,0, e 25°C foram em geral usadas. O potencial formal (E°) do heme $\text{Fe}_{\text{III}}/\text{Fe}_{\text{II}}$ das enzimas nos filmes, que foi obtido como ponto médio entre os picos anódico e catódico dos voltamogramas cíclicos (VC), foi fortemente dependente do pH. Eles encontraram, por exemplo, valores de $E^{\circ}_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}}$ para a HRP-C de aproximadamente -0,26 V vs. ECS em pH 5,0 (dado obtido do Supporting Information de [5]).

Oyadomari *et al.* [6] realizaram análises eletroquímicas em um eletrodo de grafite pirolítico recoberto com lignina peroxidase (em inglês, LiP), ou manganês peroxidase (em inglês, MnP), ou HRP incorporada em uma membrana de cloreto de tributimetil fosfônio (em inglês, TBMPC), que é um polímero ligado a uma resina de troca aniônica (poliestireno reticulado com

1% de benzeno divinil), e foi preparado usando 25 ml de uma solução 0,2 mM de enzima misturada com 5 ml de 0,035% (w/v) de TBMPC em DMSO. A mistura (2 μ l) foi depositada na superfície do eletrodo de PG (3 mm de diâmetro). O eletrodo de PG modificado foi seco sob pressão reduzida antes do uso. O potencial redox formal encontrado para a HRP foi de aproximadamente $-0,28$ V vs. ECS em pH 5 (dado obtido da figura 2 de [6], 0,1 M de malonato de sódio).

Ferri *et al.* [7] relatam o comportamento eletroquímico, em relação à conversão de Fe(III)/Fe(II), de HRP aprisionada dentro de uma matriz sólida de TBMPC, em um eletrodo de PG. O método de preparação dos eletrodos de Oyadomari *et al.* [6] é baseado no método descrito por Ferri *et al.* [7]. Ferri *et al.* [7] também realizaram medidas voltamétricas em HRP aprisionada dentro de uma membrana trocadora de ânions perfluorada, Tosflex IE-48 SA, recobrando um eletrodo de PG, onde obtiveram resultados semelhantes à matriz sólida de TBMPC. Adicionalmente, o aprisionamento de HRP foi realizada a partir de um multicomponente de solventes, composto por metanol, etanol e água (em volumes iguais), e que não afetou a conformação de proteína, fato que, segundo os autores, exclui um efeito específico do DMSO sobre a proteína. Os autores sugerem que o papel fundamental desempenhado pela membrana TBMPC é: i) ela ajuda as macromoléculas a assumirem uma orientação favorável para rápida ET na ausência do fenômeno de adsorção no eletrodo, típico de proteínas solúveis, e ii) permite a interação favorável entre a proteína e o eletrodo, que está carregado negativamente na faixa de potencial de interesse, em uma distância reduzida para ET, sem interferir no processo [7]. O potencial redox formal obtido da figura 3A da referência [7] é aproximadamente $-0,27$ vs. ECS em pH 5,0 (tampão acetato, força iônica 0,1).

Chattopadhyay e Mazumdar [8] realizaram experimentos de voltametria cíclica em um eletrodo de vidro revestido com óxido de índio dopado com estanho (em inglês, ITO), obtendo respostas estáveis após vários ciclos e após parar o potencial em 0,90 V vs. ENH (eletrodo normal de hidrogênio) por alguns minutos, em uma solução contendo 1 μ M de HRP em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) e 200 mM de KCl. Nesse caso, eles identificaram um voltamograma cíclico quasi-reversível bem definido com um potencial positivo elevado, correspondendo a um $E_{1/2}$ de +0,70 V vs. NHE (em português, eletrodo normal de hidrogênio). As medidas do potencial redox do par Fe^{3+} - Fe^{2+} da enzima também foram realizadas via voltametria cíclica com 1 μ M de HRP em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) na presença de 100 mM de

perclorato de sódio como o contra-íon. O voltamograma cíclico do par redox no eletrodo de ITO mostrou um pico catódico por volta de $-0,70$ V e um pico anódico correspondente por volta de $-0,32$ V, com potencial de meio ponto ($E_{1/2}$) de $-0,51$ V vs ECS.

Guo e Guadalupe [9] obtiveram DET para a HRP adsorvida em eletrodo de carbono vítreo (CV) a partir de soluções de HRP-DMSO e de HRP-formamida (2 mg ml^{-1} de HRP em DMSO ou formamida (FA) puros), em 20 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0. Os eletrodos de CV foram imersos nas soluções de adsorção por 15 min e em seguida, lavados com grandes quantidades de tampão fosfato e água ultrapura. Segundo os autores os eletrodos modificados são bastante estáveis, com pouca mudança nos voltamogramas durante os ciclos voltamétricos (pouca diferença entre o primeiro e o quinquagésimo ciclo). A amplitude dos picos sugere uma distribuição de adsorbatos de HRP talvez resultante de múltiplas conformações de HRP adsorvida da solução orgânica ou energias de adsorção diferentes, e a largura total na metade do máximo (em inglês, E_{FWHM}) foi $0,175 \text{ V}$ para os eletrodos modificados em solução de HRP-DMSO. Os potenciais redoxes estiveram na faixa de $-0,3$ a $-0,42 \text{ V}$ com velocidade de varredura variando de 20 a 500 mV s^{-1} , e o potencial formal superficial [$E^\circ = (E_{pc} + E_{pa})/2$] foi de cerca de $-0,365 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, e $k_s = 0,655 \text{ s}^{-1}$. Além de DMSO, a DET para HRP foi também observada para os eletrodos modificados em solução de HRP-FA, com $E^\circ = -0,348 \text{ V}$, $E_{FWHM} = 0,190 \text{ V}$, e $k_s = 0,60 \text{ s}^{-1}$.

Dequaire *et al.* [10] usaram eletrodos serigrafados a base de carbono (em inglês, SPE) como eletrodos de trabalho descartáveis para obtenção de voltamogramas cíclicos em tampão fosfato (pH 7,4) contendo por exemplo $20 \text{ }\mu\text{M}$ de $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ e $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ de HRP. O par redox do mediador $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ apresenta-se centrado em aproximadamente $0,21 \text{ V}$ vs. ECS. Eles estudaram o mecanismo complexo de catálise e inibição envolvidos na reação de HRP com H_2O_2 como substrato e um doador de elétrons de esfera externa simples ($[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$) como co-substrato usando análise sistemática de respostas de voltametrias cíclicas em função da velocidade de varredura de potencial e das concentrações de substrato e co-substrato, complementada por experimentos espectrofotométricos de estado estacionário e fluxo interrompido. A curva de calibração em forma de sino, relativa à resposta eletroquímica para a concentração de H_2O_2 foi quantitativa e qualitativamente explicada levando em conta a conversão das formas cataliticamente ativas da enzima em oxiperoxidase inativa (cpd III), além do ciclo catalítico primário. Do ponto de vista mecanístico, as condições foram definidas de tal forma que

a inibição apresentou-se insignificante, permitindo assim uma caracterização eletroquímica do ciclo primário catalítico. Em concentrações muito baixas de H_2O_2 , a difusão dele tende a controlar a resposta eletroquímica, resultando em proporcionalidade com a concentração de H_2O_2 em vez da dependência com raiz quadrada, característica de correntes catalíticas clássicas.

Limoges *et al.* [11] após várias tentativas, concluíram que o melhor procedimento para o depósito de uma monocamada de HRP em uma superfície de um eletrodo – por exemplo SPE – permitindo um alto rendimento de imobilização da enzima dentro de um revestimento estável e altamente catalítico, seria a biotilação da superfície do eletrodo por meio de uma imunoglobulina de sacrifício biotilada, seguido pela fixação de um conjugado avidina-enzima (em inglês, IgG-b/N-HRP). A voltametria cíclica apresentou-se como um meio eficaz para analisar a redução catalítica de H_2O_2 em eletrodos de monocamada de HRP na presença de $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ (com bpy = bipyridina e py = piridina) como um co-substrato reversível envolvendo um elétron. O par redox do mediador $[\text{Os}(\text{bpy})_2\text{pyCl}]^{2+}$ apresenta-se centrado em aproximadamente 0,21 V vs. ECS. Segundo os autores as formas estranhas de respostas corrente-potencial, a variação em forma de sino incomum do pico ou patamar de corrente com a concentração do substrato (H_2O_2), e fenômenos de histerese e cruzamento de curvas, e de dependência ou falta de dependência com a velocidade de varredura, podem ser explicadas e analisadas quantitativamente no âmbito do mesmo mecanismo de catálise/inibição como foi demonstrado para os sistemas homogêneos [10], tendo em conta o transporte de massa do substrato e co-substrato. Os autores sugerem ainda que HRP permanece quase totalmente ativa, uma vez ancorada na superfície do eletrodo através da ligação avidina-biotina. Com base nesta caracterização mecanística e cinética, são discutidos os desempenhos analíticos na detecção de H_2O_2 e as aplicações amperométricas em imunossensor.

Konash e Magner [12] prepararam eletrodos modificados de CV com HRP-Eastman AQ 55 e examinaram a atividade catalítica para H_2O_2 em uma gama de solventes. A HRP foi imobilizada na superfície de eletrodos de CV por aprisionamento em Eastman AQ 55 (Nafion e Eastman pertencem à mesma classe de anionômeros poli(ácido éster sulfônico) e têm sido amplamente utilizados em estudos eletroquímicos de proteínas carregadas positivamente. Adicionalmente, Eastman AQ 55, devido à sua estrutura menos compacta, pode prender espécies com pesos moleculares de até 49 kDa e foi relatada para apresentar o mínimo inchaço e ser insolúvel em acetonitrila, onde uma alíquota da mistura de imobilização (5 μL), contendo 10%

v/v de 2-propanol, 1,6% m/v de Eastman AQ 55 e $5,43 \text{ mg mL}^{-1}$ de HRP (50 mM de tampão TRIS com pH 6,5), foi colocada na superfície do eletrodo e deixada para secar ao ar por aproximadamente 2 h. Todos os solventes testados continham 5% (miscível com água) ou quantidades saturantes de solução tampão aquosa. Como os autores não observaram DET entre a HRP e o eletrodo de trabalho em todos os solventes testados, eles usaram 1,1'-ferrocenedimetanol como mediador – um co-substrato envolvendo a transferência de um elétron de forma reversível – para facilitar a transferência de elétrons, pois segundo os autores ele é um dos mais eficazes co-substratos para HRP baseado em ferroceno. O par redox do mediador apresenta-se centrado em aproximadamente 0,38 V vs. ECS. Ao usarem ferrocenedimetanol como mediador, os eletrodos modificados apresentaram atividade catalítica em uma gama de solventes. Uma elevada atividade foi observada em 2-butanona e acetato de etila, sem nenhuma atividade observável em dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida e glicerol. A resposta catalítica dos eletrodos modificados de CV com HRP-Eastman AQ 55 mostrou uma dependência em forma de sino da máxima corrente catalítica com a concentração de peróxido em todos os solventes testados. A concentração de peróxido na qual a maior corrente catalítica foi obtida depende da concentração do mediador e variou para diferentes solventes. Para os solventes metanol, acetonitrila e 1-propanol, o aumento na hidrofobicidade do solvente resultou em uma diminuição na velocidade global da reação.

Jia *et al.* [13] estudaram a adsorção de HRP sobre eletrodos de grafite modificados sequencialmente com microfibras de carbono (em inglês, CMF) carregando nanotubos de carbono em um arranjo estruturado hierarquicamente e, finalmente, o ácido hexanóico pireno (em inglês, PHA) sendo usado para melhorar a hidrofiliabilidade da superfície do eletrodo. Os eletrodos de grafite/CNT/CMF foram modificadas por imersão em 10 mM de PHA dissolvido em DMF por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, o eletrodo foi lavado cuidadosamente com DMF puro para remover PHA fracamente ligado. Em seguida, 5 mL de uma solução de HRP (5 mg mL^{-1}) em PBS (solução tampão de fosfato) foram gotejados na superfície do eletrodo e deixado para secar. Os eletrodos modificados foram armazenados em PB (tampão fosfato) em $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Segundo os autores a melhora na hidrofiliabilidade da superfície do eletrodo é a base para a redução direta bioeletrocatalítica de H_2O_2 em potenciais de até cerca de 600 mV vs. Ag/AgCl/3 M de Cl⁻. Além disso, o alto potencial de redução direta bioeletrocatalítica de H_2O_2 sugere uma comunicação bioeletroquímica direta envolvendo o estado redox $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}, \text{P}^{+\bullet}$, conhecido como

composto I (cpd I). É importante informar que o E° da reação redox heme apresenta-se com um valor de aproximadamente 30 mV vs. Ag/AgCl/3 M de Cl^- em pH 5 de 67 mM de PBS.

Cracknell *et al.* [14] afirmam nessa revisão que o peróxido de hidrogênio é um oxidante mais forte que O_2 e que, células a combustível usando peroxidases altamente ativas como eletrocatalisador catódico têm sido estudadas. Peroxidases contêm um grupo de Fe-porfirina como cofactor redox, e até agora, a maioria das aplicações têm sido descritas para as preparações enzimáticas do HRP disponíveis comercialmente, e que estão em uso generalizado em biotecnologia. A HRP catalisa, através de H_2O_2 , a oxidação de pequenas moléculas orgânicas que sejam capazes de se aproximar do Fe-porfirina, e um mediador é normalmente exigido para a realização de transferência de elétrons com um eletrodo. No entanto, segundo os autores, a troca rápida e eficiente de elétrons com um eletrodo de PGE (em português, grafite pirolítico de borda) tem sido demonstrado para a citocromo c peroxidase, para o qual o doador de elétrons fisiológico é o citocromo c (figura 9 dessa ref.). A citocromo c peroxidase até agora não rendeu eletroquímica estável, uma séria desvantagem para as células de combustível! (Isso é mostrado claramente na Figura 9B dessa ref., onde o aumento da temperatura realmente diminui a corrente catalítica, pois desestabiliza o filme da enzima.) No entanto, o potencial eletrocatalítico é alto, maior que 0,75 V vs SHE em pH 5,4, o que aumenta para 0,88 V quando um resíduo de triptofano no sítio ativo é substituído por fenilalanina (mutação W51F, figura 9 dessa referência).

Os dados apresentados na figura 9 citada no parágrafo anterior foram obtidos da ref. 15 onde os autores utilizaram voltametrias de filmes de proteínas para medir as mudanças na energética catalítica redox da citocromo c peroxidase produzida por uma mutação simples no receptáculo distal. Segundo os autores, a citocromo c peroxidase do tipo silvestre (WT) adsorvida em um eletrodo de PGE a partir de um tampão gelado de succinato diluído, pH 5,4, resulta em um filme eletroativo que mostra um sinal reversível e estreito (de dois elétrons), com potencial de redução de 754 mV VS. SHE, a qual se converte completamente em uma onda catalítica, em um potencial semelhante, quando baixos níveis de peróxido de hidrogênio são adicionados. Um fato importante descrito pelos autores é que o eletrodo de PGE é preparado pela transferência dele para uma célula que contém solução de peroxidase (normalmente 0,13 μM) e mantido normalmente em um potencial de 842 mV por 10 segundos enquanto gira a 50 rpm antes das ciclagens (dúvida nossa). “A suavização das transformadas de Fourier e as correções de linha de base foram realizadas conforme descrito anteriormente [16]”. Na ref. 16 todos os experimentos

apresentam uma descrição do tipo “o eletrólito consistiu de 1,2 μM de FrdAB (domínio catalítico de *E. coli* fumarato redutase) em um tampão misto contendo 0,2 g L^{-1} de polimixina e 0,1 M de NaCl”. Mondal *et al.* [15] afirmam que nas mesmas condições de WT, a mutante W51F apresenta um sinal fraco em 883 mV, que também se transforma em uma onda catalítica em potencial semelhante, mas com uma amplitude comparável à de WT. Os sinais reversíveis observados para cada variante correspondem, portanto, ao par redox catalítico, semelhante se não idêntico ao $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O},\text{R}^+/\text{Fe}^{\text{III}}$, com a substituição do triptofano-51 por fenilalanina, causando um aumento substancial do potencial de redução (desestabilização do $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O},\text{R}^+$).

1.5. CV vs. PGE

Blanford e Armstrong [17] realizaram uma série de experimentos para explorar a superfície do eletrodo polido de grafite pirolítico de 'borda' (PGE) como rotineiramente preparados para serem utilizados em voltametria de filme de proteína. Os resultados mostram que o PGE, o plano de borda polido de grafite pirolítico (PG), tem uma superfície maior e mais acessível do que muitos materiais poroso com uma elevada área superficial interna. Assim, uma molécula N_2 'vê', no PGE, uma área que é cerca de 10^4 vezes maior que a área superficial geométrica do eletrodo. Grande parte da superfície adicional que é revelada nesse estudo é inacessível a moléculas de enzima típicas com diâmetro mínimo > 5 nm porque ela compõe as paredes de valas estreitas profundas (< 10 nm de largura). Levando isso em conta, os resultados sugerem que a cobertura máxima que se pode atingir em eletrodos PGE ainda é potencialmente uma ou duas ordens de magnitude maior do que a expectativa normal, ou seja, um máximo de cerca de 10 pmol cm^{-2} para uma superfície de eletrodo comum que é assumido ser planar. A fração fisicamente acessível da superfície do eletrodo provavelmente terá um caráter essencialmente basal não reativa e deve ser improdutiva para voltametria de filmes de proteína, seja por moléculas de enzima que não se ligam a áreas de tão extensiva hidrofobicidade, sem qualquer desdobramento, ou porque a transferência eletrônica é muito lenta. A capacidade de PG polido de plano de borda para fixar uma variedade de proteínas tem sido apresentada como uma superfície do eletrodo muito útil para estudos eletroquímicos de proteínas redox-ativas, incluindo as enzimas grandes. Segundo os autores, com pré-tratamento relativamente fácil, o PGE fornece um ambiente compatível com a proteína, rico em funcionalidades ácidas do tipo C-O, nas quais, muitas proteínas adsorvem e exibem rápida transferência de elétrons.

Banks e Compton [18] informam que os eletrodos de grafite de plano basal (em inglês, BPPG) e de plano de borda (em inglês, EPPG) são fabricados a partir de grafite pirolítico altamente ordenado (em inglês, HOPG). A superfície do plano basal de um eletrodo HOPG consiste de camadas de grafite que se encontram paralelas à superfície e com um espaço entre as camadas de 3,35 Å. Os defeitos superficiais ocorrem na forma de degraus expondo as bordas das camadas de grafite. Devido à natureza das ligações químicas no grafite, os dois planos, borda e basal, apresentam propriedades eletroquímicas completamente diferentes. Para a eletroquímica, o plano de borda exibe cinética eletródica consideravelmente mais rápida, em comparação com o plano basal. Isto significa que em muitos casos, um eletrodo composto inteiramente de plano de borda, por exemplo, um eletrodo de grafite pirolítico de borda, mostrará um voltamograma praticamente reversível, enquanto que um eletrodo composto principalmente de plano basal vai mostrar comportamento irreversível, dependendo muito da quantidade de borda presente. Carbono vítreo é composto de uma estrutura de fitas entrelaçadas de estrutura de grafite. Essa estrutura implica que carbono vítreo é uma forma muito rígida de grafite, e é impermeável a líquidos ou gases. Os eletrodos de EPPG são fabricados usando-se um pedaço de HOPG e cortando a geometria do eletrodo desejado de tal forma que as camadas de grafite sejam perpendiculares à superfície; do contrário, eletrodos de BPPG são produzidas cortando a geometria do eletrodo de tal forma que as camadas de grafite encontrem-se paralelas à superfície. Modificar abrasivamente um BPPG, por exemplo, através de polimento com partículas de alumina, torna a superfície do eletrodo áspera, assim, sítios de planos de borda/defeitos são introduzidos conseqüentemente na superfície do eletrodo, resultando em uma transferência de elétrons rápida e que apresenta, depois da abrasividade por aproximadamente um minuto, uma resposta quase idêntica àquela do eletrodo de EPPG. Isso mostra claramente que os sítios de plano de borda são os locais dominantes onde ocorre a rápida transferência de elétrons.

McCreery [19] escreve que o mais simples material de grafite é uma folha bidimensional de grafeno, que é essencialmente um grande hidrocarboneto poliaromático. Os mais ordenados materiais de grafite tridimensional são relativamente raros, compreendendo HOPG e grafite cristalino natural. Os materiais de grafite são freqüentemente caracterizados pelas dimensões dos cristalitos, L_a para o tamanho do cristalito no plano e L_c para os planos do grafeno perpendiculares. O espaçamento interplanar em materiais de grafite é freqüentemente rotulado como " d_{002} ", em referência a um pico de difração de raios-X. HOPG e grafite natural de cristal

simples têm valores de L_a e L_c superiores a 1 μm , enquanto grafite policristalino semelhante ao lápis tem valores variando de 10 a 100 nm, e negro de fumo tem valores na faixa de 1-10 nm. O plano hexagonal atômico ordenado contendo o eixo "a" é comumente conhecido como o "plano basal", enquanto a superfície irregular paralela ao eixo "c" é conhecida como "plano de borda". O grafite de plano de borda contém uma variedade de sítios, muitas vezes chamado de "cadeira" ou "zig-zag", assim como vários grupos funcionais contendo oxigênio. O "plano de borda" do HOPG é áspero e irregular, com características que não podem ser descritas por STM (microscopia de varredura de transmissão), devido às variações multimicrométricas na altura. Quando valências livres são formadas nas bordas de grafeno durante a clivagem ou polimento, elas reagem com o oxigênio e água para formar vários grupos funcionais contendo oxigênio. Quase todas as superfícies de carbono são propensas a reações com o oxigênio e água, e grupos funcionais contendo oxigênio estarão presentes em eletrodos de carbono a menos que pré-tratamentos especiais sejam utilizados. A natureza e a formação de grupos funcionais de carbono contendo oxigênio têm sido estudadas extensivamente, e as carbonilas, OH fenólicos, lactonas, éteres e carboxilatos sobre as superfícies de carbono serão referidos coletivamente como "os óxidos de superfície" ou simplesmente "óxidos". A carga negativa superficial resultante de alguns óxidos superficiais no carbono, nomeadamente carboxilatos, pode ter efeitos eletroquímicos significativos sobre a adsorção e as velocidades de transferência de elétrons.

Exemplos de óxidos que se formam na superfície de um grafite de borda são mostrados esquematicamente na figura 4 [19]. Soluções de água/alumina produzem uma razão atômica O/C sobre a superfície de CV de cerca de 10-15%.

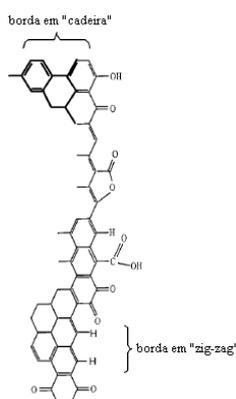


Figura 04: Exemplos de óxidos superficiais que podem ocorrer na superfície de grafite de plano de borda ou em folhas de grafeno em materiais de carbono desordenados sp^2 [19].

