

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E HUMANAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS  
AVANÇADOS

ROBERTA MARTINS DA COSTA BIANCHI

COMPOSTOS PEPTÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA DIRETA  
IMOBILIZAÇÃO DA UREASE

Santo André - SP  
2015

Roberta Martins da Costa Bianchi

COMPOSTOS PEPTÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA DIRETA  
IMOBILIZAÇÃO DA UREASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados da Universidade Federal do ABC como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Nanociências e Materiais Avançados. Linha de Pesquisa: Materiais Nanoestruturados.

Orientador: Prof. Dr. Wendel Andrade Alves

Santo André – SP

2015

Bianchi, Roberta Martins da Costa  
COMPOSTOS PEPTÍDICOS NANOESTRUTURADOS PARA DIRETA  
IMOBILIZAÇÃO DA UREASE / Roberta Martins da Costa Bianchi.  
— 2015.

114 fls. : il.

Orientador: Wendel Andrade Alves

Tese (Doutorado) — Universidade Federal do ABC, Programa  
de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados,  
Santo André, 2015.

1. Micro/nanoestruturas. 2. Peptídeos. 3. Ureia. 4.  
Nanotubos de Carbono. I. Alves, Wendel Andrade. II. Programa  
de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados,

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, 01 de Março de 2016.

Assinatura do  
autor: \_\_\_\_\_

Assinatura do  
orientador: \_\_\_\_\_



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Fundação Universidade Federal do ABC**  
**Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais Avançados**  
Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP  
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017  
pbg.nanomat@ufabc.edu.br

### FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Roberta Martins da Costa Bianchi, realizada em 8 de dezembro de 2015:

Prof.(a) Dr.(a) **Wendel Andrade Alves** (UFABC) – Presidente

Prof.(a) Dr.(a) **Janaina de Souza Garcia** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Everaldo Carlos Venancio** (UFABC) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Zeki Naal** (USP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Maria Valnice Boldrin Zanoni** (UNESP) – Membro Titular

Prof.(a) Dr.(a) **Mauro Coelho dos Santos** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Daniel Zanetti de Florio** (UFABC) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Silmara das Neves** (USF) – Membro Suplente

Prof.(a) Dr.(a) **Lucia Codognoto de Oliveira** (UNIFESP) – Membro Suplente



Universidade Federal do ABC

## Dedicatória

Aos meus pais, Claudinê e Sandra  
(*in memoriam*), ao meu marido  
Eduardo pelo apoio incondicional,  
por todo carinho e confiança.

## Agradecimentos

• Ao meu orientador professor Dr. Wendel Andrade Alves pela dedicação, entusiasmo, paciência, muito obrigada!!!

• Aos meus pais Claudinê e Sandra (*In memoriam*) pela educação que me deram, por sempre estarem ao meu lado, seja perto ou longe. Amo e sempre amarei vocês!

• Ao meu marido Eduardo Bianchi sem você esse trabalho não teria sido concluído, obrigada pelo amor, carinho, suporte emocional, paciência e por me ensinar a levar a vida com mais tranquilidade. TE AMO!

• A minha irmã Paloma sempre companheira, meu cunhado Alexandre e meu sobrinho Luan, muito obrigada pelos momentos de imensa alegria.

• A minha amiga e mãedrastra Lúcia, obrigada pela imensa ajuda em todos os momentos, seu lugar está guardado no céu!

• Aos meus tios Celso e Eliana, meus primos Ester e Guilherme, por todo o suporte, pelas conversas, risadas, paciência e acreditarem que tudo daria certo. Eternamente Grata!

• Aos meus professores da graduação Carla Polo Fonseca e Silmara Neves, por todos os ensinamentos desde a iniciação científica.

• Ao meu professor e amigo Fábio Augusto do Amaral, jamais esqueceria meu primeiro semestre da graduação, obrigada pelas conversas de incentivo, e pelos momentos de muita descontração.

• A minha amiga Maria Isabel da Silva Rotella, (Bel) agradeço a Deus por ter conhecido você, muito obrigada por todos esses anos de amizade, ensinamentos, por todos os momentos alegres e descontraídos e também pelos momentos tristes que já passamos juntas!

• A minha amiga Vânia, obrigada por sempre acreditar em mim, e acreditar em nós, que tudo daria certo desde o nosso início na graduação, pelos momentos descontraídos e divertidos.

• Ao meu amigo Garbas, jamais esquecerei sua recepção no meu primeiro dia de iniciação científica, muito obrigada por todos os momentos que te liguei e você me socorreu.

• Aos meus amigos do Lcam, Laboratório de caracterização de materiais (eterno Lcam) - Elaine, Pamela e Ricardo....Tudo vale a pena quando a alma não é pequena.....Obrigada!

• Minha amiga e massoterapeuta Ana Paula Massaro por me propiciar momentos relaxantes com suas mãos de fadas. Eternamente grata.

• Ao pessoal do ônibus fretado Santa Rita, em especial ao nosso querido motorista Alexandre que em muitos momentos me esperou quando eu estava atrasada, vindo de Santo André.

• Ao meu querido amigo e companheiro de fretado, Fernando Porfírio, agradeço imensamente tudo o que aprendi com as nossas longas e divertidas conversas durante nosso trajeto de volta para casa.

• As minhas companheiras de quarta-feira, Eliane, Fabíola e Eleusa, pelo apoio e tranquilidade que me passaram.

• Aos meus amigos Sergio Kogikoski e Michelle Liberato, pelas longas conversas sobre a vida, sobre ciência, pelas noites em claro no laboratório, pelas risadas e puxões de orelha que já levamos, realmente foram momentos muito divertidos.

• A todos os amigos (alunos e ex alunos) do LEMN, muito obrigada.

• Ao grupo de pesquisa, Bruna Miranda Soares Ferrante, Carla Cristina Decandio, Clovis Ananias da Silva, Emerson Rodrigo da Silva, Enrique Arias Arciniegas, Irina Marinho Factori, Juliana dos Santos de Souza, José Eduardo Ulloa Rojas, Márcia Isabel de Souza Prado, Michelle da Silva Liberato, Sandra Valéria Vassiliades, Sérgio Kogikoski Jr, Sivoney Ferreira, Thiago de Carvalho Cipriano, e Wendel Andrade Alves.

• Universidade Federal do ABC e ao programa de Pós-Graduação de Nanociências e Materiais Avançados pela possibilidade de realizar este trabalho e utilização de espaço físico.

• Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo, FAPESP pela bolsa concedida e suporte financeiro (2011/05374-0).

• Ao LNNANO - CNPEM pelo uso das instalações e aos técnicos pelo suporte e treinamentos nos equipamentos.

• A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este momento.



*Saudade é o Amor que Fica!*

*Rogério Brandão*

## Resumo

Com o desenvolvimento da nanociência e nanotecnologia tem sido possível construir e manipular diferentes materiais na escala nanométrica para as mais diversas aplicações como: em medicina, em cosméticos, dispositivos eletrônicos, sensores, biossensores, entre outras. Neste trabalho, apresentamos um estudo baseado na auto-organização de micro/nanoestruturas de peptídeo (MNTs-FF), via fase sólida-vapor, sobre um eletrodo de ouro modificado com 4-mercaptopiridina (Au/MCP), visando aplicação para detecção de ureia. Estudamos a influência do solvente no processo de nanoestruturação do peptídeo e observamos que o arranjo estrutural na qual a MNTs se cristaliza interfere fortemente na estabilidade do eletrodo, sendo a estrutura ortorrômbica  $P22_12_1$ , obtida em vapor de anilina, mais estável do que a hexagonal  $P6_1$ , em vapor de água. Essa diferença estrutural é a chave para o bom desempenho do sensor, porque fornece uma interface contendo sítios de nitrogênio e oxigênio capaz de estabelecer ligações com a piridina do substrato (Au) e com os íons amônio e ureia, via interações cátions  $\pi$  e ou ligações de hidrogênio, apresentando valor de sensibilidade e limite de detecção para ureia de aproximadamente  $81,3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$  e  $0,06 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. A funcionalização das MNTs-FF com polianilina e pireno permitiu o ancoramento covalente da enzima urease à superfície do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF, com sensibilidade e limite de detecção frente a detecção de ureia de  $30,0 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$  para o eletrodo contendo PANI/Urs, e  $4,57 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$  para o eletrodo pireno/Urs respectivamente. As MNTs-FF sintetizadas na presença de nanotubos de carbono (NTc) não apresentaram alteração morfológica, porém, estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) apontaram uma diminuição na resistência à transferência de carga para o três sistemas estudados: Au/MCP/MNTs-FF, Au/MCP/NTc/MNTs-FF, Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs,  $R_{tc}$  35,0, 0,80, 0,14 k $\Omega$ , respectivamente, apresentando sensibilidade e limite de detecção frente a detecção de ureia de  $1,5 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  respectivamente.