Uma variante eletroquimicamente importante na estrutura do grafite é o carbono vítreo (CV), que é obtido por tratamento térmico de polímeros diversos, muitas vezes poliacrilonitrila. Ao aquecer o polímero sob pressão em uma atmosfera inerte para 1000-3000 °C, os heteroátomos são evaporados até restar somente carbono. As ligações C–C na espinha dorsal do polímero não quebra a estas temperaturas, então o carbono pode formar planos de grafite apenas de dimensão limitada, com a L_a e a L_c na faixa de 30-70 Å. O espaçamento interplanar é maior do que o HOPG, cerca de 3,6 Å, e a estrutura de grafite não pode se desenvolver plenamente, devido às ligações ininterruptas C–C. A estrutura é geralmente apresentado na forma de fitas entrelaçadas aleatoriamente dos planos grafíticos, embora a aleatoriedade resulte em incerteza significativa sobre a microestrutura detalhada. Sabe-se que CV tem cerca de 60% da densidade do HOPG e deve conter muitos espaços vazios, mas a sua natureza desordenada torna difícil a caracterização estrutural ao nível atômico. O CV deve ser distinguido de uma variedade de outros materiais grafíticos desordenados, como "carbono tipo diamante" (em inglês, DLC), de carbono amorfo, de grafite policristalino, e negro de fumo (ver Tabela 1). Embora as propriedades dos materiais variem muito com a preparação e pré-tratamento, algumas generalizações com base em suas origens são úteis. Como observado anteriormente, grafite policristalino tem d_{002} de 3,35 Å, mas com cristais aleatoriamente orientados muito menores do que em HOPG. Ele (o HOPG) é obtido sob condições onde é permitido ao carbono "grafitizar", que significa permissão para formar chapas planas paralelas, com o espaçamento das camada de 3,35 Å. Os materiais de carbono desordenados derivado de polímeros, tais como GC e pirolisados fotorresistentes, são incapazes de grafitizar completamente e têm $d_{002} > 3,35$ Å e $L_a < 10$ nm (ver Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades de vários materiais de carbono [19]

	densidade aparente (g/cm ³)	d_{002} (Å)	ρ ($\Omega \cdot \text{cm}$)	L_a (Å)	L_c (Å)
HOPG, eixo a	2.26	3.354	4×10^{-5}	> 10000	
HOPG, eixo c			0.17		> 100000
grafite pirolítico	2.18	3.34		1000 (typ) ^d	1000 (typ)
grafite orientado aleatoriamente	1.8	3.35	1×10^{-3}	300 (typ)	500 (typ)
carbono ultra grau UF-4s					
Tokai GC-10 ^b	1.5	3.49	4.5×10^{-3}	20 (typ)	-10
Tokai GC-20 ^b	1.5	3.48	4.2×10^{-3}	25 (typ)	12
Tokai GC-30 ^b	1.5	3.41	3.7×10^{-3}	55	70
fibra de carbono (typ)	1.8	3.4	$(5-20) \times 10^{-4}$	> 100	40
negro de fumo(spheron 6)	(1.3-2.0) ^c	3.55	0.05	20	13
evaporated a-C	-2.0	> 3.4	$\sim 10^3$	~ 10	~ 10
a-C:H	1.4-1.8		$10^7 - 10^{16}$		
filme fotoresistente pirolizado (PFF)			0.006 ¹⁴⁹		
diamante dopado com boro			0.05-0.5 ^d		
carbono tetrahedral amorfo dopado com N			10-1000 ^e		

^a Os locais marcados com “typ” podem variar significativamente com a amostra ou com os procedimentos de preparação. ^b Os números referem-se às temperaturas de tratamento, por exemplo, GC-20 foi tratada em 2000 °C. ^c Depende da técnica usada para medir a densidade. ^d Depende fortemente do nível de dopagem.

As forças que governam a adsorção no carbono dependem fortemente do tipo de carbono, sua química de superfície, bem como da estrutura do adsorbato, entre outros fatores. As interações entre a superfície e o adsorbato que controlam a adsorção incluem interações dipolo-dipolo, dipolos induzidos, os efeitos hidrofóbicos, e as ligações eletrostáticas e covalentes, todas as quais dependem da história e da preparação do material de carbono. Materiais de carbono gráfico comumente usados como adsorventes tem uma grande área superficial microscópica e muitos grupos funcionais contendo oxigênio. A alta polarizabilidade de grafite conduz a relativamente fortes dipolos induzidos, e os dipolos permanentes associados a grupos funcionais dão apoio à interação dipolo-dipolo com adsorbatos. A capacidade do carbono de formar ligações covalentes fortes com uma variedade de materiais tem sido explorada extensivamente para a modificação superficial. Cada uma dessas interações varia em magnitude dependendo do alótropo de carbono, a exposição dos planos basais ou de borda na superfície, e a distribuição de óxidos superficiais. Por exemplo, a adsorção em relação ao plano basal de HOPG é relativamente fraca, pois não existem dipolos permanentes, cargas eletrostáticas, ou valências livres. No entanto, a adsorção é geralmente forte em grafite de plano de borda e em defeitos de borda-degrau sobre o plano basal. A perturbação eletrônica perto de uma borda gráfica pode se estender para o plano basal, criando dipolos locais, que realçam a adsorção em relação ao plano basal perfeito do HOPG.

É importante frisar que Ferapontova [1] revisa o papel do material do eletrodo na eficiência bioeletrocatalítica direta de redução (não mediada) de H₂O₂ catalisada por HRP. As

variações na bioeletrocatalise direta da peroxidase quando provenientes de carbono/grafite passando por eletrodos de metal e óxidos, bem como eletrodos modificados, são analisadas quanto a variação na adsorção/orientação da peroxidase nos eletrodos, as velocidades de transferência eletrônica interfacial e os mecanismo de catálise, e assim, podem ser consultados diretamente nessa referência. Além disso, Limoges *et al.* [11] informam que HRP está envolvida em numerosas aplicações tais como teste diagnósticos, análises de ácidos nucléicos, biosensores, bioremediadores, sínteses poliméricas, e outros processos biotecnológicos. Assim, não é nosso objetivo realizar uma revisão exaustiva desse tema – envolvimento de outras superfícies eletródicas que não carbono, e também carbono, na eletroquímica de peroxidases, além de suas aplicações – e que hoje conta com 1467 referências encontradas contendo ambos os conceitos “HRP” and “electrochemistry” no SciFinder Scholar em busca realizada no dia 17/02/2011.

Dessa forma, a justificativa para o nosso trabalho é:

2. JUSTIFICATIVA

Dado que, para o nosso conhecimento, encontramos apenas uma referência, a [9], onde foi abordada a adsorção de HRP em superfície de CV, e que a maioria dos outros estudos é realizada em superfície de carbono, grafite, e principalmente PGE, onde se encontra na literatura que este seria o material mais promissor para estudos de voltametria de filmes de proteínas, resolvemos investigar a adsorção de HRP comercial em superfície de CV a partir de solução aquosa objetivando identificar a ocorrência de DET e a possibilidade de bioeletrocatalise para H_2O_2 e O_2 , com a principal idéia de usar essa enzima em eletrodos de células a combustível enzimáticas, e para isso traçamos os seguintes objetivos:

3. OBJETIVOS

▶ Adsorver HRP em CV e verificar a ocorrência (ou não) de DET, via repetibilidade de experimentos, usando-se as técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE);

▶ Identificar e determinar a magnitude do potencial formal da heme Fe_{III}/Fe_{II} na HRP adsorvida em CV usando-se a técnica de voltametria cíclica bem como, verificar a ocorrência de algum outro comportamento voltamétrico relacionado, por exemplo, ao pares cpd I/ Fe^{3+} , cpd I/cpd II e cpd II/ Fe^{3+} ;

▶ Construir eletrodos de CV recobertos com filmes de HRP em presença de polimixina (a ligação de proteínas com superfícies carregadas negativamente é bastante reforçada pela presença de poliaminas, tais como neomicina ou polimixina (PM) [17]), e adicionalmente recobertos por Nafion (eletrodos nomeados como CV/HRP-PM/Nafion), e caracterizá-los através das técnicas de VC e EIE;

▶ Verificar a bioeletrocatalise da HRP, diretamente adsorvida em CV ou adsorvida nos eletrodos CV/HRP-PM/Nafion, para H_2O_2 e O_2 usando-se as técnicas de VC, varredura linear de potencial hidrodinâmica e EIE;

▶ Discutir o mecanismo de DET à luz das propriedades do CV em comparação com o PEG;

▶ Discutir o mecanismo de DET à luz da HRP em solução e adsorvida em superfície eletródica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

A água utilizada no preparo das soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus (Millipore).

A enzima utilizada nos estudos foi horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7) da Fluka BioChemika e horseradish peroxidase (EC 232-668-6) da Sigma.

O peróxido de hidrogênio (solução 30% m/v) utilizado foi da Merk.

A polimixina (sulfato de polimixina B) utilizada foi da Fluka BioChemika.

O Nafion[®] (solução 5%) utilizado foi da Aldrich.

As soluções tampões utilizadas foram preparadas da seguinte forma:

Tampão fosfato monobásico de potássio 0,1M: preparado pelo ajuste da solução 0,1 M de fosfato monobásico de potássio (Synth, 99,0 %) com solução de 1 M de hidróxido de potássio (Vetec, 85%) até pHs desejados.

Tampão acetato 0,1 M: preparado pela mistura de soluções de 0,1 M de ácido acético, (Vetec, 99,5 %,) e 0,1M de acetato de sódio (Merck, 99,0 %) até pH 4,0.

Gás oxigênio medicinal (Oxinal) utilizado sem tratamento prévio como substrato da enzima horseradish peroxidase.

Gás nitrogênio industrial (White Martins)

4.2. Células eletroquímicas

As medidas ciclovoltagemétricas foram realizadas sob controle de temperatura, em célula eletroquímica de vidro, com capacidade aproximada de 50 mL, com cinco compartimentos de entrada, três para os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente, outra para entrada de N₂ e a última para a saída de N₂, e/ou dotada de jaqueta externa, a fim de manter a temperatura constante.

4.3. Eletrodos

Nos experimentos de voltametria cíclica (VC) foi utilizado como eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono vítreo de disco com área geométrica de 0,25 cm². Em todas as medidas eletroquímicas foi utilizado como eletrodo auxiliar um fio de platina, e como eletrodo de referência um eletrodo de calomelano saturado (ECS).

4.4. Equipamentos

Os estudos ciclovoltagemétricos e/ou de métodos hidrodinâmicos foram realizadas em um potenciostato/galvanostato PGSTAT 12 da Autolab acoplado a microcomputador equipado com os softwares GPES e FRA para aquisição de dados e o tratamento dos mesmos realizados nos softwares Origin 6.0 e NOVA 1.5.

Para os estudos de métodos hidrodinâmicos foi utilizado um módulo de rotação da Pine Instrument Company, modelo AFMSRX, série 941.

As medidas de pH foram realizadas em um titulador automático INOLAB (wtw) dotado de um agitador magnético TM 125 Shott.

Um banho termostaticado em fluxo da Fisher Scientific, modelo 8001, foi utilizado para as medidas ciclovoltagemétricas e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) sob temperatura controlada.

Um ultrassom UNIQUE modelo USC-1800 foi utilizado para dissolução dos reagentes, com exceção das soluções envolvendo HRP.

As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000.

Para pipetagem das soluções foram utilizadas micropipetas da Gilson dos modelos P20, P200 e P1000.

4.5. Métodos de Limpeza

4.5.1. Eletrodos de referência e auxiliar e célula eletroquímica

Os eletrodos de referência e auxiliar foram lavados com água ultrapura Milli-Q antes de cada experimento.

As células eletroquímicas, bem como toda vidraria utilizada, foram lavadas com KOH alcoólico 10%, água destilada, e em seguida exaustivamente enxaguadas em água ultrapura Milli-Q e secas em estufa antes de cada experimento.

4.5.2. Eletrodo de carbono vítreo

O eletrodo de trabalho de carbono vítreo foi polido com uma lixa de granulometria 2000, suspensão de alumina 1,0 μm e suspensão de alumina 0,05 μm , respectivamente. Em seguida o eletrodo foi enxaguado abundantemente com água ultrapura Milli-Q e submetido à ultrassom durante 15 minutos por 2 vezes em água ultrapura Milli-Q.

4.6. Procedimentos Experimentais

4.6.1. Preparação dos eletrodos modificados CV/HRP

O eletrodo de CV/HRP, após processo de limpeza para renovação da superfície eletródica do eletrodo de CV, foi preparado mediante aplicação de aproximadamente 100 μL de solução de HRP com concentração 2 - 3,5 mg mL^{-1} de enzima em solução tampão 0,1 mol L^{-1} no pH desejado na superfície de CV, recoberto com parafilme (sem tocar a superfície) e levado à geladeira por 3 horas. Antes de cada experimento eletroquímico o eletrodo de CV/HRP foi lavado com solução tampão [20].

4.6.2. Preparação dos eletrodos modificados de CV/HRP-PM/Nafion

O eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion foi preparado, após renovação da superfície eletródica do eletrodo de CV, mediante aplicação de 22 μL de solução de enzima, contendo 11 μL de solução de HRP 10 mg mL^{-1} e 11 de μL solução de polimixina 1 mg mL^{-1} , e seco em temperatura ambiente. O eletrodo CV/HRP-PM foi então recoberto com 11 μL de solução de nafion 5% e novamente seco em condições ambientes [21].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados para avaliação do perfil e da repetibilidade dos resultados ciclovoltagemétricos nas superfícies de CV limpa e modificada com HRP

Inicialmente foram caracterizadas as superfícies de CV limpa e modificada com HRP através de respostas ciclovoltagemétricas, em relação ao perfil e à repetibilidade, em temperatura aproximada de 0 °C.

5.1.1. Resultados para avaliação do perfil e da 0,1 mol L⁻¹ repetibilidade dos resultados ciclovoltagemétricos para o eletrodo de CV em soluções de tampão fosfato

Nas figuras 05 e 06 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para o eletrodo de CV em presença apenas de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 e 7,0, respectivamente, para cinco experimentos realizados após limpeza da superfície do eletrodo de CV, e em diferentes dias.

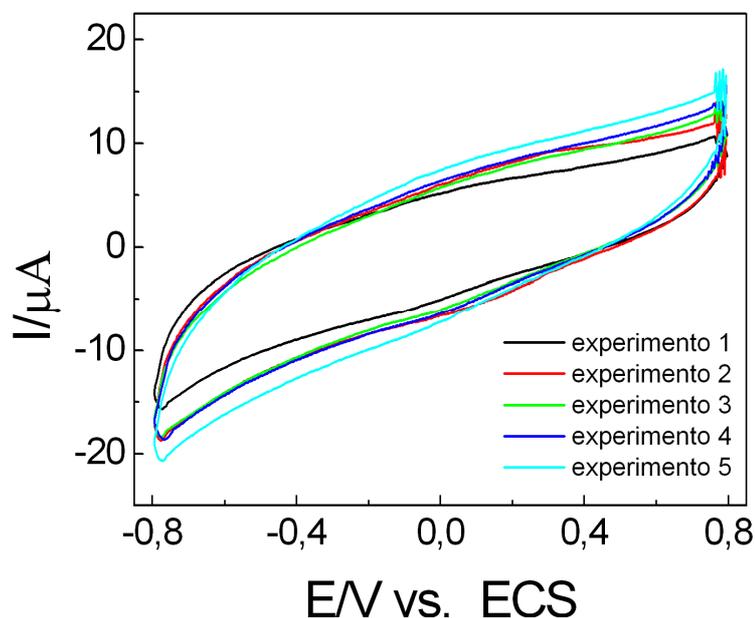


Figura 05: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

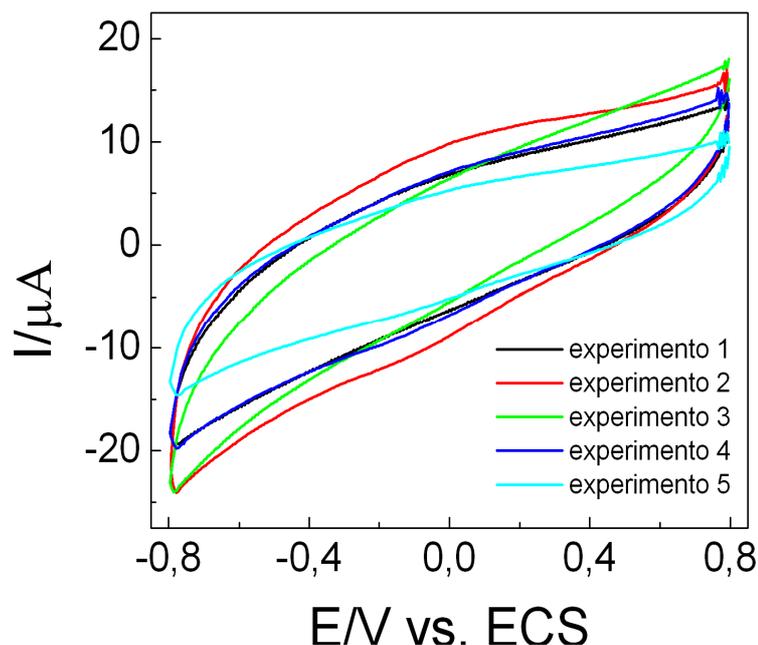


Figura 06: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nas figuras 05 e 06 que os perfis voltamétricos são aproximadamente similares para os experimentos realizados em diferentes dias e que as pequenas variações de correntes em alguns regiões de potencial nos voltamogramas podem ser atribuídas à pequenas modificações na rugosidade da superfície eletródica visto que o polimento da mesma foi realizada manualmente. Estes perfis voltamétricos são característicos de comportamentos capacitivos, apenas, para o eletrodo de CV, nos diferentes meios, ou seja, não se observa comportamento envolvendo transferência eletrônica (ondas), corrente faradáica, na faixa de potencial estudada, fato esperado visto que se tem apenas a presença do eletrólito de suporte, no caso tampão fosfato. Os demais experimentos realizados em velocidades de varredura de potencial de 10 e 50 mV s^{-1} apresentaram comportamentos ciclovolamétricos comparáveis aos mostrados acima (ver figuras A1 e A2). Foram realizados ainda experimentos para os pHs $4,0$, $6,0$ e $8,0$, também nas velocidades de varredura de potencial de 10 , 50 e 200 mV s^{-1} (ver figuras A3, A4 e A5), os quais apresentaram comportamentos similares aos mostrados acima.

5.1.2. Resultados para avaliação do perfil e da reprodutibilidade dos resultados ciclovolamétricos para o eletrodo de CV modificado com HRP (CV/HRP, modificação realizada por adsorção de HRP na superfície de CV (ver tópico 4.6.1)

Resultados e Discussão

Nas figuras 07 e 08 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para eletrodos de CV/HRP em presença apenas de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 e 7,0, respectivamente, para cinco experimentos realizados em novos eletrodos de CV/HRP, e em diferentes dias.

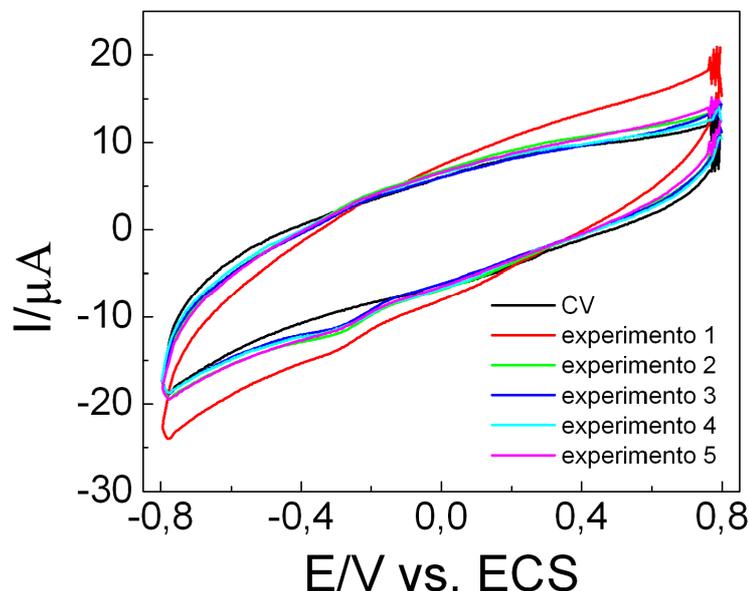


Figura 07: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP¹. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$



Figura 08: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nessas duas figuras a presença de uma corrente de redução (onda) pouco pronunciada em aproximadamente $-0,29\text{V}$ (figura 07) e $-0,35 \text{ V}$ (figura 08), para os eletrodos de CV/HRP modificados, que pode ser atribuída inicialmente à ocorrência de transferência

eletrônica entre a HRP adsorvida e a superfície eletródica do CV. Atente para o fato que as curvas voltamétricas para o eletrodo de CV apenas (figuras 05 e 06) não apresentam esta corrente de redução. Esta corrente de redução está presente nos dez experimentos mostrados nas figuras 07 e 08 corroborando a repetibilidade das respostas voltamétricas bem como, na metodologia de adsorção da HRP na superfície de CV descrita no tópico 4.6.1. Os experimentos realizados para esses pHs nas velocidades de varredura de potencial de 10 e 50 mV s^{-1} apresentaram comportamentos ciclovolamétricos similares aos mostrados acima (ver figuras A6 e A7). Foram realizados ainda experimentos para os pHs 4,0, 6,0 e 8,0, também nas velocidades de varredura de potencial de 10, 50 e 200 mV s^{-1} (ver figura A8, A9 e A10), os quais apresentaram comportamentos bastante semelhantes aos mostrados acima.

Conforme justificado anteriormente, para o nosso conhecimento, encontramos na literatura apenas uma referência, a [9], onde HRP é adsorvida em CV a partir de uma solução de DMSO ou formamida, e onde é reportado um par redox, obtido de comportamento voltamétrico centrado em cerca de $-0,365\text{V vs. Ag/AgCl}$. Encontramos citações de comportamento voltamétrico, por exemplo, para HRP adsorvida em um eletrodo de grafite espectrográfico em presença de uma solução estacionária de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 [23], onde não se observa corrente de redução ou oxidação (onda) que caracterize processo faradáico (transferência eletrônica) na região de potencial apresentada pelos autores (de 0,6 a 0,0 V vs. ECS). Também não identificamos processos faradáicos nessa região de potencial (ver figuras 07 e 08). Discutiremos mais sobre essa região no próximo tópico.

Objetivando a confirmação da ocorrência de eletrocatalise por parte de HRP adsorvida em superfície de CV em relação à H_2O_2 , a seguir serão apresentadas respostas ciclovolamétricas catalíticas e testes de repetibilidade para o eletrodo modificado de CV/HRP em presença de 1 mM de H_2O_2 , e em diferentes pHs do meio.

5.1.3. Resultados da eletrocatalise e repetibilidade para eletrodos CV/HRP em presença de 1 mM de H_2O_2 , em soluções tampões com diferentes pHs

Nas figuras 09 e 10 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para eletrodos de CV/HRP em presença 1 mM de H_2O_2 e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH

Resultados e Discussão

5,0 e 6,0, respectivamente, para cinco experimentos realizados em novos eletrodos de CV/HRP, e em diferentes dias.

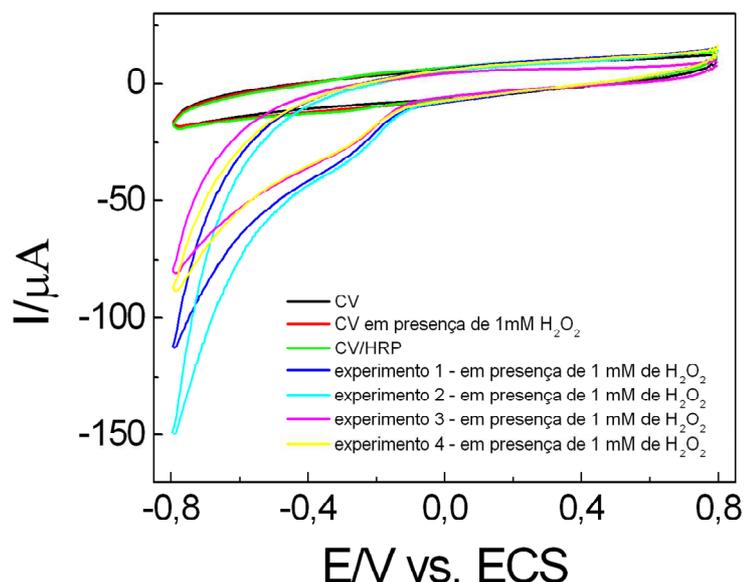


Figura 09: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para quatro experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

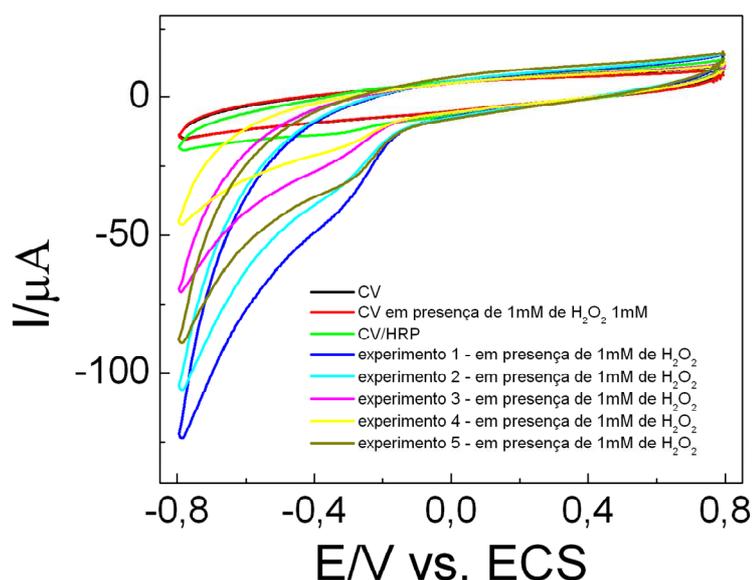


Figura 10: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para quatro experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Inicialmente, observa-se uma ampliação acentuada nas correntes de redução a partir de aproximadamente $-0,1 \text{ V}$ em direção a potenciais negativos, com a presença de um ombro em aproximadamente $-0,25 \text{ V}$ (figura 09) e $-0,29 \text{ V}$ (figura 10) para os eletrodos de CV/HRP em presença de 1 mM de H_2O_2 , quando comparadas aos eletrodos de CV e CV/HRP na ausência

ou CV em presença de 1 mM de H_2O_2 (ver figura 09). Além disso, para esse pH (figura 08), as correntes de redução nos ombros para os eletrodos CV/HRP apresentam aproximadamente os mesmos valores. Em potenciais mais negativos do que aproximadamente $-0,50$ V, as correntes de redução variam para os diferentes experimentos de repetibilidade. Essa ampliação nas correntes de redução em potenciais mais negativos que $-0,1$ V caracterizam a eletrocatalise da HRP adsorvida na superfície de CV para a reação de redução de H_2O_2 e esta eletrocatalise pode ser assumida como ocorrendo de acordo com a figura 02, onde a ferriperoxidase vai a ferrosperoxidase e daí reage com H_2O_2 indo ao cpd II. Já para o pH 6,0, figura 10, observa-se comportamento voltamétrico similar ao já descrito, no entanto, os mesmos são bastante variáveis em termos dos valores de corrente de redução e consequentemente observa-se pobre repetibilidade para este pH. Os experimentos realizados em velocidades de varredura de potencial de 10 e 50 mV s^{-1} para estes pHs e os experimentos realizados nos pHs 4,0, 7,0 e 8,0 e nas velocidades de varredura de potencial de 10, 50 e 200 mV s^{-1} (ver figuras A11, A12, A13, A14 e A15), apresentaram comportamentos ciclovolamétricos similares aos mostrados acima.