**Palavras-Chave:** Micro/nanoestruturas de FF, fase sólida-vapor, polianilina, nanotubos de carbono.

## Abstract

The development of nanoscience and nanotechnology open up possibilities for the building and construction of distinct materials in the nanometric scale for many different application, such as: in medicine, cosmetics, electronic devices, (bio) sensors, among others. In this work, we presented the self-assembly of peptide micro/nanostructures based in diphenylalanine (MNTs-FF), via solid-vapor phase, on gold electrode modified with 4-mercaptopyridine (Au/MCP), for urea sensing. We studied the influence of the solvent on the peptide self-assembly process, and observed that the structural arrangement in which the MNTs-FF crystallizes strongly influences the electrode stability, the orthorhombic  $P22_12_1$  structure were obtained under aniline vapor, that is more stable than the hexagonal  $P6_1$  obtained under water vapor interaction. This structural difference is the key to the good sensing performance, because it provides an appropriate interface, containing nitrogen and oxygen sites able to establish bonds with the pyridine, and the ammonium ion or urea molecule, via cation  $\pi$  interactions and or hydrogen bonds, with the sensitivity and detection limit for the urea sensing of  $\sim 81.3 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  and  $0.06 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectively. The functionalization of MNTs-FF with polyaniline and pyrene allowed the covalent anchoring of the enzyme urease the surface of the electrode Au/MCP/MNTs-FF, with sensibility and detection limit for urea sensing of  $30.0 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  and  $0.17 \text{ mmol L}^{-1}$  for the PANI/Urs, and  $4.57 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  and  $0.15 \text{ mmol L}^{-1}$  for the pyrene/Urs electrode respectively. The MNTs-FF synthesized in the presence of carbon nanotubes (NTC) showed no morphological change, however, studies of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) showed a decrease in charge transfer resistance for the three systems studied, Au/MCP/MNTs-FF, Au/MCP/NTc/MNTs-FF, Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs,  $R_{tc}$  35,0, 0,80, 0,14 k $\Omega$ , respectively, the sensibility and detection limit for urea detection of  $1.5 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  and  $0.1 \text{ mmol L}^{-1}$  respectively.