Na figura 11 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para eletrodos de CV/HRP em presença 1 mM de H_2O_2 e em tampão acetato 0,1 mol L^{-1} com pH 4,0 e tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0, para cinco experimentos realizados em novos eletrodos de CV/HRP, e em diferentes dias.

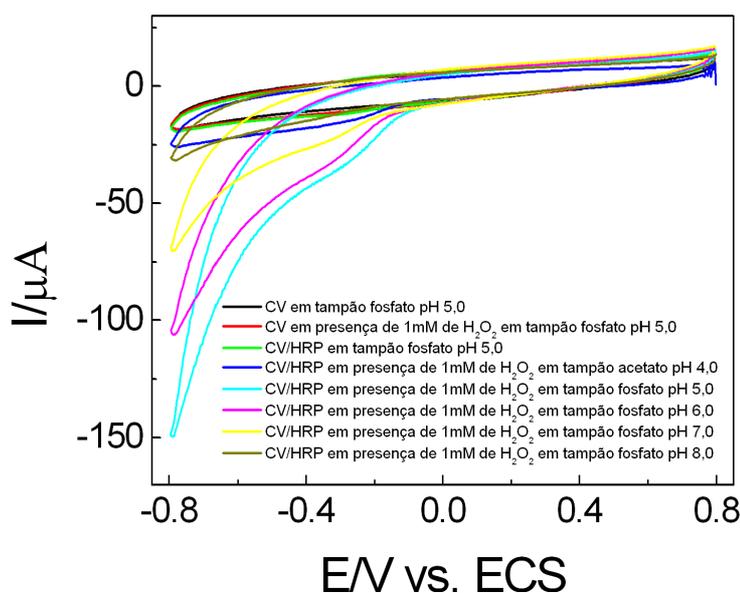


Figura 11: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em diferentes tampões com concentração de 0,1 mol L^{-1} saturados com N_2 , em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Comparando-se as curvas ciclovoltagemétricas mostradas na figura 11, que são curvas escolhidas nas figuras 09, 10, A11, A12, A13, A14 e A15, e que apresentam melhor repetibilidade no caso das curvas para eletrodos de CV (presença e ausência de 1 mM de H₂O₂) e CV/HRP (ausência de 1 mM de H₂O₂) e maiores valores de corrente (de forma global no voltamogramas) para os eletrodos de CV/HRP em presença de 1 mM de H₂O₂, observa-se que os maiores valores de correntes catalíticas foram obtidos para o eletrodo CV/HRP em presença de 1 mM de H₂O₂ e em tampão fosfato pH 5,0. Assim, escolhemos este tampão (fosfato) e este pH (5,0) para a realização dos demais experimentos que serão apresentados em seguida. Inclusive, este pH é o sugerido para determinação da atividade da HRP obtida da Sigma-Aldrich (ver apêndice), quando se usa 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfônico) (ABTS) como substrato.

Em seguida abordaremos a influência da temperatura nas respostas ciclovoltagemétricas para eletrodos CV/HRP em presença de 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 5,0.

5.2. Influência da temperatura nas respostas ciclovoltagemétricas para eletrodos de CV/HRP em presença de tampão fosfato

Na figura 12 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para eletrodos de CV/HRP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, em diferentes temperaturas da solução (0, 7, 12, 30, 37, 50 °C), para seis experimentos realizados em novos eletrodos de CV/HRP e em diferentes dias.

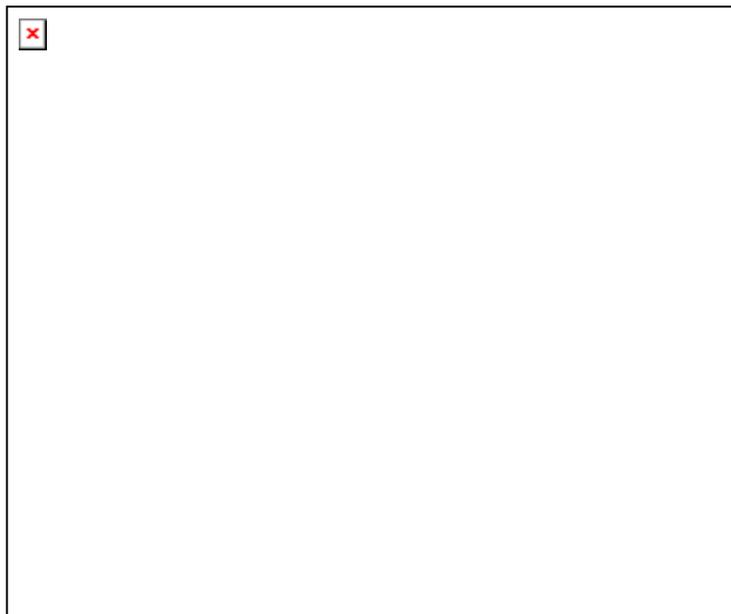


Figura 12: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em diferentes temperaturas da solução, para seis experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nessa figura a presença de uma corrente de redução (onda) bastante acentuada em aproximadamente -0,35 V, para o eletrodo CV/HRP em temperatura de 0 °C. Essa onda diminui de intensidade (diminuição no máximo de corrente de redução) à medida que a temperatura é aumentada, e desaparece em temperatura de 50 °C. Relembrando que essa onda caracteriza transferência eletrônica entre a HRP adsorvida e a superfície de CV, ela é favorecida em baixas temperaturas (ver figura 12). Como o máximo de corrente de redução (onda) foi obtido em temperatura de 0° Celsius, essa foi a temperatura escolhida para realização dos experimentos cujos resultados serão mostrados abaixo. Cabe nesse momento um esclarecimento sobre os resultados bastante pronunciados (ondas) apresentados na figura 12. Esses resultados foram obtidos em dias diferentes dos resultados apresentados na figura 07 e reforçam o fato de que se pode ter em alguns momentos um maior número de unidades de HRP adsorvidas na superfície do CV ou uma conformação mais favorável das unidades de HRP adsorvidas na superfície de CV, tentar-se-á elucidar mais adiante esse mistério.

Em seguida avaliaremos o comportamento do eletrodo de CV/HRP frente ao número de ciclos voltamétricos contínuos.

5.3. Resultados dos ciclos voltamétricos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em presença tampão fosfato e temperatura aproximada de 0° Celsius

Nas figuras 13 e 14 são apresentados os voltamogramas cíclicos para eletrodos de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em velocidades de varredura de potencial de 10 e 200 mV s^{-1} , respectivamente, para dois experimentos realizados em novos eletrodos de CV/HRP e em diferentes dias.

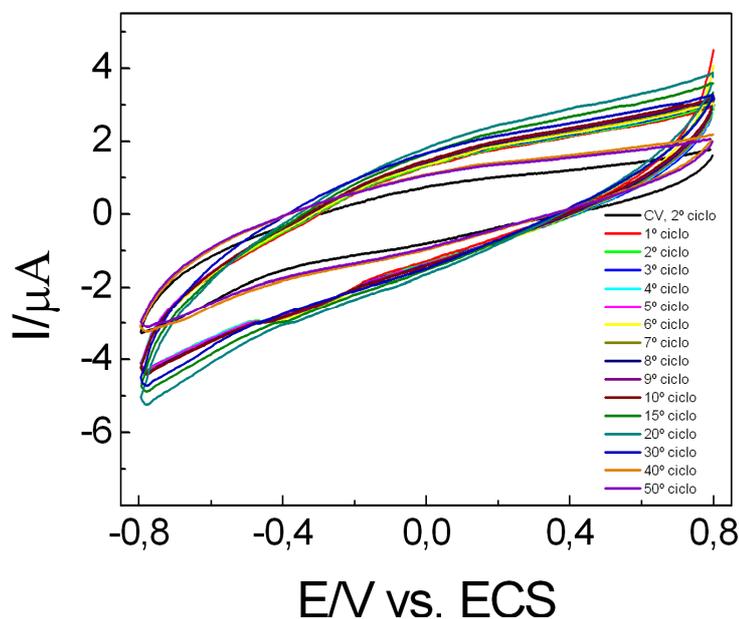


Figura 13: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



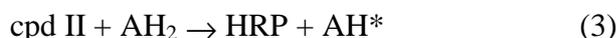
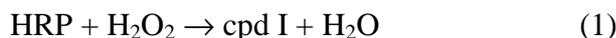
Figura 14: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se uma corrente de redução por volta de $-0,33 \text{ V}$ (onda), melhor definida no primeiro ciclo, para o experimento realizado em velocidade de varredura de 200 mV s^{-1}

(figura 14). Ela também está presente no experimento realizado em velocidade de varredura de potencial de 10 mV s^{-1} (figura 13), e está relacionada a transferência eletrônica ocorrendo entre a HRP adsorvida e a superfície de CV. No entanto, à medida que os ciclos continuam, ocorre uma diminuição na intensidade dessa corrente de redução (onda) até sua completa extinção, o que pode ser possivelmente atribuído nesse momento a inativação da HRP por mudança conformacional ou degradação, ou ao desprendimento sucessivo da HRP da superfície do eletrodo de CV. Tentaremos elucidar essa dúvida em seguida.

5.4. Influência de cálcio exógeno (1 mM de CaCl_2) nas respostas ciclovolamétricas para eletrodos de CV/HRP em presença de tampão fosfato

O ciclo catalítico da HRP envolve a oxidação e redução do grupo porfirínico Fe (III) e pode ser descrito pelas seguintes equações:



HRP nativa (ferriperoxidase: FeIII, Por) é oxidada pelo H_2O_2 através, formalmente, de uma reação de duas transferências eletrônicas ao composto I (cpd I), em que o grupo heme é oxidado a um radical intermediário instável, oxiferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, $\text{Por}^{\bullet+}$), com um estado de oxidação formal de 5+. A HRP é regenerada em duas reações de transferência de um elétron através de um doador de elétrons (AH_2) (eqs. 2, 3), liberando um intermediário não radicalar, composto II (cpd II) ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, Por) (equação 2) com um estado de oxidação 4+, e o radical livre AH^* . Na ausência de substâncias redutoras, AH_2 , H_2O_2 podem desempenhar um duplo papel: como oxidante na formação de cpd I e como um substrato típico doador de um elétron liberando o ânion superóxido [24].

Em combinação com certos doadores de elétrons, a redução do cpd I para a HRP nativa pode ocorrer também em uma única etapa. Esta reação também é observada se somente H_2O_2 estiver presente em um excesso suficiente. Sob essas condições, HRP mostra uma atividade igual a catalase que é a produção de oxigênio através da oxidação de H_2O_2 pelo cpd I [24].

Outra forma de HRP é conhecida como composto III (cpd III). Cpd III é formada via cpd II com um excesso de H_2O_2 e não é cataliticamente ativa. No entanto, sabe-se que cpd III se decompõe lentamente para HRP nativa, levando à restauração da atividade da HRP. Um composto irreversivelmente inativo de HRP é lentamente formado a partir de cpd III ou cpd I quando o excesso de H_2O_2 é permanente, o assim chamado P670 com uma absorvância máxima em 670 nm, que também é chamado cpd IV. A formação do P670 é o principal processo de inativação no qual o H_2O_2 atua como um substrato de suicídio. Os mecanismos ainda não estão completamente entendidos [24].

Análises de raios-X mostram que em peroxidase a histidina proximal contata e, provavelmente, liga hidrogênio com a cadeia lateral de glutamina, que por sua vez, interage com o grupo carboxilato ‘enterrado’ do ácido glutâmico. Este primeiro conjunto de interações na peroxidase pode conferir caráter aniônico suficiente à histidina proximal para estabilizar estados superiores de oxidação do ferro heme durante o ciclo catalítico de peroxidase. Esses argumentos parecem indicar que as estruturas específicas nos ambientes heme podem regular as atividades do grupo prostético heme nas peroxidases [25]. Shiro *et al.* [25] relataram que a HRP contém 2 mols de Ca^{2+} /mol de enzima e que a remoção de Ca^{2+} vinculado à enzima causa um decréscimo de duas vezes na sua atividade enzimática. Esses resultados sugerem que Ca^{2+} vinculado à HRP é essencial para manter a estrutura da proteína que é apropriado para a atividade da peroxidase. A deficiência de íons de cálcio endógeno pode ser superada pela suplementação com íons de cálcio exógeno e albumina [26].

Assim, avaliaremos a seguir o comportamento de eletrodos de CV/HRP, inclusive com relação à atividade catalítica desses eletrodos para a reação de redução de H_2O_2 , em presença (ou ausência) de 1 mM de íon Ca^{+2} , frente ao número de ciclos voltamétricos contínuos.

Na figura 15 são apresentados os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de CV/HRP em presença de uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 , em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s^{-1} .

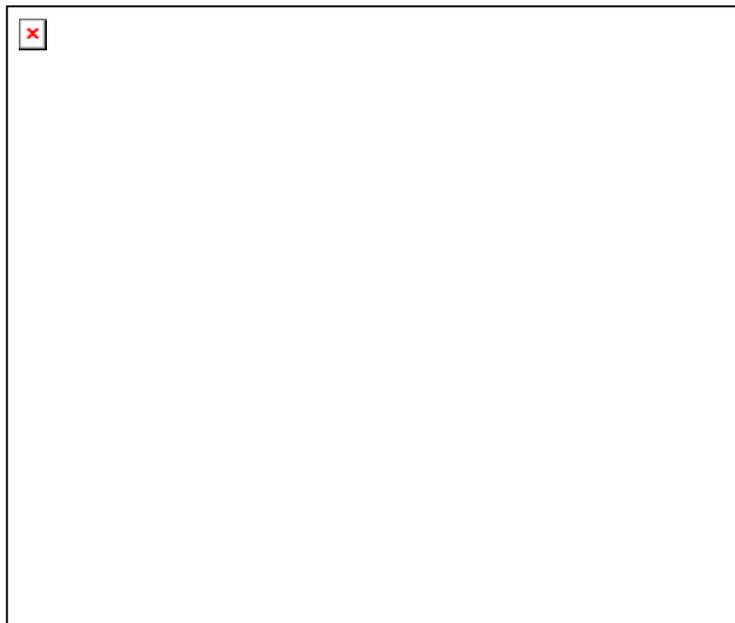


Figura 15: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se a presença de correntes de redução (onda) em aproximadamente $-0,25 \text{ V}$ como já discutido e apresentado (figura 14) anteriormente. À medida que o número de ciclos voltamétricos contínuos é aumentado, ocorre uma diminuição na intensidade do pico, no entanto, sem o desaparecimento dele mesmo após 500 ciclos voltamétricos contínuos, resultado oposto ao observado com experimento similar realizado na ausência de íons de cálcio (compare as figuras 14 e 15). Esse resultado experimental (figura 15) sugere que mesmo após 500 ciclos (o pico ainda é visível), a HRP adsorvida na superfície de CV permanece ativa, fato evidenciado na figura 15, quando o mesmo eletrodo de CV/HRP usado no experimento apresentado na figura 15 é colocado em seguida na presença de 1 mM de H_2O_2 , e onde se observa o aparecimento, acentuado, de correntes de redução (ocorrência de catálise) a partir de aproximadamente $-0,1 \text{ V}$ em direção a potenciais negativos, já apresentada e discutida anteriormente (figura 09). Fato similar não ocorre quando outro eletrodo de CV/HRP é ciclado voltametricamente e continuamente durante 500 ciclos, na ausência de 1 mM de CaCl_2 , e o mesmo é colocado em seguida na presença de 1 mM de H_2O_2 , e onde não se observa catálise para essa reação de redução (ver figura 18, ausência de correntes de redução (acentuadas) a partir de aproximadamente $-0,1 \text{ V}$ em direção a potenciais negativos).

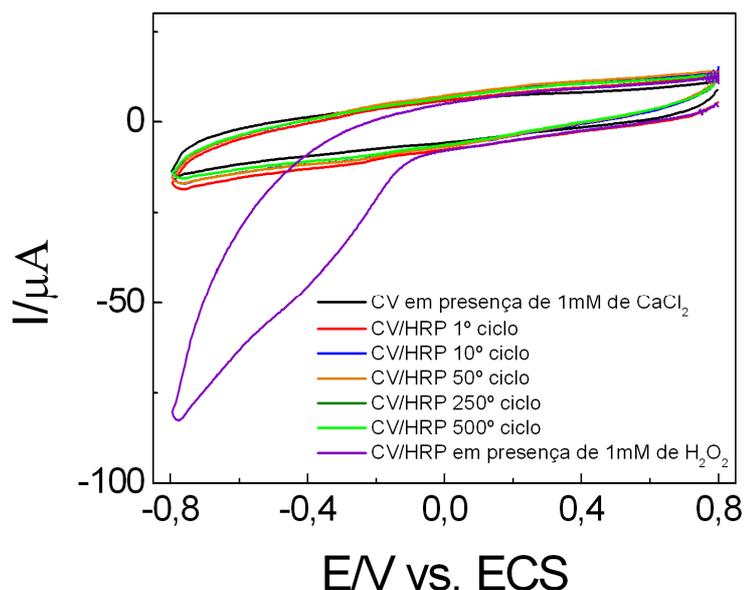


Figura 16: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

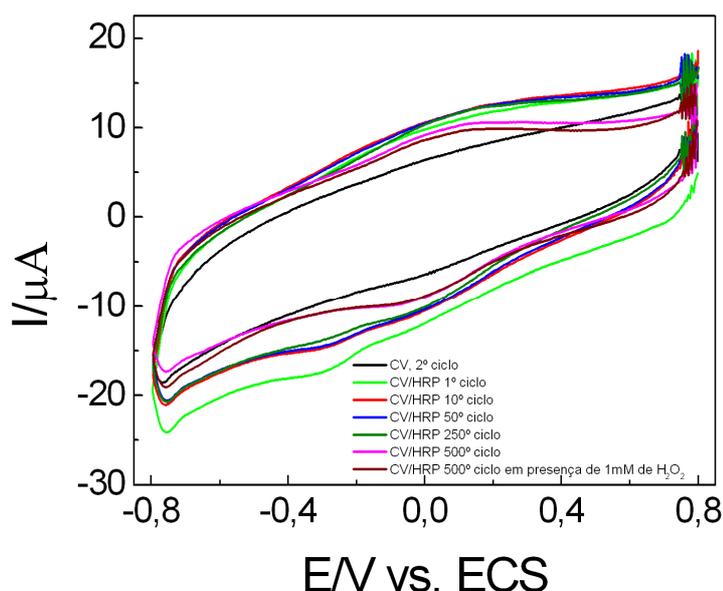


Figura 17: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Conforme tínhamos comentado que tentaríamos elucidar a dúvida – à medida que os ciclos continuam, ocorre uma diminuição na intensidade dessa corrente de redução (onda) até sua completa extinção, o que pode ser possivelmente atribuído nesse momento a inativação da HRP por mudança conformacional ou degradação, ou ao desprendimento sucessivo da HRP da superfície do eletrodo de CV – pode-se descartar com os resultados até aqui apresentados a hipótese de desprendimento sucessivo ou degradação da HRP da superfície do eletrodo de CV, ficando-se apenas com a mudança conformacional visto que comprovamos que Ca^{2+}

vinculado à HRP é essencial para manter a estrutura da proteína. No entanto, não temos conhecimento, com os resultados até aqui apresentados, da influência do H_2O_2 presente simultaneamente com Ca^{2+} exógeno, na catálise do eletrodo de CV/HRP para a reação de redução do H_2O_2 , com o aumento do número de ciclo voltamétricos, assim, na figura 18, são apresentados os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de CV/HRP em presença de uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 e 1 mM de H_2O_2 , em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s^{-1} .

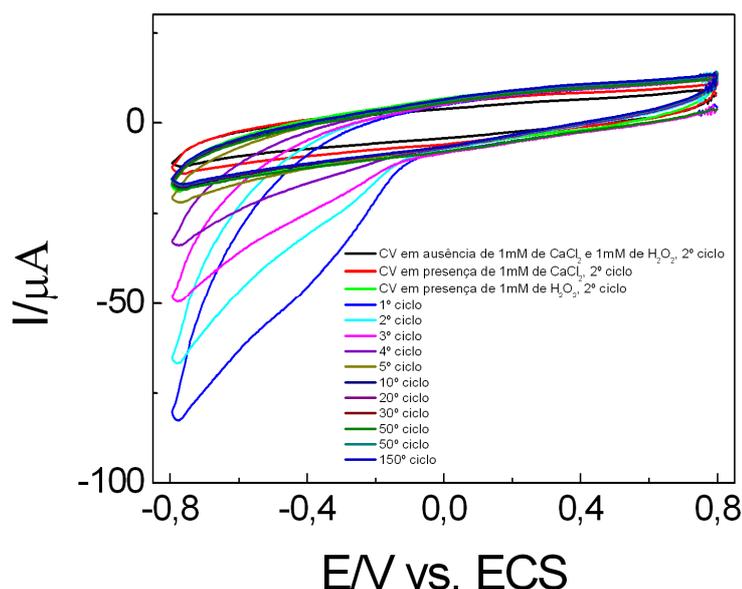


Figura 18: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de CaCl_2 e 1 mM de H_2O_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Nessa figura se observa novamente a ocorrência de uma catálise (aumento acentuado nas correntes de redução) para a redução do H_2O_2 a partir de aproximadamente $-0,1 \text{ V}$ em direção a potenciais negativos, com a presença de um ombro em aproximadamente $-0,25 \text{ V}$. À medida que o número de ciclos voltamétricos é aumentado, ocorre uma diminuição na intensidade dessa corrente, até seu total desaparecimento, após 10 ciclos aproximadamente. Para um experimento similar, no entanto, na ausência de 1 mM de CaCl_2 (ver figura A16), as correntes são menores, após 5 ciclos do que para o eletrodo de CV/HRP na ausência de 1 mM de H_2O_2 , o que corrobora, nesse momento, a inativação da HRP por mudança conformacional, e que a presença de cálcio exógeno evita (diminui) a mudança conformacional da HRP adsorvida em superfície de CV durante um intervalo de ciclos voltamétricos. Dado a região de potencial onde ocorre a redução do H_2O_2 ser comparável à região de potencial onde ocorre a

reação de redução de oxigênio (RRO) nesse mesmo meio [27] resolvemos verificar o comportamento do eletrodo de CV/HRP em presença de O_2 objetivando identificarmos a possibilidade de redução dessa molécula tão importante em sistemas de células a combustível ou células microbiais [14, 28] e que será abordado no próximo tópico.

5.5. Resultados ciclovoltamétricos para eletrodos de CV/HRP em presença de tampão fosfato em presença de O_2

Na figura 19 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s^{-1} , e na presença de O_2 .

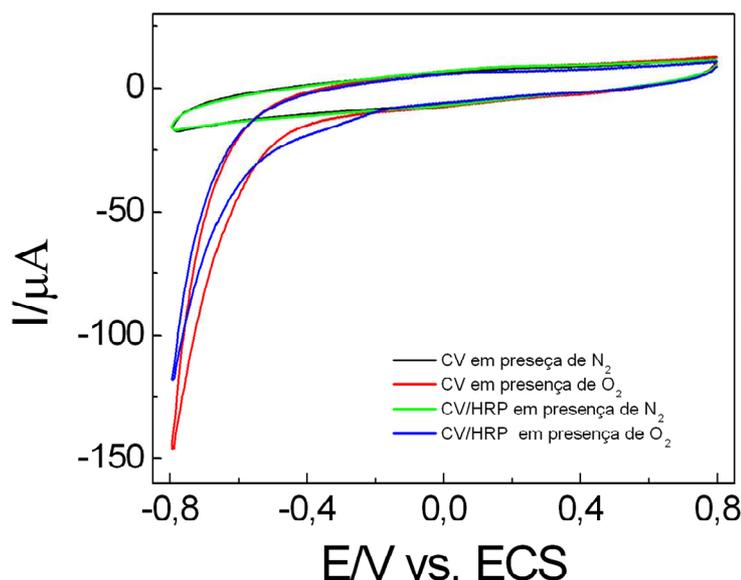


Figura 19: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença ou ausência de O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nessa figura que quando o eletrodo CV/HRP é colocado em presença de O_2 , ocorre uma catálise não tão pronunciada (ampliação das correntes de redução a partir de aproximadamente $-0,2 \text{ V}$) na direção de potenciais negativos. Esses resultados são comparáveis em perfil aos apresentados anteriormente, onde o substrato utilizado foi 1 mM de H_2O_2 (figura 10), sugerindo que temos catálise do eletrodo de CV/HRP para a RRO na mesma região de potencial onde ocorre a catálise desse eletrodo para a reação de redução de H_2O_2 . Os experimentos realizados em velocidades de varredura de potencial de 10 e 50 mV s^{-1} (ver figura A17) apresentaram o mesmo comportamento voltamétrico.

Como sugerimos anteriormente que a inativação da HRP adsorvida na superfície de CV ocorre por mudança conformacional, tentamos minimizar esta inativação estudando adicionalmente o comportamento do filme de HRP em presença de polimixina (PM) e em superfície de CV, e este filme recoberto por Nafion, estudo abordado no próximo tópico.

5.6. Avaliação do perfil ciclovoltagemétrico e hidrodinâmico da superfície de CV/HRP-PM/Nafion

Blanford e Armstrog [17] tratando da habilidade de grafite pirolítico (em inglês, PG) de plano de borda polido para adsorver uma variedade de proteínas, incluindo grandes enzimas, afirmam que a adsorção de proteínas em superfície eletródicas é frequentemente depende da inclusão de políons, em especial, a ligação das proteínas com superfícies carregadas negativamente é bastante reforçada pela presença de poliaminas, tais como neomicina ou polimixina (PM), levando a modelos "racionalis" invocando a importância da previsibilidade de interações eletrostáticas entre a proteína e a superfície do eletrodo, semelhante à situação em membranas biológicas [17].

Wang e Chen [21] citam formas criativas tais como: a "ligação" de enzimas com hidrogel polimérico redox ativo e reconstituição de apo-enzima em nanomaterial ligado a cofatores, para melhorar a eficiência de transferência de elétrons. Eles relatam um método fácil para imobilização de glucose oxidase (em inglês, GOx) sobre eletrodos de carbono vítreo usando polímeros de poli-L-lisina (em inglês, PLL) e Nafion. E observaram que eletrodos modificados com Nafion-PLL-GOx apresentam transferência eletrônica direta (em inglês, DET) sem o auxílio de qualquer nanomaterial. A GOx presente nos eletrodos modificados mantém a sua atividade biocatalítica e oxida glicose de forma eficiente [21].

Baseado nas observações acima se optou em substituir a PLL por PM ao usarmos a metodologia proposta por Wang e Chen [21], para verificarmos a possibilidade de minimizarmos a degradação estrutural da HRP na superfície de CV, assumindo PM como tendo a "função" de polímero e de que a ligação da HRP com superfícies carregadas negativamente de CV (a razão atômica O/C sobre a superfície de CV de cerca de 10-15% [19]) ser bastante reforçada pela presença de poliaminas, no caso PM.

5.6.1. Resultados ciclovoltamétricos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de solução tampão fosfato

Na figura 20 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s⁻¹.



Figura 20: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se agora a presença de um par redox muito bem definido com ondas redox centradas em $-0,217 \text{ V}$ – o máximo de corrente de redução (onda) está em aproximadamente $-0,29$ e o máximo de corrente de oxidação (onda) está em aproximadamente $-0,14 \text{ V}$ – para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion, reforçando adicionalmente a existência de um processo de transferência eletrônica, com certa reversibilidade, da HRP para a superfície de CV, após a imobilização da mesma pela PM e Nafion. Essa observação fica melhor evidenciada na figura 21 onde observa-se que tanto a PM quanto o Nafion (CV/PM e CV/Nafion), isoladamente, não apresentam respostas redox. Pequenas respostas redox são observadas para os eletrodos CV/HRP (já discutido anteriormente), CV/HRP/Nafion e CV/(HRP-PM), porém o sistema HRP/PM/Nafion apresenta o par redox melhor definido.

É importante reforçar aqui que agora tem-se o E° para o par redox Fe(III/II) e que ele está na faixa dos valores reportados na literatura [5-7, 9].

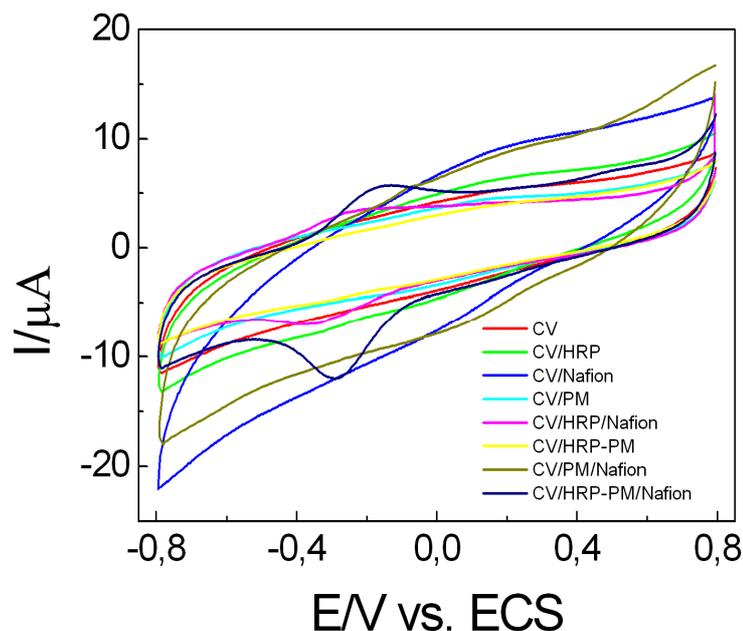


Figura 21: Voltamogramas cíclicos (2^o ciclo) para os eletrodos de CV, CV/HRP, CV/Nafion, CV/PM, CV/HRP/Nafion, CV/HRP-PM, CV/PM/Nafion e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Verificaremos abaixo o perfil catalítico do eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion para a reação de redução do H₂O₂ e RRO.

5.6.2. Resultados da eletrocatalise para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ e tampão fosfato

Na figura 22 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2^o ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ e em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s⁻¹.

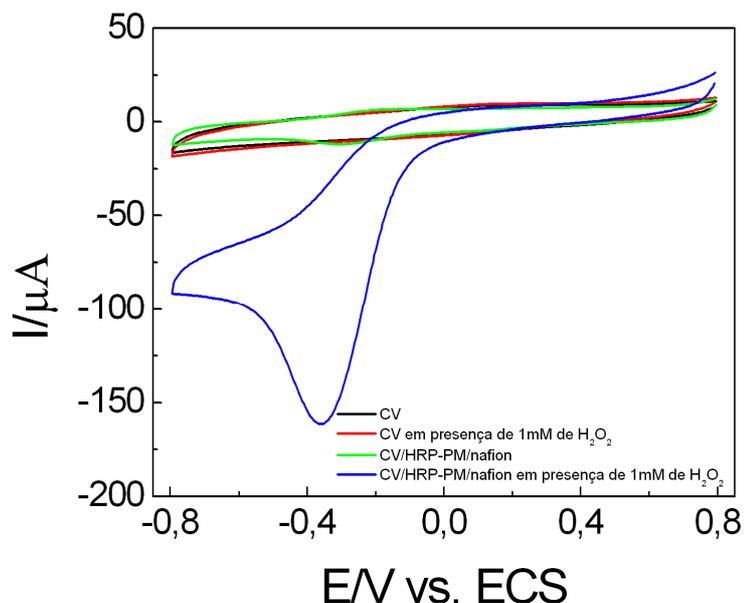


Figura 22: Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nessa figura, para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H_2O_2 , uma ampliação acentuada das correntes de redução a partir de aproximadamente $0,1 \text{ V}$ e o aparecimento, muito bem definido, de um pico de redução por volta $-0,36 \text{ V}$, reforçando à catalise eletroquímica da enzima HRP para a reação de redução de H_2O_2 , ou seja, nesse eletrodo, a transferência eletrônica entre a superfície eletródica (CV) e a enzima (HRP) é mais efetiva (compare as figuras 22 e 09). Atente para o fato que as correntes para os outros eletrodos são muito menores (figura 22).

A catálise eletroquímica do eletrodo CV/HRP-PM/Nafion para a redução de H_2O_2 foi evidenciada adicionalmente através de experimentos hidrodinâmicos de varredura linear de potencial (figura 23), onde se destacam correntes de redução a partir de $-0,22 \text{ V}$, na direção de potenciais negativos, especificamente para esse eletrodo.

Como já comentado anteriormente em CV/PM e CV/Nafion isoladamente, não apresentam respostas redox, realizou-se experimentos ciclovoltamétricos com esses eletrodos em presença de 1 mM de H_2O_2 (A18) onde se confirma a inexistência de catálise por parte desses eletrodos.

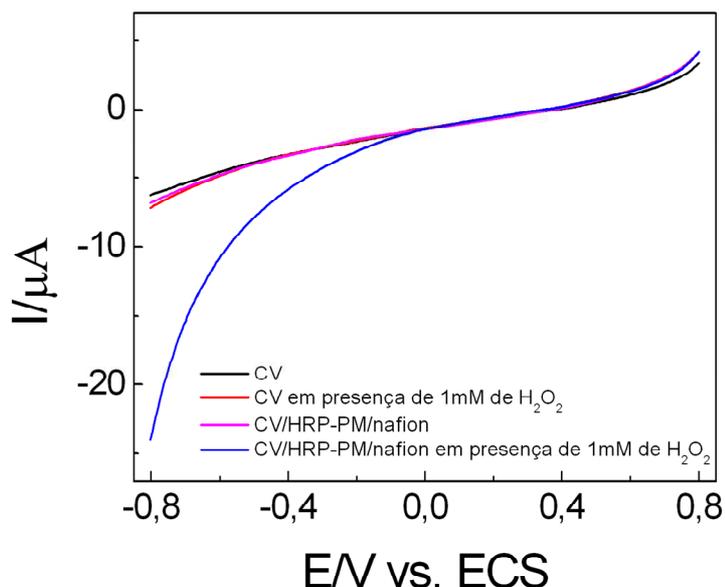


Figura 23: Voltamogramas hidrodinâmicos (1/2 ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $\omega = 400 \text{ rpm}$.

5.6.3. Resultados da eletrocatalise para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de O_2 e em $0,1 \text{ M}$ de tampão fosfato com pH 5,0

Na figura 24 são apresentados os voltamogramas cíclicos (2^o ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em presença de O_2 e em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s^{-1} .

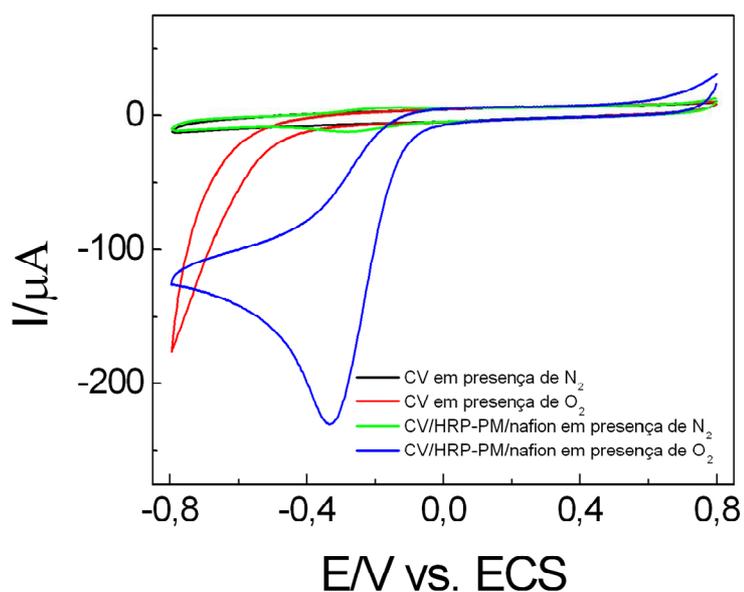


Figura 24: Voltamogramas cíclicos (2^o ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença ou ausência O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se nessa figura, para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de O_2 , comportamento similar ao já apresentado e discutido na figura 22, que é uma ampliação acentuada das correntes de redução a partir de aproximadamente 0,05 V e o aparecimento, muito bem definido, de uma onda de redução por volta $-0,33V$, reforçando a catálise eletroquímica da enzima HRP para a RRO, ou seja, nesse eletrodo, a transferência eletrônica entre a superfície eletródica (CV) e a enzima (HRP), e a posterior catálise para RRO é bastante efetiva (compare as figuras 24 e 19). Atente para o fato que a RRO em presença de CV apenas inicia-se $-0,3V$, ou seja, 0,35 V mais negativo em comparação ao eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion.

A catálise eletroquímica do eletrodo CV/HRP-PM/Nafion para a RRO foi evidenciada adicionalmente através de experimentos hidrodinâmicos de varredura linear de potencial (figura 25), onde se destacam correntes de redução maiores a partir de $-0,22$ V para esse eletrodo em relação ao eletrodo de CV.

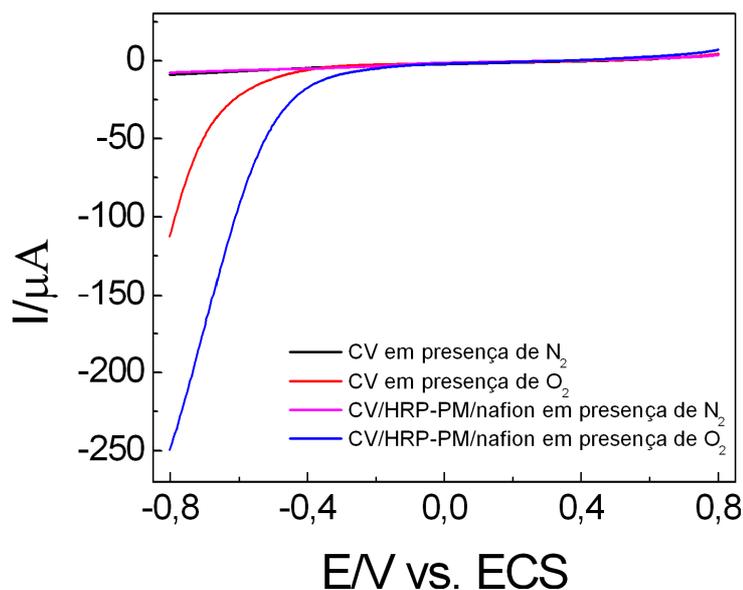


Figura 25: Voltamogramas hidrodinâmicos (1/2 ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença ou ausência O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. $\omega = 400 \text{ rpm}$.

Acompanhando a hipótese de não mudança conformacional como sendo essencial para manter a atividade da HRP e dado que obtivemos resultados promissores para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em termos de catálise para a reação de redução do H_2O_2 e O_2 , apresentaremos em seguida os resultados de ciclos voltamétricos contínuos para esses eletrodos em presença de 1 mM de H_2O_2 ou em presença de O_2 .

5.7. Resultados dos ciclos voltamétricos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion apenas e em presença de solução tampão fosfato contendo hora 1 mM de H₂O₂, hora O₂

Nas figuras 26, 27 e 28 são apresentados os ciclos voltamétricos contínuos para eletrodos de CV/HRP-PM/Nafion apenas, hora em presença de 1 mM de H₂O₂ e hora em presença de O₂, respectivamente, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, e em velocidade de varredura de potencial de 200 mV s⁻¹.

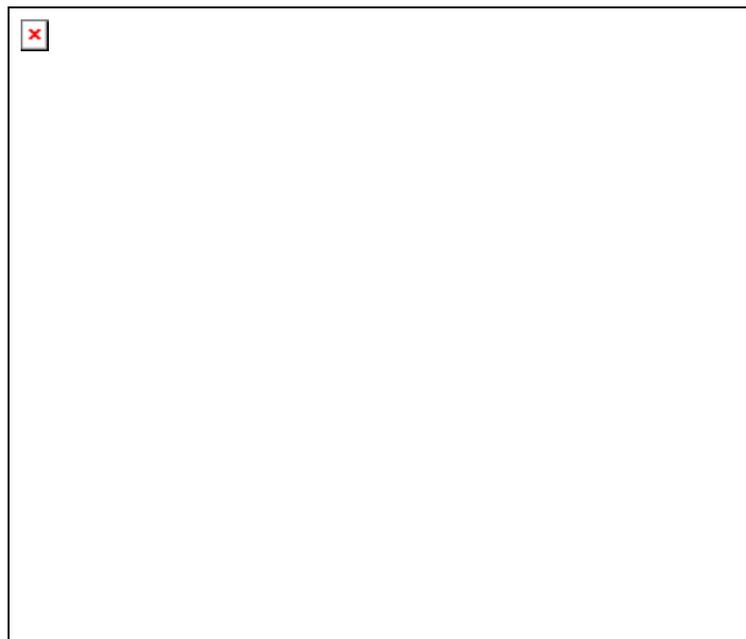


Figura 26: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

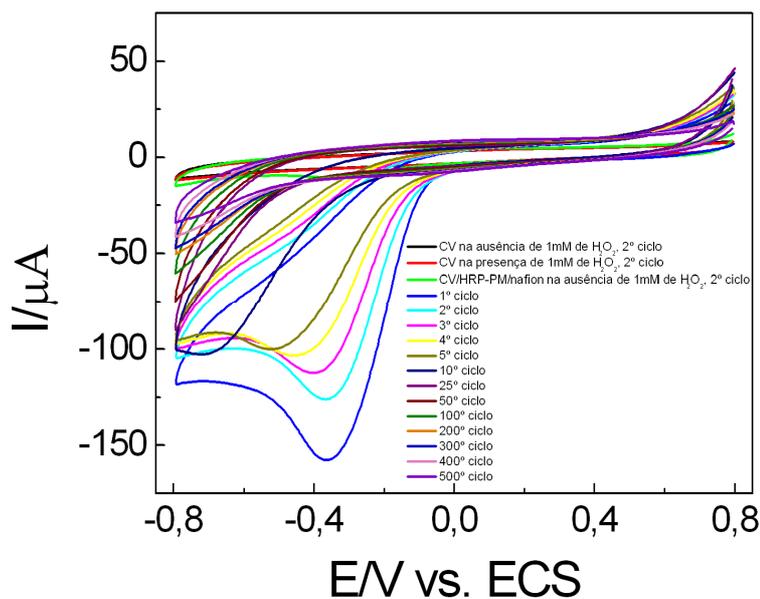


Figura 27: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 contendo 1 mM de H₂O₂, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200$ mV s⁻¹.

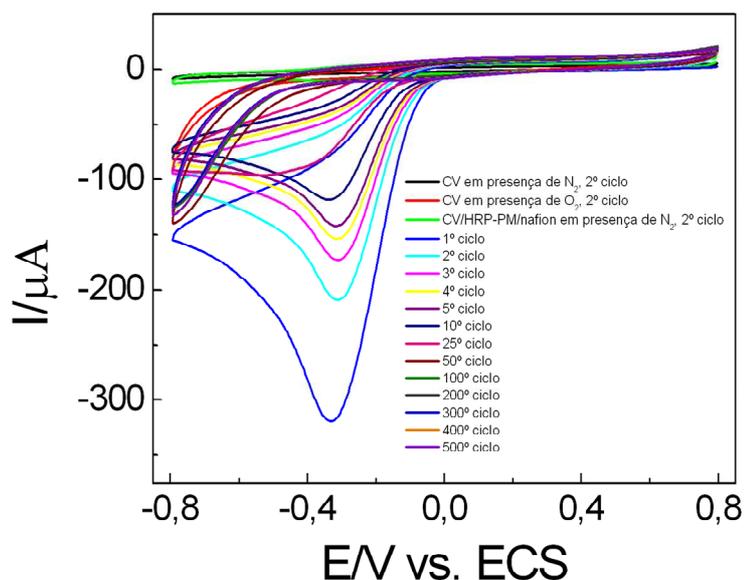


Figura 28: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0, saturado com O₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200$ mV s⁻¹.

O comportamento de todos os ciclos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion é comparável ao já descrito na figura 20. Detecta-se, no entanto, diminuição nas correntes de pico com o aumento do número de ciclos voltamétricos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion (figura 26).

Já os comportamentos dos ciclos iniciais (1^o ciclo) tanto para os eletrodos de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ como em presença de O₂ são comparáveis aos já descritos nas figuras 22 e 24, respectivamente. No entanto, detecta-se

diminuição nas correntes de pico com o aumento do número de ciclo voltamétricos para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ ou em presença de O₂, onde o pico de redução muda o perfil após o 10⁰ ciclo para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂, enquanto que para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de O₂, a onda de redução muda o perfil após o 25⁰ ciclo. É importante frisar que os resultados ciclovoltamétricos mostram que mesmo após 500 ciclos ainda observa-se catálise (correntes de redução pronunciadas) por parte dos eletrodos de CV/HRP-PM/Nafion para a reação de redução de H₂O₂ ou para a RRO, dado que as correntes de redução são maiores do que as correntes do eletrodo de CV para a reação de redução de H₂O₂ (figura 27) ou para a RRO (figura 28). É preciso lembrar que esse comportamento é diferente do comportamento para o eletrodo de CV/HRP em presença de 1 mM de H₂O₂ em presença ou ausência de 1mM de CaCl₂ (ver figuras 18 e A16).

Os resultados apresentados anteriormente reforçam que a mudança conformacional da HRP é minimizada quando a mesma está em presença de PM e recoberta com Nafion, fato essencial para manter a atividade da mesma.

5.8. Avaliação de algumas dependências eletroquímicas a partir dos perfis ciclovoltamétricos e de varredura linear de potencial hidrodinâmico da superfície de CV/HRP-PM/Nafion e CV/HRP em presença de de solução tampão fosfato na presença ou ausência de 1 mM de H₂O₂, ou na presença ou ausência de O₂

Inicialmente faremos uma avaliação (e comparação) das concetrações superficiais (Γ) de HRP para os eletrodos CV/HRP e CV/HRP-PM/Nafion.

As concentrações superfiais (Γ) de HRP foram determinadas por integração da carga referente ao pico catódico dos VC em velocidade de varredura de potencial de 10 mVs⁻¹ ($\Gamma = Q/nFA$ [29], onde Q é a quantidade de carga envolvida na redução (pico catódico) da HRP, n é o número de elétrons envolvidos (n = 1 para o par redox Fe^{III}/Fe^{II}), F é a constante de Faraday, e A é a área geométrica da superfície do CV) (ver figuras A6 e 29). Os valores encontrados foram 1,8 x 10⁻¹⁰ e 5,14 x 10⁻¹⁰ mol cm⁻² para os eletrodos CV/HRP e CV/HRP-PM/Nafion, respectivamente. As diferenças entre os dois valores deve-se ao fato que para o

eletrodo CV/(HRP-PM)/Nafion a HRP foi embebida em PM e depois recoberta por Nafion, o que deve aprisionar uma quantidade um pouco maior de enzimas do que a simples adsorção da HRP em superfície de CV. Esses valores estão na faixa dos valores apresentados em [5] para outras catalases-peroxidases que não HRP e superiores aos apresentados em [9].

Na figura 29 são mostrados os voltamogramas cíclicos em diferentes velocidades de varredura de potencial para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion.