**Keywords:** Micro/nanostructure FF, solid-vapor, polyaniline, carbon nanotubes

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação da estrutura de nanotubos de carbono (a) parede simples e (b) parede múltipla [13].	19
<b>Figura 2.</b> Método <i>via</i> fase sólida-vapor para obtenção de nanoestruturas de L-L-difenilalanina [34].	21
<b>Figura 3.</b> (A) Representação estrutural (em 2D) da estrutura química da subunidade peptídica do nanotubo de peptídeo de ciclo $[-(D-Ala-Glu-D-Ala-Gln)_2]$ . (B) Configuração nanotubular automontada com empilhamento antiparalelo. As ligações de hidrogênio são mostradas por linhas pontilhadas. [Adaptado Ref. [35]].	22
<b>Figura 4.</b> (A) Fórmula estrutural e (B) Estrutura tridimensional do peptídeo L,L-difenilalanina [40].	23
<b>Figura 5.</b> Representação de uma plataforma de peptídeos plicados como sensor para diversas análises. [Adaptado ref [28]].	24
<b>Figura 6.</b> (A) Representação esquemática de um sensor baseado em peptídeo conjugado com um fluoróforo sensível ao ambiente. (B) Espectros de fluorescência em solução tampão de HEPES 10 mM e NaCl 100 mM, pH 7,6. Emissão (○) antes e após a adição de seis equivalentes de ciclina A (●). O detalhe mostra a curva com quantidades crescentes de ciclina A. [Adaptado das ref. [28, 43], respectivamente.	26
<b>Figura 7.</b> Esquema ilustrando o ensaio eletroquímico do PSA ativo sobre um eletrodo de ouro contendo peptídeo funcionalizado com ferroceno (FC). (A) Automontagem de sonda de peptídeo-FC sobre a superfície do eletrodo de ouro (i) e leitura eletroquímica da atividade redox do ferroceno (ii). (B) Clivagem proteolítica específica de peptídeos na superfície do eletrodo de ouro na presença de PSA ativo, que reconhece e cliva a sequência mostrada na parte inferior. (C) Remoção dos segmentos de peptídeo-FC clivado a partir da superfície do eletrodo (iii) e leitura eletroquímica do FC que permaneceu sobre a superfície do eletrodo de ouro (iv) [Adaptado Ref. [44]].	27
<b>Figura 8.</b> Representação da enzima urease: (A) estrutural e (B) 3D [51].	29
<b>Figura 9.</b> (A) Imagem de TEM de um tubo de peptídeo automontado revestido com partículas magnéticas. Imagens de SEM: (B) dos tubos magnéticos automontados. (C), disposição horizontal dos tubos magnéticos automontados após exposição a um campo magnético. (D) Representação esquemática dos tubos magnéticos automontados. (E e F) Representações esquemáticas dos tubos magnéticos orientados aleatoriamente antes da exposição ao campo magnético (E) e horizontalmente alinhados em exposição ao campo magnético (F) [58].	31
<b>Figura 10.</b> (A) Estudos de simulação computacional mostrando moléculas de hipericina empilhadas na superfície do nanotubo. Em destaque, visão ampliada da superfície do nanotubo (em verde) e as interações entre as moléculas de hipericina e do nanotubo peptídeo. (B) Imagens de SEM e (C) Imagens de fluorescência [57].	32
<b>Figura 11.</b> Ilustração da síntese do filme amorfo.	36
<b>Figura 12.</b> Fórmula estrutural da molécula de tiol 4-mercaptopiridina (MCP).	46
<b>Figura 13.</b> Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro puro e em diferentes tempos de exposição à solução de MCP. Eletrólito NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> , velocidade de varredura 25 mV s <sup>-1</sup> .	47