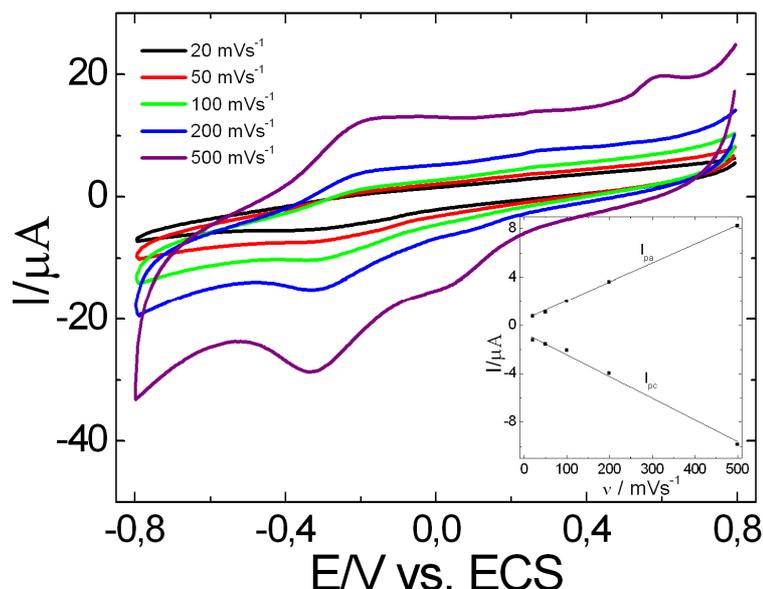


Figura 29: Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Figura inserida: I_{pa} e I_{pc} vs. v

O comportamento observado na figura 29 é similar ao já discutido na figura 20. Além disso, os picos catódico e anódico são aproximadamente simétricos e apresentam magnitudes similares, com uma razão entre I_{pa}/I_{pc} aproximando-se da unidade. Como mostrado na inserção da figura 30, as correntes de pico voltamétricas variam linearmente com a velocidade de varredura de potencial, indicando que o processo não é controlado por difusão, como esperado para sistemas imobilizados [7]. A separação entre os potenciais de pico anódico e catódico está na faixa de 140 mV, sugerindo uma componente cinética envolvida no comportamento voltamétrico da HRP [29].

Nas figuras 31 e 32 são apresentados os resultados para varreduras lineares de potencial hidrodinâmico para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ e O₂, respectivamente.

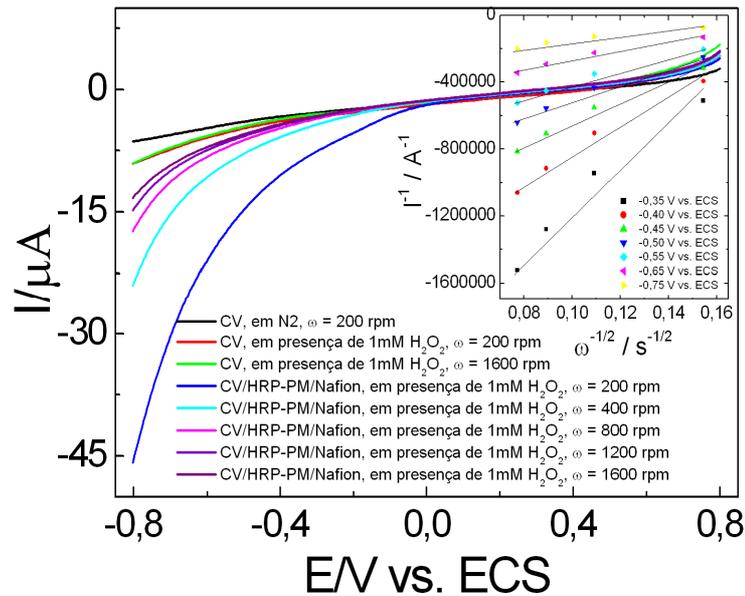


Figura 30: Varreduras lineares de potencial hidrodinâmico para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em presença ou ausência de 1 mM de H_2O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Figura inserida: I^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$ para diferentes potenciais.

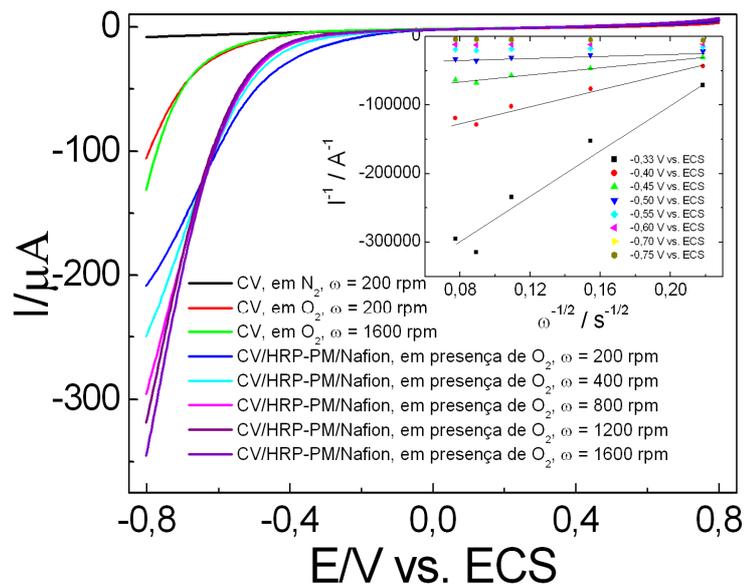


Figura 31: Varreduras lineares de potencial hidrodinâmico para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 ou O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Figura inserida: I^{-1} vs. $\omega^{-1/2}$ para diferentes potenciais.

O comportamento da corrente com o potencial apresenta-se nitidamente catalítico, inclusive já comentado a partir das figuras 23 e 25, no entanto, com o aumento da velocidade de rotação do eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H_2O_2 (figura 31), observa-se uma diminuição nas correntes. Essa diminuição também se apresenta para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de O_2 (figura 32) só que essa diminuição ocorre

em uma dada região de potencial (aproximadamente de 0,0 a -0,6 V) e em outra região de potencial (aproximadamente de -0,6 a -0,8 V) ocorre justamente o oposto, ou seja, elevação da corrente com o aumento da velocidade de rotação desse eletrodo. Esses dois comportamentos distintos sugerem influências cinéticas diferenciadas para os eletrodos de CV/(HRP-PM)/Nafion em presença de 1 mM de H₂O₂ e em presença de O₂. Aparentemente, em presença de O₂, a cinética é mais facilitada, dependendo do potencial, do que em presença de 1 mM de H₂O₂.

Adicionalmente, os gráficos de Koutecky-Levich ($1/I_l$ vs. $1/\omega^{1/2}$, figuras inseridas em 30 e 31) permitem separar os efeitos das limitações de velocidade dentro do filme daquelas de difusão convectiva fora. A corrente limite para a onda voltamétrica é expressa por $1/I_l = 1/I_A + 1/I_F$ onde I_A é simplesmente a corrente de Levich expressando a velocidade de chegada das espécies A na fronteira externa da película ($I_A = 0,62nFAC_A * D_A^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2}$, ver o significado dos termos em [29]) e $1/I_F$ é uma expressão da velocidade máxima em que A pode ser convertida em B no filme. Essa última corrente é o limite em rotação de velocidade infinita, de modo que não há nenhuma limitação no fornecimento de A no limite exterior da estrutura [29]. As respostas de $1/I_l$ vs. $1/\omega^{1/2}$ são bem mais lineares para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de O₂ do que em presença de 1 mM de H₂O₂ reforçando assim uma maior facilidade cinética para a primeira situação.

Objetivando compreender melhor as respostas eletroquímicas até aqui apresentadas, realizamos experimentos de EIE em três potenciais diferentes como será apresentado e discutido em seguida.

5.9. Resultados dos experimentos de EIE para a superfície de CV/HRP-PM/Nafion e CV/HRP em presença de solução tampão fosfato contendo 1 mM de K₃Fe(CN)₆, ou 1 mM de H₂O₂, ou em presença de O₂

O primeiro teste foi realizado em potencial de circuito aberto (em inglês, OCP), figura 32, que foi de cerca de 0,21 V para os eletrodos de CV e CV/HRP (figura 33), e CV e CV/HRP-PM/Nafion (figura 34) na presença de K₃Fe(CN)₆, e depois em -0,35 V (figura 35) e -0,33 V (figura 36) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion, em presença de 1 mM de H₂O₂ e O₂, respectivamente. Estes três valores de potencial constante para os estudos de

EIE foram selecionados para garantir a cobertura de três pontos representativos dos resultados voltamétricos mostrados até aqui [30].

Inicialmente comentaremos as respostas voltamétricas para as figuras 34 e 35 e em seguida retornaremos à figura 32. A figura 33 mostra uma resposta característica do par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em CV. Os picos redox estão centrados em 0,23 V, com aproximadamente 80 mV de separação entre os picos. No entanto, para o eletrodo de CV/HRP em presença de 1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, observa-se principalmente uma mudança nos picos redox agora centrados em 0,19 V, com aproximadamente 170 mV de separação entre os picos. Esses valores são bastante alterados após 500 ciclos em 200 mV s^{-1} principalmente com relação à separação dos picos redox (centrados em 0,25 V), com aproximadamente 500 mV, e com relação às correntes dos picos anódico/catódico decrescidas em aproximadamente 40%. Essa separação dos picos redox além da redução das correntes dos picos anódico/catódico para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em CV/HRP, sugere uma forte influência da HRP adsorvida em CV em alterar a velocidade de transferência de elétron para essa espécie. Já a figura 34 mostra o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em CV centrado em 0,19 V, com aproximadamente 105 mV de separação entre os picos. Agora, para o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, observa-se principalmente uma mudança nos picos redox (centrados em 0,20 V), com aproximadamente 230 mV de separação entre os picos, e com as correntes dos picos anódico/catódico decrescidas em aproximadamente 16%. Esses valores são bastante alterados após 500 ciclos em 200 mVs^{-1} principalmente com relação à separação dos picos redox (centrados em 0,20 V), com aproximadamente 390 mV, e com relação às correntes dos picos anódico/catódico decrescidas em aproximadamente 55%. Essa separação dos picos redox para $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em CV/HRP bem como a diminuição das correntes de pico anódico/catódico sugerem uma forte influência da HRP embebida em PM e recoberta por Nafion, na superfície de CV, em alterar a velocidade de transferência de elétron para essa espécie.

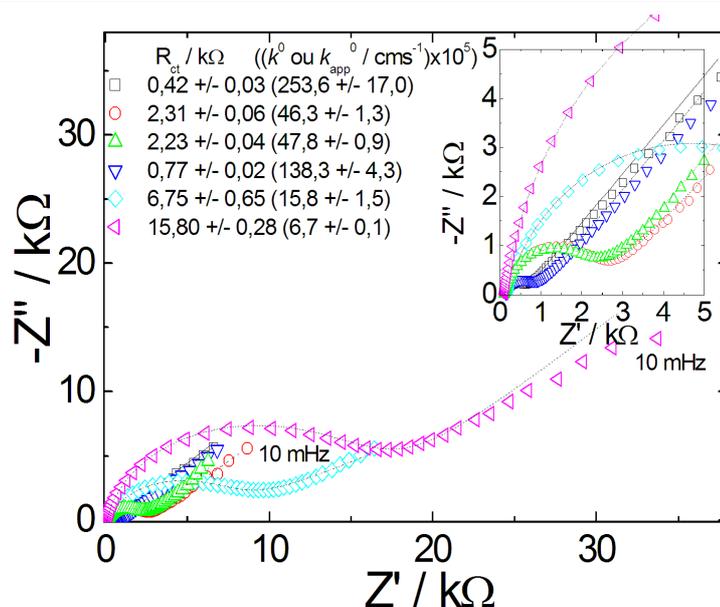


Figura 32: Gráfico de planos de impedância para: CV (\square), CV/HRP (\circ), CV/HRP-PM/Nafion (\triangle), CV após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (∇), CV/HRP após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (ver figura 12) (\diamond), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs⁻¹ (ver figura 24) (\blacktriangleleft), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 contendo 1 mM de K₃Fe(CN)₆, saturado com N₂, e em temperatura aproximada de 0 °C. Potencial de perturbação: 25 mV (rms). Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz. Potencial constante para a aquisição dos EIE: OCP vs. ECS. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente $R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]$, ou $R_s[Q_{dl}(R_{ct}Q_{lf})]$. Valores médios para: $R_s = 127 \Omega$, $Q_{dl} = 6,2 \mu\text{F s}^{-n-1}$, $n = 0,84$, $W_{lf} = 410 \mu\text{F}$.

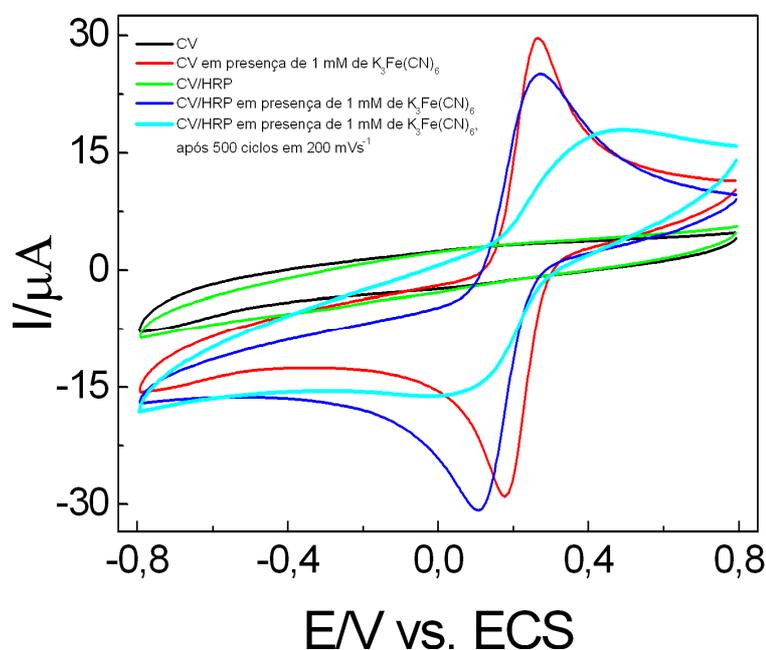


Figura 33: Voltamogramas cíclicos (2 ° ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 5,0 saturado com N₂, em presença ou ausência de 1 mM de K₃Fe(CN)₆, e em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

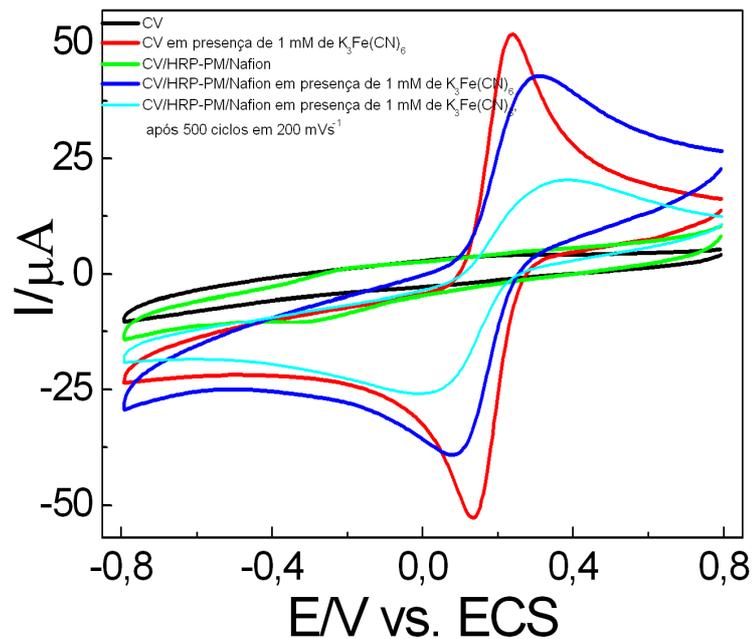


Figura 34: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em presença ou ausência de 1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, e em temperatura aproximada de 0°C . $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

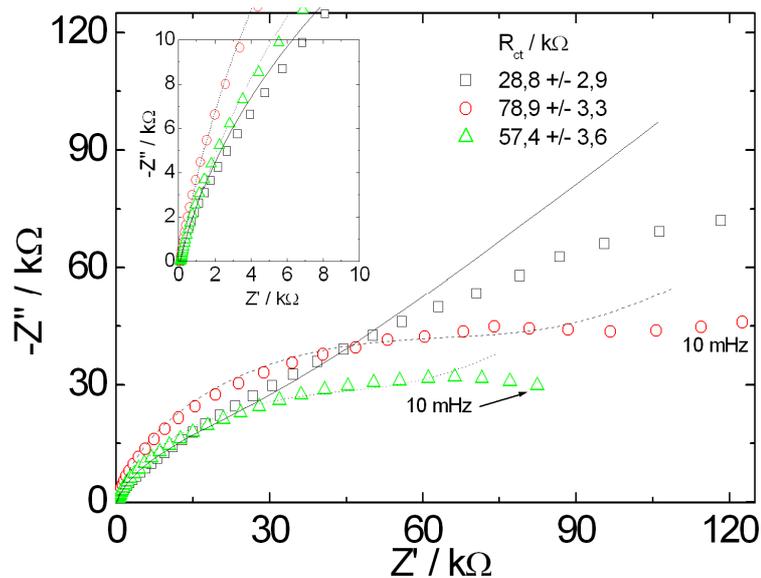


Figura 35: Gráfico de planos de impedância para: CV (\square), CV/HRP-PM/Nafion (\circ), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs^{-1} (\triangle), em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de H_2O_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de 0°C . Potencial de perturbação: 25 mV (rms) . Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz . Potencial constante para a aquisição dos EIE: $-0,35 \text{ V vs. ECS}$. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente $R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]$. Valores médios para: $R_s = 109 \Omega$, $Q_{dl} = 14 \mu\text{F s}^{-n}$, $n = 0,81$, $W_{lf} = 61 \mu\text{F}$.

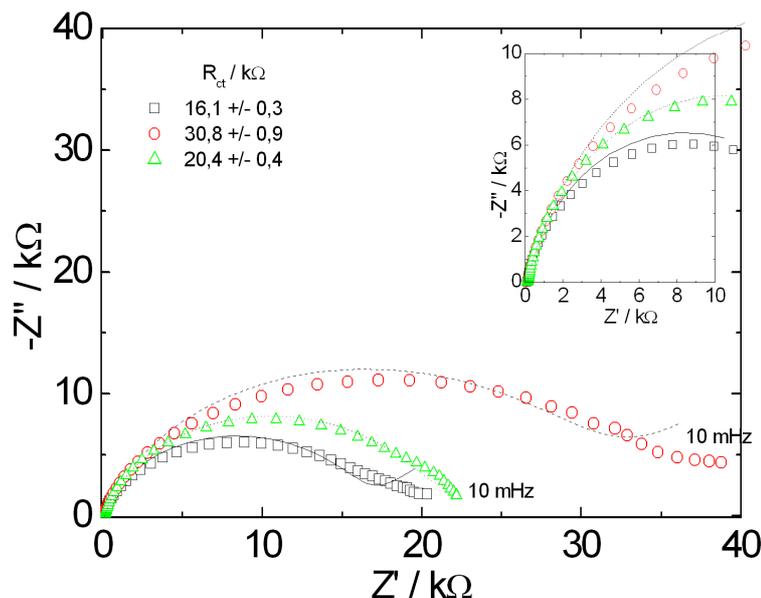


Figura 36: Gráfico de planos de impedância para: CV (\square), CV/HRP-PM/Nafion (\circ), e CV/HRP-PM/Nafion após 500 ciclos em 200 mVs^{-1} (\triangle), em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. Potencial de perturbação: 25 mV (rms) . Faixa de frequência: 100 kHz a 10 mHz . Potencial constante para a aquisição dos EIE: $-0,33 \text{ V vs. ECS}$. As linhas tracejadas representam espectros calculados (ajustado) usando-se um programa de mínimos quadrados não-linear, em conformidade com o circuito equivalente $R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]$. Valores médios para: $R_s = 106 \text{ } \Omega$, $Q_{dl} = 11,7 \text{ } \mu\text{F s}^{n-1}$, $n = 0,84$, $W_{lf} = 877 \text{ } \mu\text{F}$.

Os resultados típicos de EIE são apresentados nas figuras 32, 35 e 36 para os gráficos de plano de impedância complexo, combinando regiões de transferência de massa e controle cinético em baixas e altas frequências, respectivamente [29]. Quando o sistema eletroquímico é cineticamente lento, elevados valores de R_{ct} (em português, resistência de transferência de carga) são encontrados dentro de uma região semicircular bem definida, exibindo uma faixa de frequência limitada em que a transferência de massa é um fator significativo [29] (ver curvas \circ , ∇ , e \diamond , na figura 1 e curvas \square , \circ , e \triangle , na figura 36). Quando R_{ct} é pequena, o sistema é tão fácil cineticamente que a transferência de massa sempre desempenha um papel, e a região semicircular não fica bem definida [29] (ver curvas \square e \triangle na figura 1). O circuito equivalente mais simples de uma célula eletroquímica é um circuito equivalente de Randles constituído por resistores e capacitores [30]. Esse tipo de circuito foi utilizado no presente estudo e se encaixa perfeitamente nos resultados de EIE obtidos (linhas sobre os pontos mostradas nas curvas EIS) [30]. O circuito equivalente utilizado pode ser representado como $R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{lf})]$, ou $R_s[Q_{dl}(R_{ct}Q_{lf})]$, onde R_s representa a resistência da solução, Q_{dl} representa o elemento de fase constante envolvendo um expoente n para representar a C_{dl} (capacitância da dupla camada), W_{lf} representa a impedância de Warburg, indicando um processo controlado puramente por difusão nos limites de baixas frequências [31], e Q_{lf} representa um elemento de fase constante nos limites de baixas frequências. Várias medidas de EIE foram

realizadas com o eletrodo de trabalho em seu potencial médio de equilíbrio, ou seja, em OCP [29,30]. Isso permite que o comportamento linearizado característico de $i-\eta$ descreva a resposta elétrica de partida no equilíbrio, uma vez que a amplitude da perturbação senoidal é pequena [29]. Nesse caso, R_{ct} pode ser relacionado a i_0 (corrente de troca) como $R_{ct} = RT/nFi_0$, onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta, n é o número de elétrons envolvidos na reação no eletrodo e F é o constante de Faraday [29]. Além disso, em condições de equilíbrio, é possível relacionar i_0 com k° (a constante de velocidade heterogênea padrão), como $i_0 = nFAk^\circ C$, onde A é a área do eletrodo e C é a concentração das espécies na solução [29]. Assim, $k^\circ = RT/F^2 R_{ct} AC$ (para a transferência de um elétron) [29,30].

Em vez de basearmos nossa discussão dos resultados de EIE em OCP em R_{ct} , optamos por utilizar os valores calculados k° , pois esse parâmetro fornece uma medida direta da facilidade do processo de transferência de carga [29]. Os dados obtidos em OCP a partir de figura 33 revelam que k° é elevado ($0,002536 \text{ cm s}^{-1}$) para CV, na presença de 1 mM de $K_3Fe(CN)_6$ (valor muito próximo ao encontrado pelo nosso grupo [29] de $0,002663 \text{ cm s}^{-1}$, em similar pH), em comparação com a superfície recoberta com HRP ($0,000463 \text{ cm s}^{-1}$) e à superfície recoberta com HRP-PM/Nafion ($0,000478 \text{ cm s}^{-1}$). Essa diminuição em k_{app}° resulta em aproximadamente 5,5 vezes menor velocidade de transferência de carga em relação a CV, na presença de 1 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Essa constatação é totalmente coerente com as respostas voltamétricas apresentadas nas figuras 33 e 34, e que sugerem uma forte influência da HRP adsorvida ou HRP embebida em PM e recoberta por Nafion, na superfície de CV, em alterar (diminuir) a velocidade de transferência de elétrons para o par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$. É importante reforçar que as duas modificações alteram de forma similar a transferência de elétrons para este par redox, ou seja, a área ativa recoberta no CV é similar para ambas as modificações. A inativação da superfície de CV após 500 ciclos em 200 mV s^{-1} é comprovada pela redução na velocidade de transferência de carga para o par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ em aproximadamente 1,8 vezes ($0,002536 \text{ cm s}^{-1}/0,001383 \text{ cm s}^{-1}$), no entanto este fator de redução é muito menor quando comparado com o eletrodo modificado de CV/HRP que passa pelo mesmo número de ciclagens, aproximadamente 2,9 vezes menor velocidade de transferência de carga para o par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ ($0,000463 \text{ cm s}^{-1}/0,000158 \text{ cm s}^{-1}$), ou seja, a HRP muda de conformação (**não é desorvida**) na superfície do eletrodo e reduz a transferência de carga para o par redox $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ (ver também a figura 33). Essa mudança

de conformação também ocorre para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion visto que ele apresenta valor de k_{app}° 7,1 vezes menor, antes da ciclagem em 200 mV s^{-1} e 2,4 vezes menor que o eletrodo CV/HRP após ciclagem em 200 mV s^{-1} . Isso poderia caracterizar que este eletrodo apresenta-se menos estável quanto a conformação da HRP. No entanto, verificamos que isso não é verdade, pois esses valores de k_{app}° , que estão relacionados à R_{ct} , são menores (os valores de R_{ct}) que os valores para os eletrodos de CV e CV/HRP-PM/Nafion em presença de 1 mM de H_2O_2 (figura 35) e O_2 (figura 36).

Os dados coletados em $-0,33$ ou $-0,35 \text{ V}$ são discutidas agora em termos de R_{ct} (figuras 35 e 36). Para o eletrodo CV, na presença 1 mM de H_2O_2 (figura 35), a R_{ct} é bastante elevada, e é ainda bastante ampliada quando o eletrodo é o CV/HRP-PM/Nafion (2,7 vezes maior). Esse resultado aparenta ser contraditório com o resultado apresentado na figura 22, visto que lá o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion apresenta o pico de corrente de elevada catálise para redução do H_2O_2 justo nesse potencial. No entanto, isso reforça que a bioeletrocatalise envolve a HRP confinada na superfície do eletrodo, e que a cinética da reação de redução de H_2O_2 depende da cinética da HRP, que deve ser lenta, refletindo assim em um valor bastante elevado de R_{ct} . Um fato importante é que com o aumento do número de ciclos voltamétricos, após 500 ciclos em 200 mV s^{-1} em presença de H_2O_2 , observa-se um decréscimo de 1,4 vezes no valor de R_{ct} para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion (fato contrário ao observado para o mesmo eletrodo em presença de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$), sugerindo um aumento na atividade catalítica da HRP com o aumento do número de ciclos voltamétricos, o que pode ser atribuído a alguma mudança conformacional (fato já detectado para o mesmo eletrodo), ou do ambiente nas vizinhanças da HRP. Se usasemos, por aproximação grosseira, a equação que relaciona i_0 com k° , poderíamos estimar os valores de k_{app}° para HRP nas duas situações de uso de CV/HRP-PM/Nafion apresentadas na figura 35. Assim, os valores são $3,4 \times 10^{-6}$ e $4,6 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, reforçando uma forte dependência da cinética da HRP confinada na superfície do eletrodo. Para o eletrodo CV, na presença de O_2 (figura 36), a R_{ct} é elevada – no entanto menor do que em presença de 1 mM de H_2O_2 – e é ainda ampliada quando o eletrodo é o CV/HRP-PM/Nafion (1,9 vezes maior). Novamente, esse resultado aparenta ser contraditório com o resultado apresentado na figura 24, visto que lá o eletrodo de CV/HRP-PM/Nafion apresenta o pico de corrente de elevada catálise para redução de O_2 justo no potencial de $-0,33 \text{ V}$. No entanto, isso reforça novamente que a bioeletrocatalise envolve a HRP confinada na superfície do eletrodo, e que a cinética da reação de redução de O_2 depende também da cinética da HRP, que deve ser lenta, no entanto

maior do que para 1 mM de H_2O_2 , refletindo assim em um valor elevado de R_{ct} . Fato similar ao observado para 1 mM de H_2O_2 é que com o aumento do número de ciclos voltamétricos, após 500 ciclos em 200 mV s^{-1} em presença de O_2 , observa-se um decréscimo de 1,5 vezes no valor de R_{ct} para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion, sugerindo um aumento na atividade catalítica da HRP com o aumento do número de ciclos voltamétricos, o que pode ser atribuído a alguma mudança conformacional, ou do ambiente nas vizinhanças da HRP como já comentado anteriormente. Se usarmos agora uma regra de três simples levando em consideração que para a redução de H_2O_2 estão envolvidos 2 elétrons e para a redução de O_2 a água estão envolvidos 4 elétrons e usarmos os valores de k_{app}^o obtidos para HRP em 1 mM de H_2O_2 (não temos a concentração exata de O_2 em solução) nas duas situações de uso de CV/HRP-PM/Nafion apresentadas na figura 36, teremos os valores de $5,3 \times 10^{-6}$ e $6,5 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, reforçando novamente uma forte dependência da cinética da HRP confinada na superfície do eletrodo, no entanto, mais efetiva para a redução de O_2 em comparação com H_2O_2 .

Os resultados para os cálculos envolvendo os outros elementos que constituem o circuito equivalente $R_s[Q_{dl}(R_{ct}W_{if})]$, apresentados nas legendas das figuras 32, 35, e 36, sugerem uma R_s baixa, em média de 114Ω , resistência essa que não altera as respostas voltamétricas em termos dos potenciais de pico. Os valores de Q_{dl} são em média $10,6 \mu\text{F s}^{n-1}$, ou seja, muito próximo aos valores de capacitância esperados para a dupla camada [30] (C_{dl} , 10-40 centímetros $\mu\text{F cm}^{-2}$ [29]) em eletrodos convencionais [30]. Com valores de n em média igual a 0,83, os valores de Q_{dl} aproximam-se daqueles de C_{dl} [30]. Os valores de W_{if} são elevados (0,410 mF) para os experimentos realizados em presença de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, com valores ainda maiores (0,877 mF) para os experimentos realizados em presença de O_2 , caracterizando forte contribuição de difusão fora ou dentro do filme para essas duas séries de experimentos.

5.10. Uso do eletrodo de CV para estudos de adsorção de HRP

Os resultados apresentados anteriormente suportam a comprovação da ocorrência de adsorção de HRP em CV, fato reportado, para o nosso conhecimento, apenas uma vez na literatura (ref. 9). Foi apresentada na Introdução uma série de argumentos favoráveis ao uso de PGE como eletrodo chave para estudos de adsorção de enzimas (refs. 17 e 18). McCreery [19] em uma revisão cuidadosa comparou as propriedades, por exemplo, de CV com PGE. Detecta-se que PGE é bastante “rugoso” ou “poroso” [17,19] quando comparado ao CV. No

entanto, CV apresenta óxidos superficiais (razão O/C de cerca de 10-15% [19]) que também estão presentes em PGE. Assim, do nosso ponto de vista, o comportamento “promissor” de PGE deve-se muito mais a espaços vazios onde a enzima acaba sendo “confinada” e não propriamente adsorvida, comportando-se assim muito mais como uma enzima em solução [8,16], e que para alguns autores não apresentam determinadas bioeletrocatalises – exigindo mediadores [10] – que são reportadas por outros autores de apresentarem determinadas bioeletrocatalises [23], o que dificultaria sobremaneira o uso dessa enzima como bioeletrocatalisador em células a combustível enzimáticas [14,28] ou em sensores [11].

Pode-se assim concluir:

6. CONCLUSÕES

A HRP adsorve efetivamente em superfície de CV a partir de soluções aquosas tamponadas e apresenta DET com repetibilidade experimental. Não obtivemos um par redox como apresentado por Guo e Gualupe [9] que adsorveram HRP em CV a partir de soluções de HRP/DMSO e HRP/formamida.

As melhores respostas eletroquímicas para HRP adsorvida em CV ocorrem em temperaturas próximas a 0 °C e tampão com pH 5,0.

A HRP é bioeletrocatalítica para a redução de H₂O₂ e essa bioeletrocatalise é melhorada (parcialmente) pela presença de CaCl₂. Essa melhoria deve-se a uma diminuição, durante um intervalo de tempo, na mudança conformacional da HRP devido a presença de CaCl₂.

A adição de polimixina reforça sobremaneira a adsorção de HRP em CV e atua como “polímero” para estabilizar a conformação da mesma. O recobrimento desse filme com uma película de Nafion atua como estabilizador adicional da conformação ativa da HRP. É importante lembrar que Konash e Magner [12] informam que Nafion não prende espécies com pesos moleculares maiores que 10.000 Da. A HRP apresenta 42 kDa [1].

O potencial formal encontrado no presente trabalho para o par redox Fe³⁺/Fe²⁺ foi de aproximadamente -0,217 V vs. ECS e ele está próximo aos valores reportados na literatura [5-7,9]. Não encontramos nenhuma resposta voltamétrica relacionada, por exemplo, as pares redox cpd I/Fe³⁺, cpd I/cpd II ou cpd II/Fe³⁺, diferentemente de outros autores [23].

O eletrodo modificado CV/HRP-PM/Nafion apresentou-se bem mais bioeletrocatalítico para O₂ do que para H₂O₂, observação confirmada por dados de impedância eletroquímica e por varredura linear de potencial hidrodinâmico. Esse mesmo eletrodo quando ciclado inúmeras vezes permanece bioeletrocatalítico tanto para O₂ (melhor bioeletrocatalisador) como para H₂O₂.

Em um cálculo grosseiro e aproximado, usando-se dados de impedância eletroquímica, encontramos valores de k_{app}° de $3,4 \times 10^{-6}$ e $4,6 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹, respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, para o eletrodo CV/HRP-PM/Nafion em presença de H₂O₂, enquanto que para o mesmo eletrodo em presença de O₂, encontramos os valores de $5,3 \times 10^{-6}$ e $6,5 \times 10^{-6}$ cm s⁻¹, respectivamente antes e após vários ciclos voltamétricos, reforçando uma

Conclusões

forte dependência da cinética da HRP confinada na superfície do eletrodo, no entanto, mais efetiva para a redução de O_2 em comparação com H_2O_2 .

O comportamento “promissor” de PGE em detrimento ao CV deve-se muito mais, em nossa visão, a espaços vazios onde a enzima acaba sendo “confinada” e não propriamente adsorvida, comportando-se assim muito mais como uma enzima em solução [8,16], o que dificultaria sobremaneira o uso da HRP como bioeletrocatalisador em células a combustível enzimáticas [14,28] ou em sensores [11].

7. REFERÊNCIAS

- [1] E. E. Ferapontova, Direct peroxidase bioelectrocatalysis on a variety of electrode materials, *Electroanalysis*, **2004**, *16*, 1101-1112.
- [2] H. B. Dunford, Heme peroxidases, Wiley-VCH, New York, **1999**.
- [3] M. Stiborová, M. Mikšanová, V Martínek, E. Frei, Heme Peroxidases: Structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens. A Review, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000**, *65*, 297-325.
- [4] G. Battistuzzi, M. Bellei, C. A. Bortolotti, M. Sola, Redox properties of heme peroxidases, *Arch. Biochim. Biophys.* **2010**, *500*, 21-36.
- [5] Z. Zhang, S. Chouchane, R. S. Magliozzo, J. F. Rusling, Direct voltammetry and catalysis with mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase, peroxidases, and catalase in lipid films, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 163-170.
- [6] M. Oyadomari, H. Shinohara, T. Johjima, H. Wariishi, H. Tanaka, Electrochemical characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Mol. Cat. B. Enz.* **2003**, *21*, 291-297.
- [7] T. Ferri, A. Poscia, R. Santucci, Direct electrochemistry of membrane-entrapped horseradish peroxidase. Part I. A voltammetric and spectroscopic study, *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *44*, 177-181.
- [8] K. Chattopadhyay, S. Mazumdar, Direct electrochemical oxidation of horseradish peroxidase: cycli voltammetric and spectroelectrochemical studies, *New J. Chem.* **1999**, 137-139.
- [9] Y. Guo, A. R. Guadalupe, Direct electrochemistry of horseradish peroxidase adsorbed on glassy carbon electrode from organic solutions, *Chem. Commun.* **1997**, 1437-1438.

- [10] M. Dequaire, B. Limoges, J. Moiroux, J.-M. Savéant, Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase: catalysis and inhibition, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 240-253.
- [11] B. Limoges, J.-M. Savéant, D. Yazidi, Quantitative analysis of catalysis and inhibition at horseradish peroxidase monolayers immobilized on an electrode surface, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9192-9203
- [12] A. Konash, E. Magner, Electrochemically mediated reduction of horseradish peroxidase by 1,1'-ferrocenedimethanol in organic solvents, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1647-1654.
- [13] W. Jia, S. Schwamborn, C. Jin, W. Xia, M. Muhler, W. Schuhmann, L. Stoica, Towards a high potential biocathode based on direct bioelectrochemistry between horseradish peroxidase and hierarchically structured carbon nanotubes, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 10088–10092.
- [14] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- [15] M. S. Mondal, D. B. Goodin, F. A. Armstrong, simultaneous voltammetric comparisons of reduction potentials, reactivities, and stabilities of the high-potential catalytic states of wild-type and distal-pocket mutant (W51F) yeast cytochrome *c* peroxidase, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6270-6276.
- [16] H. A. Heering, J. H. Weiner, F. A. Armstrong, Direct detection and measurement of electron relays in a multicentered enzyme: Voltammetry of electrode-surface films of *E. coli* fumarate reductase, an iron-sulfur flavoprotein, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11628-11638.
- [17] C. F. Blanford, F. A. Armstrong, The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies, *J. Solid State Electrochem.* **2006**, *10*, 826–832.
- [18] C. E. Banks, R. G. Compton, New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite, *Analyst* **2006**, *131*, 15–21.
-

- [19] R. L. McCreery, Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2646–2687.
- [20] E. E. Ferapontova, N. S. Reading, S. D. Aust, T. Ruzgas, L. Gorton, Direct electron transfer between graphite electrode and ligninolytic peroxidases from *Phanerochaete Chrysosporium*, *Electroanalysis*, **2002**, *14*, 19–20.
- [21] D. Wang, L. Chen, Facile direct electron transfer in glucose oxidase modified electrodes, *Electrochim. Acta*, **2009**, *54*, 4316–4320.
- [22] G. H. Jeffery, J. Bassett, J. Mendham, R. C. Denney, *VOGEL: Análise química quantitativa*, Quinta edição, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1992**.
- [23] L. Gorton, E. Csöregi, T. Ruzgas, I. Gazaryan, G. M.-Varga, Enzyme Biosensors Based on Electron Transfer Between Electrode and Immobilized Peroxidases em: *Methods in Biotechnology*, Vol 6 Enzyme and Microbial Biosensors Techniques and Protocols, A Mulchandani, K. R. Rogers (Editores), Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998, Capítulo 8, páginas 93-120.
- [24] A. Schmidt, J. T. Schumacher, J. Reichelt, H.-J. Hecht, U. Bilitewski, Mechanistic and molecular investigations on stabilization of horseradish peroxidase C, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3037-3045.
- [25] Y. Shiro, M. Kurono, I. Morishim, Presence of endogenous calcium ion and its functional and structural regulation in horseradish peroxidase, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9382-9390.
- [26] O. Nozaki, H. Kawamoto, Reactivation of horseradish peroxidase with imidazole for continuous determination of hydrogen peroxide using a microflow injection–chemiluminescence detection system, *Luminescence* **2003**, *18*, 203–206.
- [27] G. Maia, F. C. Maschion, S. T. Tanimoto, K. Vaik, U. Mäeorg, K. Tammeveski, Attachment of anthraquinone derivatives to glassy carbon and the electrocatalytic behavior of
-

the modified electrodes toward oxygen reduction, *J. Solid State Electrochem.* **2007**, *11*, 1411–1420.

[28] K. Sundmacher, *Fuel Cell Engineering: Toward the design of efficient electrochemical power plants*, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2010**, *49*, 10159–10182.

[29] A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, Segunda edição, Wiley: New York, **2001**.

[30] L. B. Venarusso, K. Tammeveski, G. Maia, Versatile charge transfer through anthraquinone films for electrochemical sensing applications, submetido ao *Analytical Chemistry*.

[31] S. Krause, Impedance Methods em *Encyclopedia of Electrochemistry, Volume 3, Instrumentation and Electroanalytical Chemistry*, A. J. Bard, M. Stratmann, P. R. Unwin, Editores, Wiley-VCH: Weinheim, **2003**, Capítulo 2.6, páginas 196-229.

Apêndice

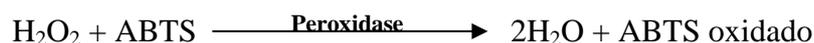
1. Testes Preliminares

Previamente à realização dos experimentos eletroquímicos para avaliação da repetibilidade dos resultados ciclovoltamétricos para o eletrodo de CV modificado com HRP nos diferentes pHs e avaliação do melhor pH de adsorção, foram realizados ensaios para determinação da atividade da HRP em pH 5,0 para verificar a qualidade da enzima de trabalho e teste para afastar possibilidade de contaminação no ambiente de adsorção (geladeira).

1.1 Avaliação da atividade enzimática da HRP

Para avaliação da atividade enzimática da HRP utilizada nos experimentos foi utilizado o ensaio enzimático para peroxidase tendo como substrato ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)) da Sigma.

O ensaio foi realizado em temperatura próxima a 25°C, pH 5,0 e comprimento de onda de 405 nm, e baseia-se no seguinte princípio:



a) Preparação das soluções

Solução A: Solução de tampão fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄) 100 mM, pH 5,0

A solução foi preparada pela dissolução de aproximadamente 1,361 g de KH₂PO₄ em 100 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado até 5,0 pela adição de solução de KOH 1 mol L⁻¹.

Solução B: Solução de ABTS 9,1 mM

A solução foi preparada pela dissolução de 0,04993 g de ABTS em 10 mL da solução A.

Solução C: Solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3% (m/m)

A solução foi preparada imediatamente antes de sua utilização pela dissolução de 0,09 mL de uma solução H₂O₂ 30% em 10 mL de água ultrapura.

Solução D (dilúente da enzima): Solução tampão KH₂PO₄ 40mM com 0,25% (m/v) de albumina de soro bovino e 0,5% (v/v) triton X-100², pH 6,8

A solução foi preparada pela dissolução de aproximadamente 0,54436 g de KH₂PO₄, 0,25 g de albumina de soro bovino e 0,5 mL de triton X-100 em 100 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado até 6,8 pela adição de solução de KOH 1 M.

Solução E: Solução de HRP (1550 unidades mg⁻¹)**Solução estoque:** solução de enzima HRP 10 mg mL⁻¹

A solução foi preparada pela dissolução de 1,00 mg da enzima HRP em 0,1 mL de solução D gelada.

Solução de trabalho: solução de enzima HRP 0,20 - 0,80 unidades mL⁻¹

A solução foi preparada imediatamente antes de sua utilização pela diluição de 2,58 µL da solução estoque em 50 mL da solução D gelada para obtenção uma solução 0,80 unidades mL⁻¹.

b) Procedimento Experimental

Foram pipetados em mililitros (mL) as seguintes soluções e colocados em cubetas de quartzo como apresentado abaixo:

REAGENTES	Cubeta TESTE	Cubeta BRANCO
Solução B (ABTS)	2,90	2,90
Reagente D (dilúente)	-----	0,05
Reagente E(solução de HRP)	0,05	-----

O conteúdo das mesmas foi homogeneizado por inversão e monitorado a 405 nm até absorvância constante a aproximadamente 25 °C. Em seguida foi adicionado a cada cubeta

Apêndice

0,10 mL da solução C (H₂O₂). Imediatamente após foram homogeneizadas por inversão e a absorbância das mesmas foi acompanhada em 405 nm por 3 minutos, para obtenção da máxima absorbância que ocorre no final do primeiro minuto de reação e resultou no valor de 0,857.

Para cálculo da atividade enzimática foi utilizada a seguinte equação:

$$(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Teste} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Branco})(3,05)(fd)$$

$$\text{unidades mL}^{-1} \text{ de enzima} = \frac{\quad}{(36,8)(0,05)}$$

Onde:

$$(\Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Teste} - \Delta A_{405\text{nm}}/\text{min Branco}) = \text{valor máximo de absorbância (0,857)}$$

3,05= volume final na cubeta (em mL)

fd= fator de diluição (1000)

36,8= fator de extinção do ABTS em 405nm (em mM)

0,05= volume de enzima usado (em mL)

Substituindo os valores:

$$\text{unidades/mL de enzima} = (0,857)(3,05)(1000)/(36,8)(0,05)$$

$$\text{unidades/mL de enzima} \sim 1420$$

$$\text{unidades/mg sólido} = \text{unidades/mL de enzima/mg sólido/mL de enzima}$$

$$\text{unidades/mg sólido} = 1420/1,00\text{mg de enzima}$$

$$\text{unidades/mg sólido} \sim 1420$$

O resultado obtido demonstrou que a enzima utilizada nos experimentos encontra-se em bom estado de conservação, comparada às especificações do fabricante, que é de 1550 unidades mg⁻¹ de sólido, apresentando baixo decaimento de atividade apesar de permanecer em estoque por um período considerável.

1.2. Resultados ciclovoltamétricos para avaliação da possibilidade de contaminação do ambiente de adsorção (geladeira) em solução tampão fosfato

Para a avaliação da possibilidade de contaminação do ambiente de adsorção (geladeira) no eletrodo de CV, após limpeza e renovação da superfície eletródica, o eletrodo foi preparado mediante aplicação de aproximadamente 100 μL de solução tampão 0,1 mol L^{-1} com pH 5,0 em sua superfície, recoberto com parafilme e levado a geladeira por 3 h.

Na figura A são apresentados os voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para CV/tampão em presença apenas de tampão 0,1 mol. L^{-1} com pH 5,0.

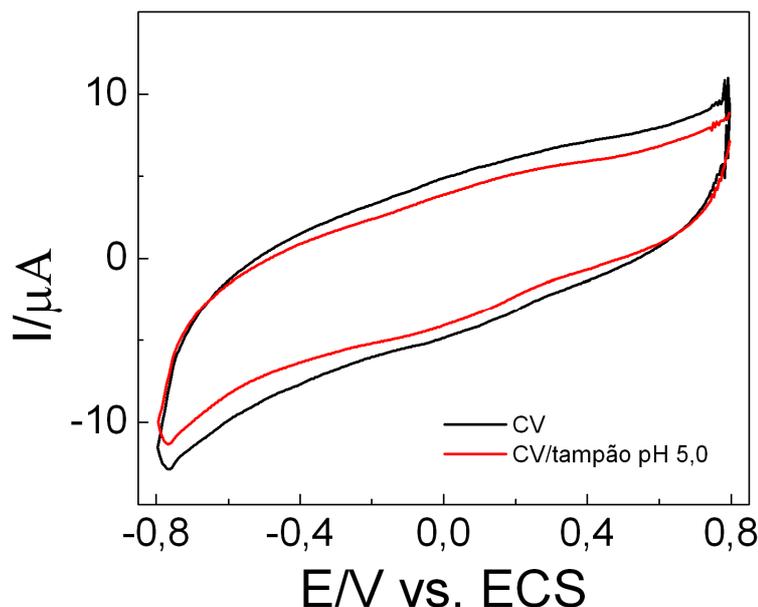


Figura A: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH 5,0 saturado com N_2 em temperatura aproximada de 0 °C. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se na figura que o perfil ciclovoltamétrico do tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} com pH 5,0 obtido logo após a renovação da superfície eletródica de CV é em geral o mesmo do perfil ciclovoltamétrico obtido para a superfície eletródica após 3 h de adsorção com a mesma solução tampão, demonstrando que as ondas (picos) obtidas após formação dos eletrodos modificados CV/HRP ou CV/HRP-PM/Nafion são mesmo de uma transferência eletrônica entre a HRP e a superfície de CV e não de um possível contaminante existente no ambiente (geladeira).

1.3 Análise da solução de peróxido de hidrogênio (30%)

Para avaliar a real concentração da solução de peróxido de hidrogênio utilizada como substrato da HRP nos experimentos eletroquímicos, a mesma foi analisada pelo método de permanganimetria apresentado na literatura [22]. A solução apresentou concentração real de 29,5% estando de acordo com a concentração especificada pelo fabricante.

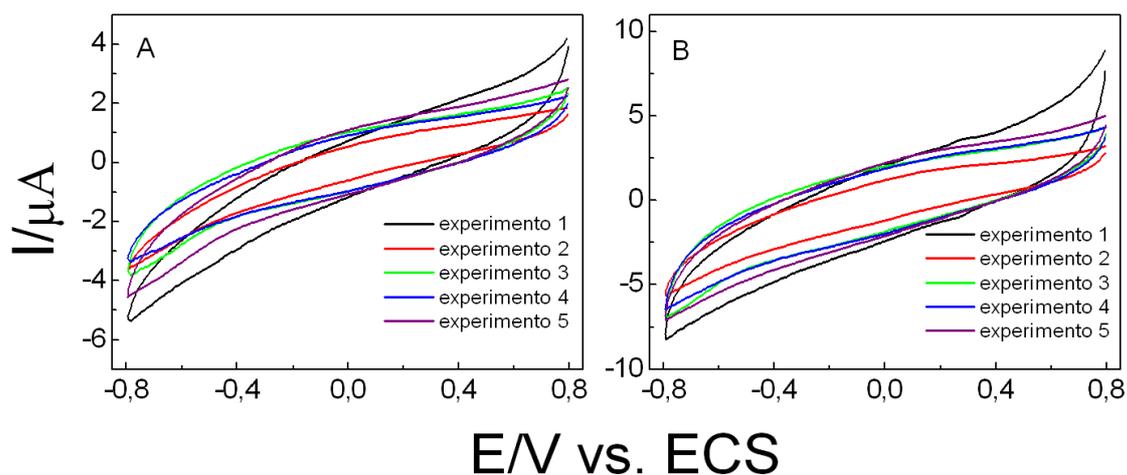


Figura A1: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

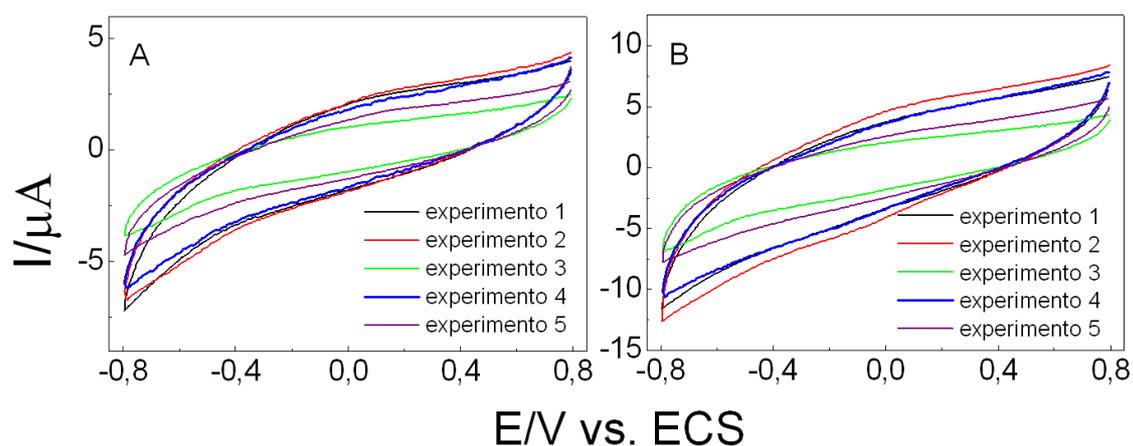


Figura A2: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

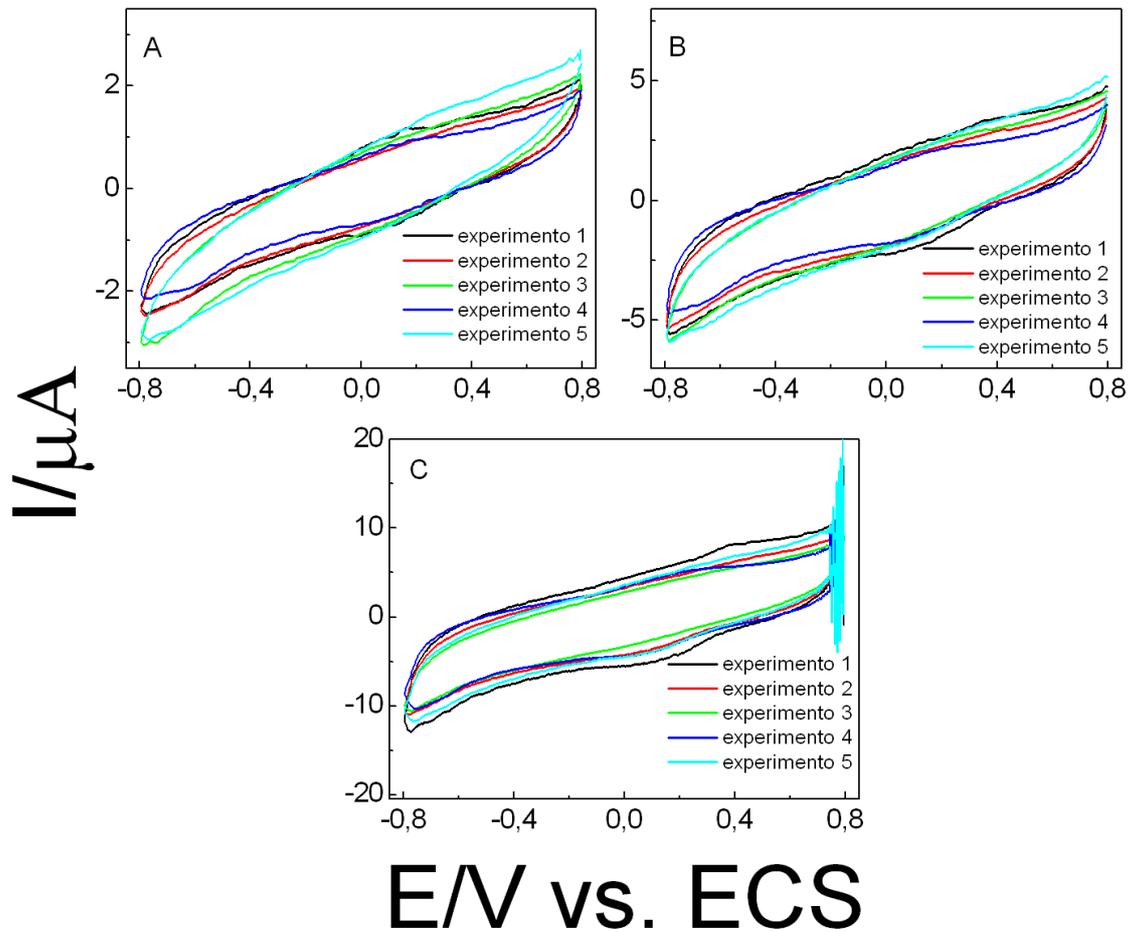


Figura A3: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 4,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

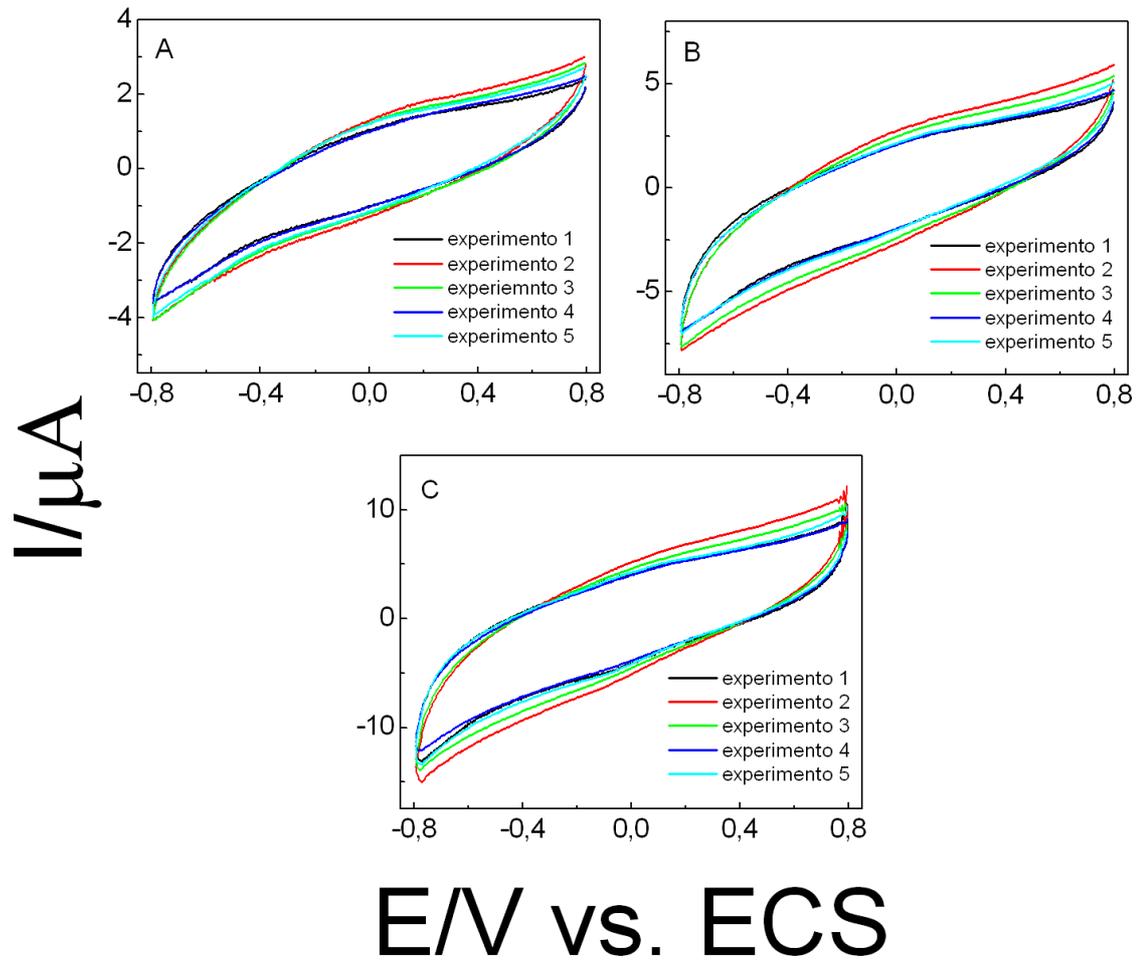


Figura A4: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

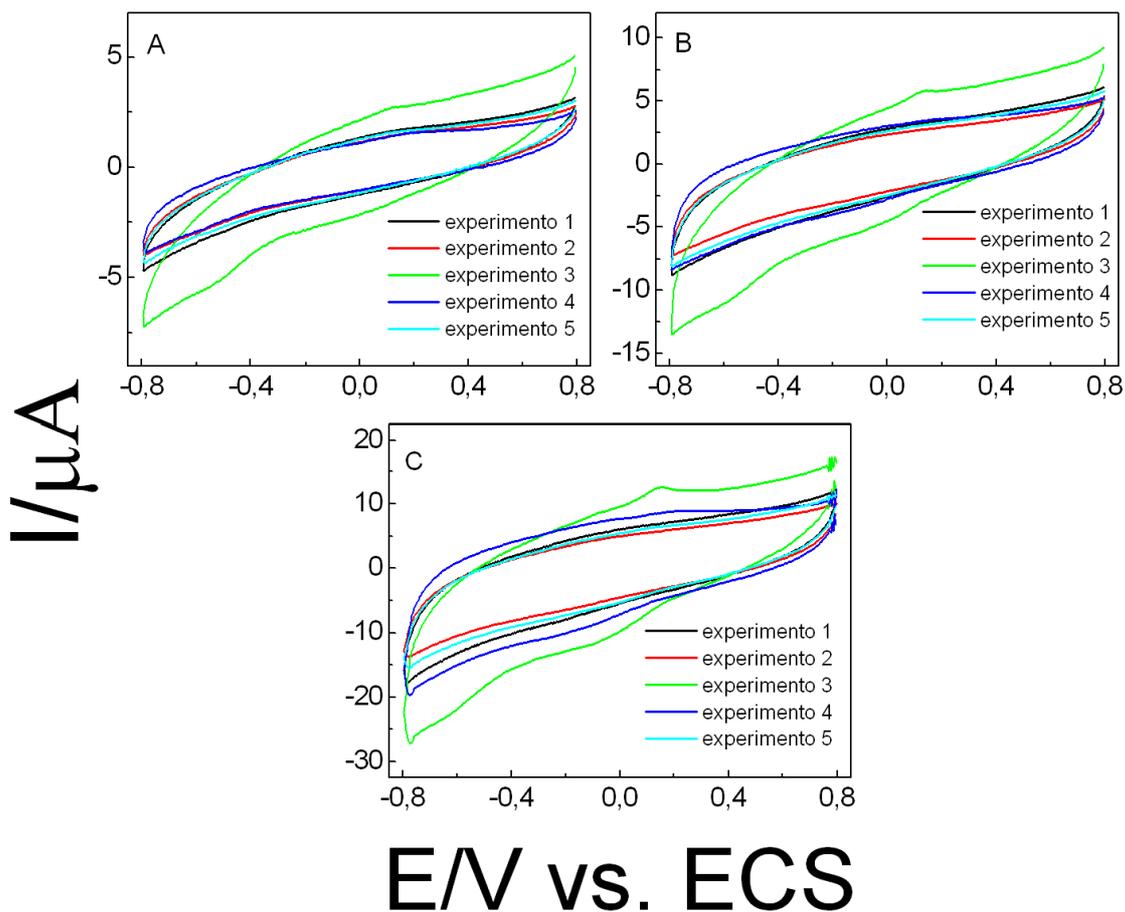


Figura A5: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 8,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e após limpeza da superfície do eletrodo de CV. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

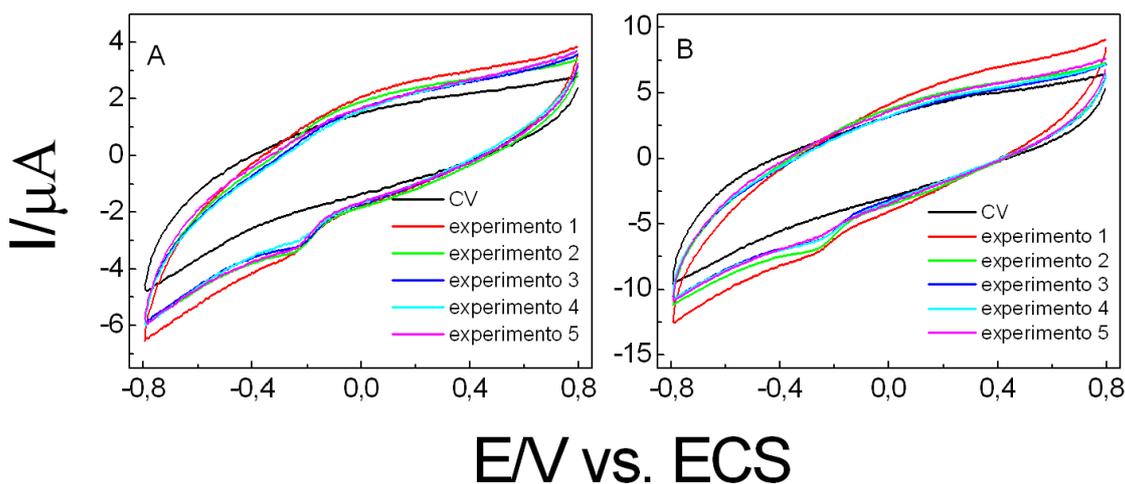


Figura A6: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

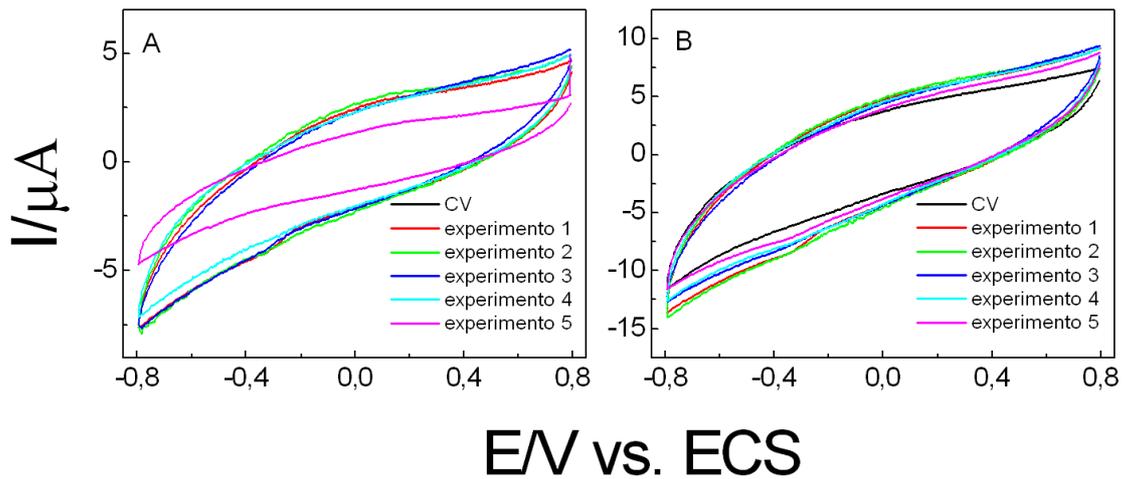


Figura A7: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

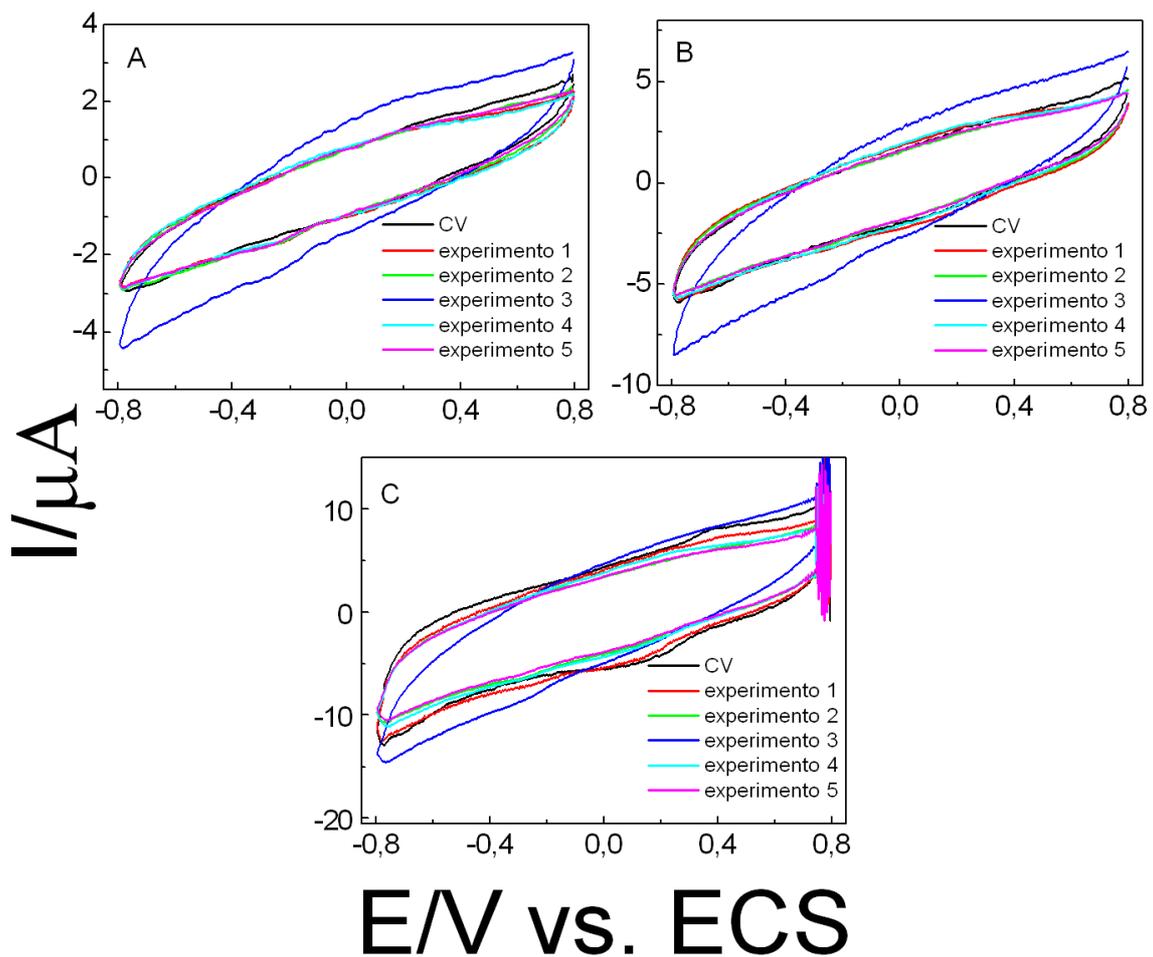


Figura A8: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 4,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

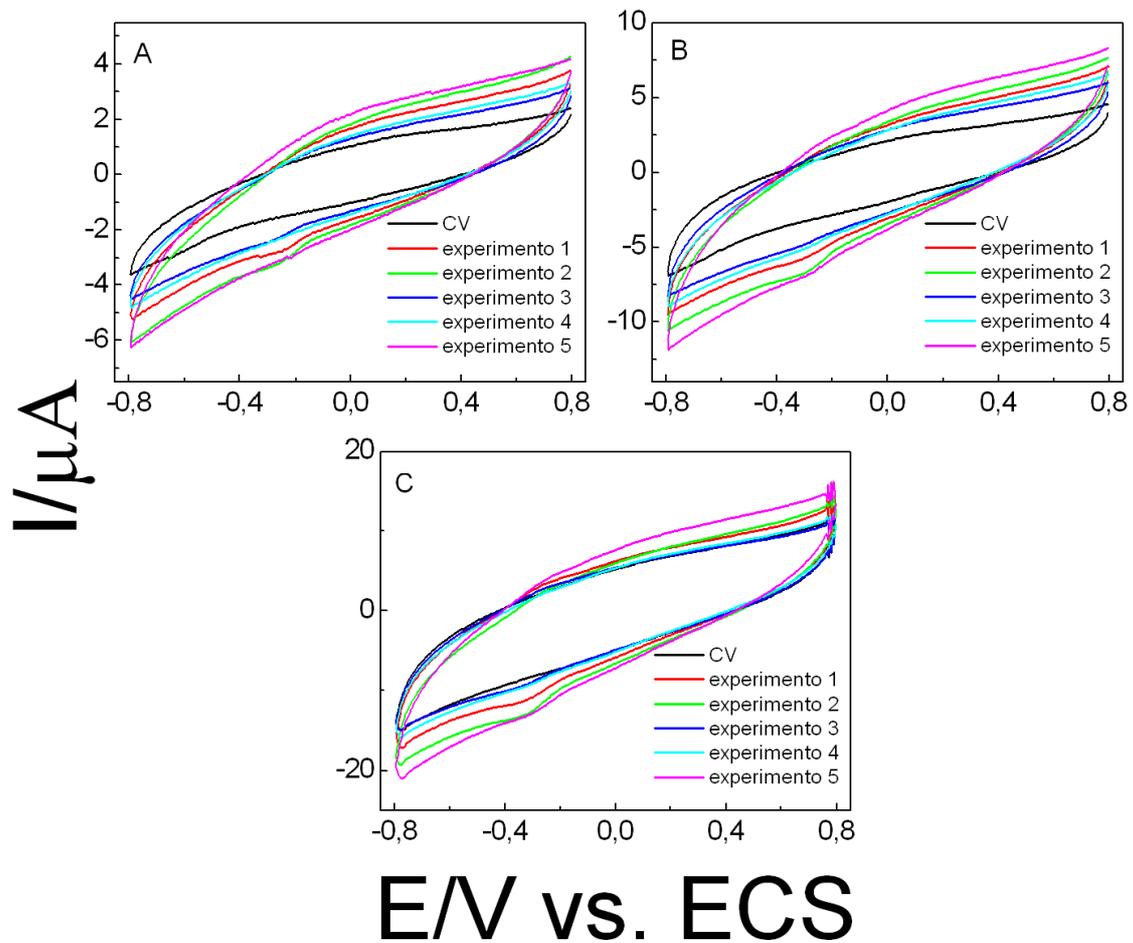


Figura A9: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 6,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$

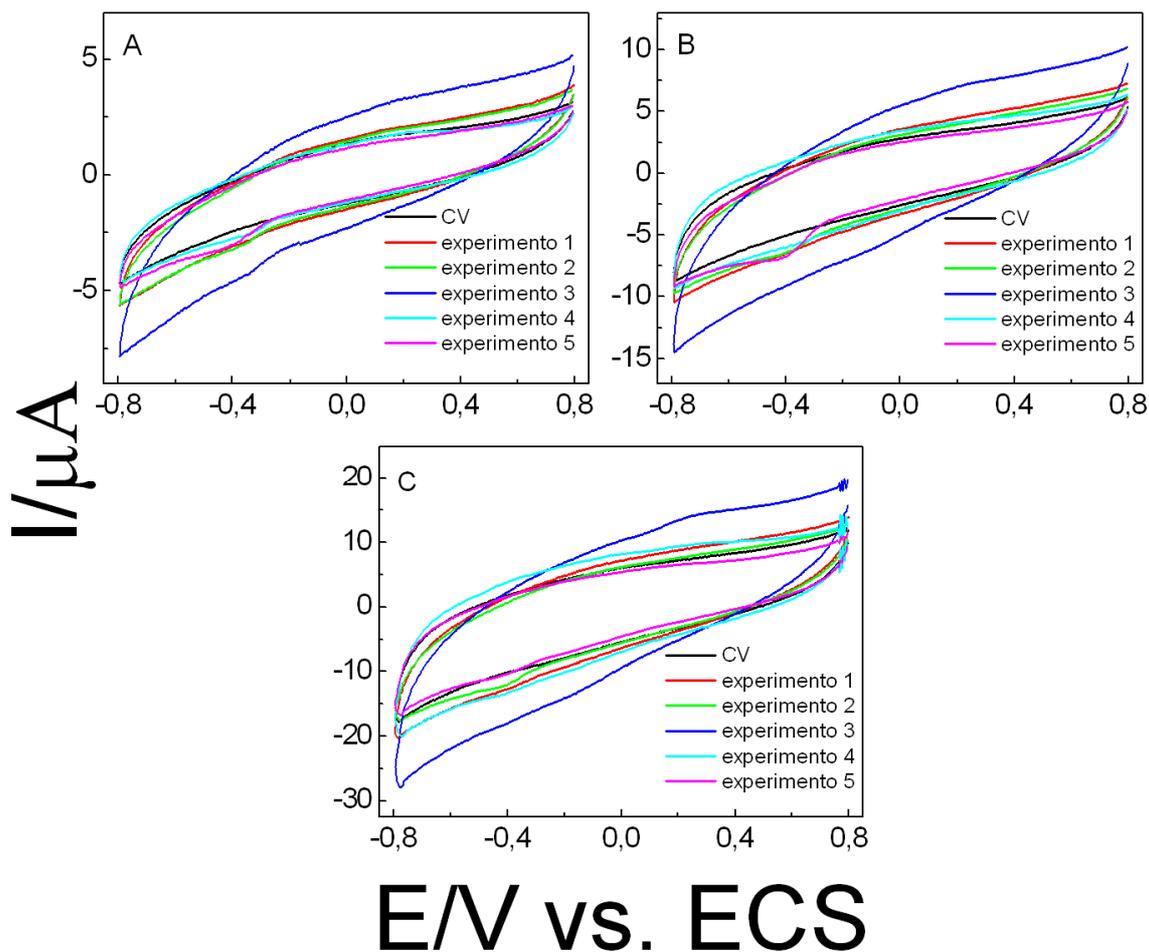


Figura A10: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 8,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

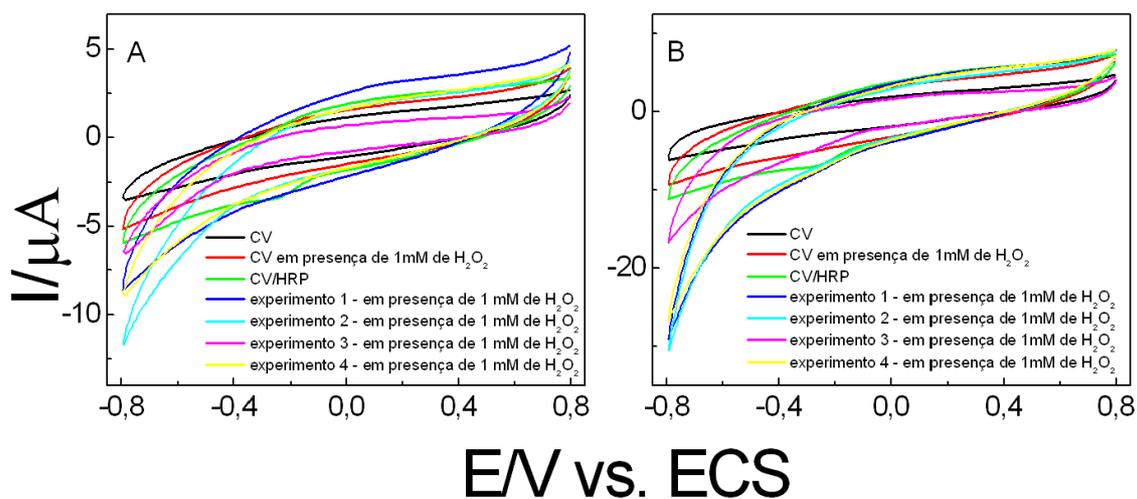
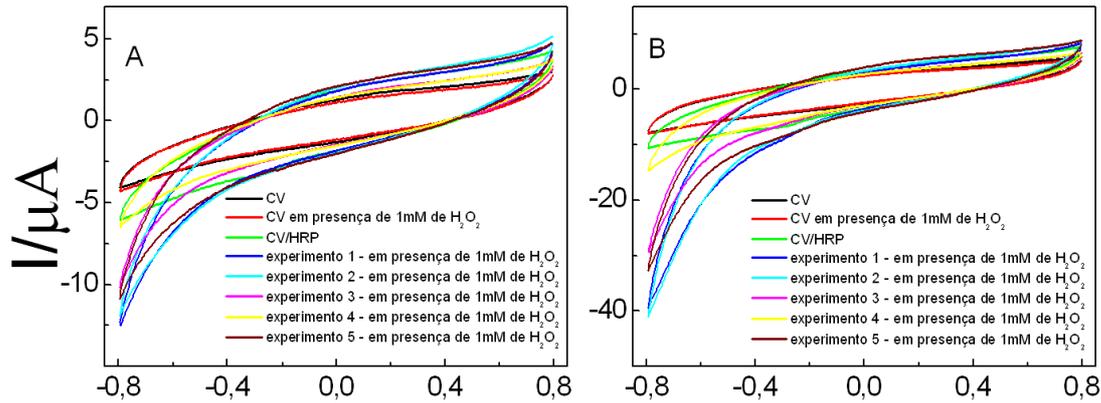
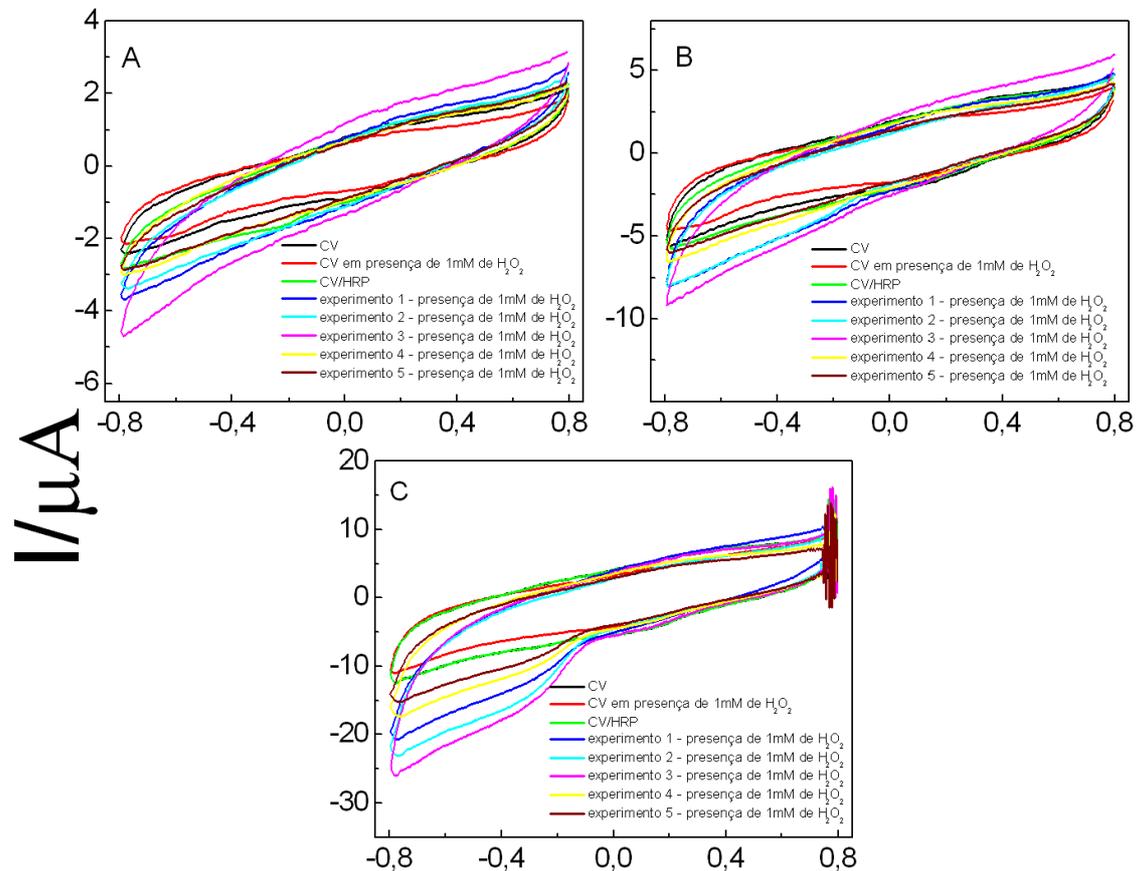


Figura A11: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para quatro experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



E/V vs. ECS

Figura A12: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 6,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



E/V vs. ECS

Figura A13: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ com pH 4,0 saturado com N₂, em temperatura aproximada de 0 °C, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

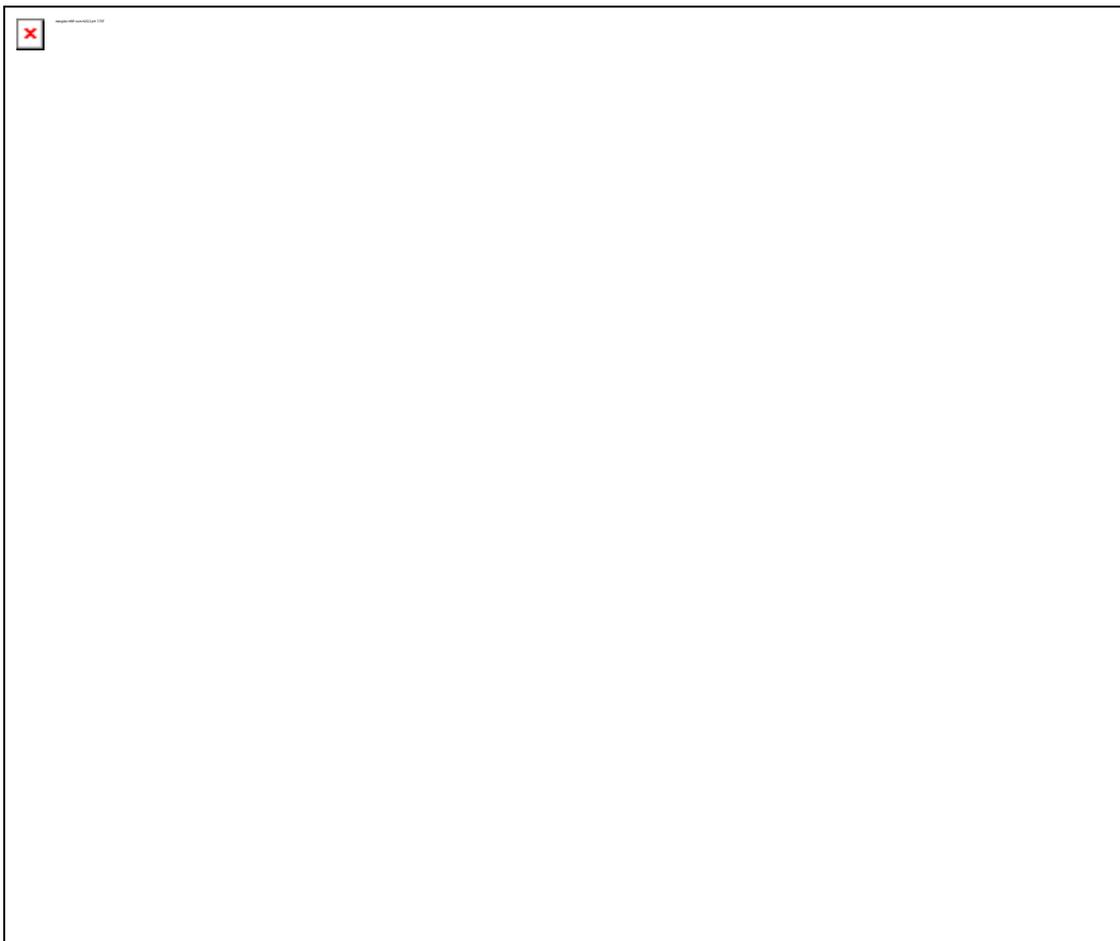


Figura A14: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

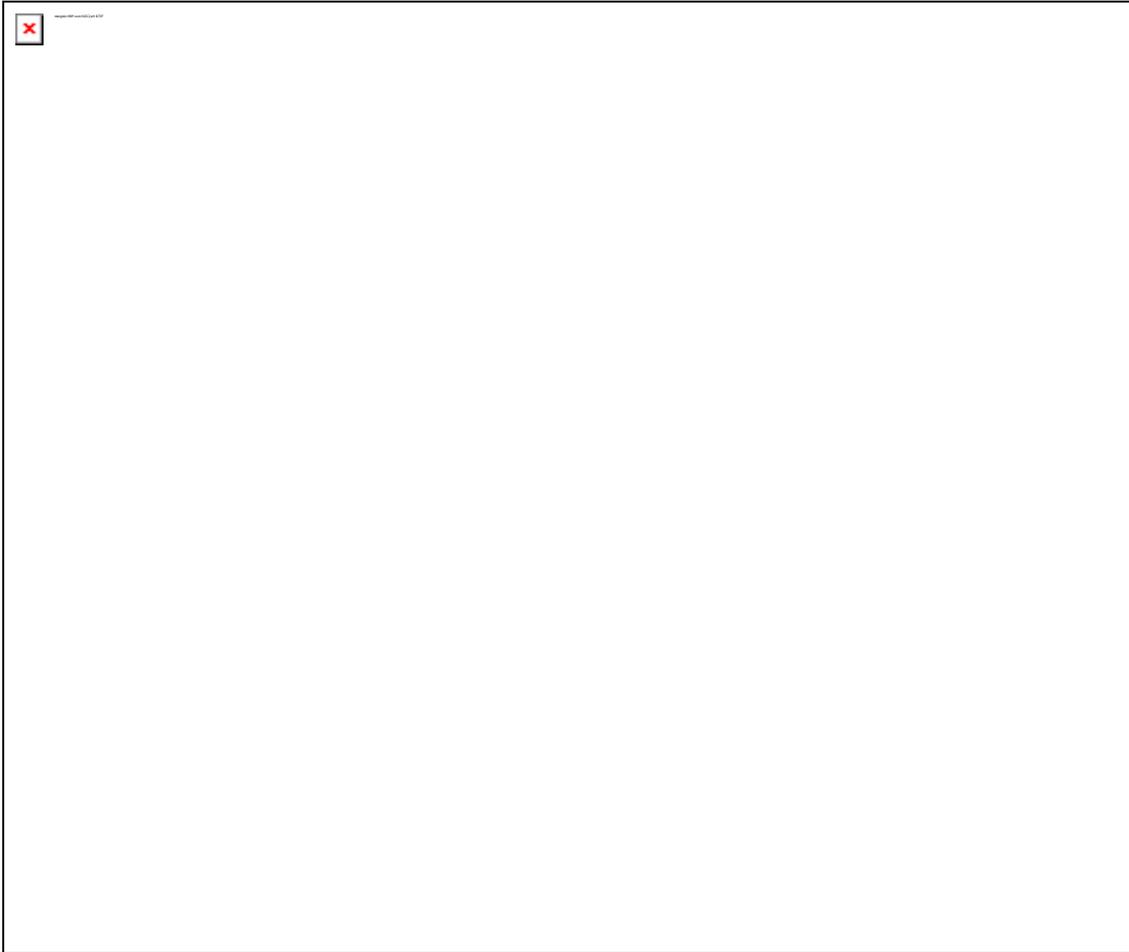


Figura A15: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 8,0 saturado com N_2 , em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$, para cinco experimentos realizados em diferentes dias e em novos eletrodos de CV/HRP. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, C) $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

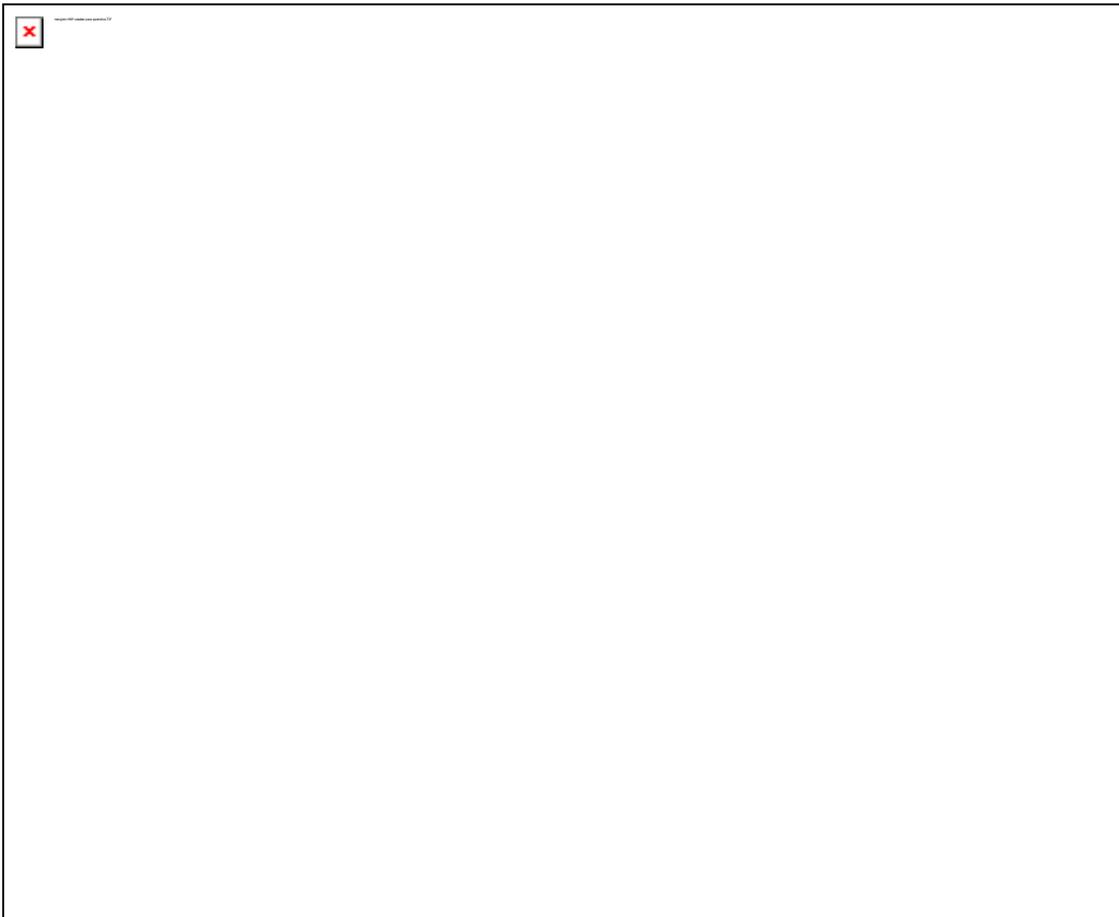


Figura A16: Voltamogramas cíclicos contínuos para o eletrodo de CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0 contendo 1 mM de H_2O_2 , saturado com N_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.

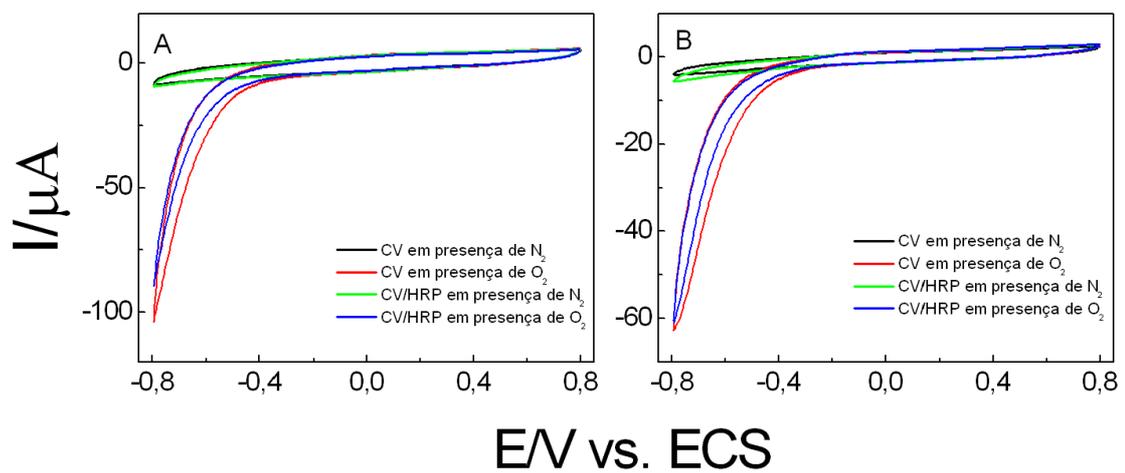


Figura A17: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV e CV/HRP em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença ou ausência de O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. A) $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, B) $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

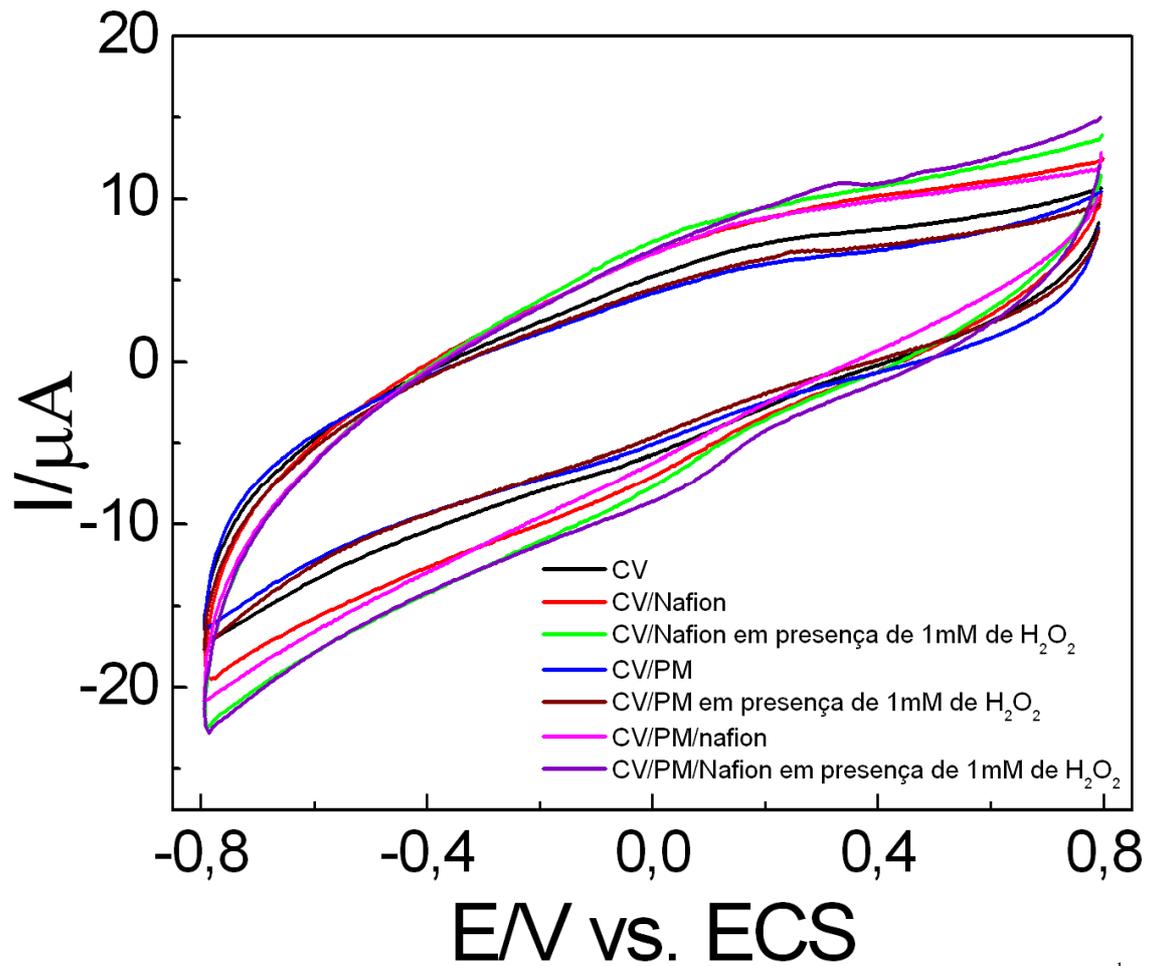


Figura A18: Voltamogramas cíclicos (2º ciclo) para os eletrodos de CV em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 5,0, em presença de 1 mM de H_2O_2 , e em temperatura aproximada de $0 \text{ }^\circ\text{C}$. $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$.