<b>Figura 14.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) eletrodo de ouro puro. (B) eletrodo de ouro modificado, após 120 minutos imersos em solução de MCP. Linha branca tracejada corresponde a ampliação dos buracos indicados pela seta branca (barra de escala 1 $\mu\text{m}$ ). .....	<b>48</b>
<b>Figura 15.</b> Voltamograma cíclico referente à dessorção da MCP (eletrodo imerso em 120 minutos n solução de MCP). Eletrólito NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> , velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> . .....	<b>49</b>
<b>Figura 16.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura das mico/nanoestruturas (MNTs-FF) obtidas em vapor de água (A e C). Vapor de anilina (D e F). .....	<b>51</b>
<b>Figura 17.</b> Representação do possível mecanismo de formação das micro/nanoestruturas [69, 70]. .....	<b>51</b>
<b>Figura 18.</b> Histogramas de distribuição de diâmetro das micro/nanoestruturas obtidas em: (A) Vapor de água e (B) Vapor de anilina. ....	<b>53</b>
<b>Figura 19.</b> Difratoograma da micro/nanoestrutura de L,L-difenilalanina (MNTs-FF) sintetizada sob vapor de água. O símbolo x representa os dados observados experimentalmente (observado). O refinamento de Rietveld (linha vermelha) representa o modelo calculado, A linha azul mostra a diferença entre os dados observados e calculados. Os traços em magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase hexagonal ( $P6_1$ ). .....	<b>54</b>
<b>Figura 20.</b> (A) Grupo espacial $P6_1$ representado ao longo da direção do eixo c. Moléculas de água localizadas no canal interno do tubo do peptídeo em que aparecem ligadas por linhas sólidas que delimitam a célula unitária. (B) Detalhe das moléculas de água que mostra a estrutura dispostas ao longo do eixo c formando uma cadeia infinita organizada numa conformação em hélice. ....	<b>55</b>
<b>Figura 21.</b> Difratoograma das MNTs-FF sintetizadas sob vapor de anilina. O símbolo x representa os dados observados experimentalmente (observado). O refinamento de Rietveld (linha vermelha) representa o modelo calculado, A linha azul mostra a diferença entre os dados observados e calculados. Os traços em magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase ortorrômbica $P22_12_1$ . .....	<b>56</b>
<b>Figura 22.</b> Estrutura cristalina obtida a partir do refinamento, a linha sólida delimita a célula unitária $P22_12_1$ . ....	<b>57</b>
<b>Figura 23.</b> Espectros vibracionais para as MNTs-FF sintetizadas em vapor de água e vapor de anilina. ....	<b>58</b>
<b>Figura 24.</b> Voltamograma cíclico para os eletrodos Au/MCP/MNTs-FF sintetizado em (A) vapor de vapor de água e (B) vapor de anilina, o detalhe corresponde ao voltamograma sem adição de $\text{NH}_4\text{OH}$ . Os ensaios foram conduzidos a 25 mV s <sup>-1</sup> em NaOH 0, 1 mol L <sup>-1</sup> pH 10 com sucessivas adições de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	<b>62</b>
<b>Figura 25.</b> Voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro puro. Os ensaios foram conduzidos a 25 mV s <sup>-1</sup> em NaOH 0, 1 mol L <sup>-1</sup> pH 10 com sucessivas adições de $\text{NH}_4\text{OH}$ . ....	<b>64</b>
<b>Figura 26.</b> Voltamograma de onda quadrada do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF sintetizado em vapor de anilina com adições de $\text{NH}_4\text{OH}$ (0,1 a 1,5 mmol L <sup>-1</sup> ). O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de íons amônio na corrente de pico anódica. Eletrólito NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Frequência 50 Hz, Amplitude de pulso 70 mV e $\Delta E_s$ 2 mV. ....	<b>65</b>
<b>Figura 27.</b> Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF sintetizados em vapor de anilina com adições de ureia (0,1 a 1,5 mmol L <sup>-1</sup> ) em eletrólito NaOH 0,1 mol L <sup>-1</sup> . (A) voltamograma cíclico, velocidade de varredura 25 mV s <sup>-1</sup> . (B) Voltamograma de onda quadrada. O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de ureia na corrente de pico anódica. Frequência 50 Hz, Amplitude de pulso 70 mV e $\Delta E_s$ 2 mV. ....	<b>67</b>

<b>Figura 28.</b> Mecanismo proposto para a hidrólise da ureia utilizando o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF. ....	<b>70</b>
<b>Figura 29.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as MNTs-FF:na ausência (A) e na presença (B e C) de PANi (carga de deposição = 5 mC). ....	<b>72</b>
<b>Figura 30.</b> Voltamogramas cíclicos de caracterização do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni a 25 mV s <sup>-1</sup> . Eletrólito H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 mol L <sup>-1</sup> . ....	<b>72</b>
<b>Figura 31.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A e B) eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni recoberto com glutaraldeído. (C e D) eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/G recoberto com enzima urease. ....	<b>75</b>
<b>Figura 32.</b> Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urease. Sensibilidade de resposta obtida para a oxidação da ureia em solução tampão 0,1 mol L <sup>-1</sup> referente à variação de pH. Medidas obtidas em potencial de amplitude = 70 mV, frequência = 50 Hz e ΔEs = 2 mV. ....	<b>76</b>
<b>Figura 33.</b> Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urs. Efeito da carga de PANi sobre a para a oxidação da ureia em solução tampão 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Medidas obtidas em potencial de amplitude = 70 mV, frequência = 50 Hz e ΔEs = 2 mV. ....	<b>77</b>
<b>Figura 34.</b> Voltamograma de onda quadrada. O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de ureia na corrente de pico anódica. Frequência 50 Hz, Amplitude de pulso 70 mV e ΔEs 2 mV. Eletrólito solução tampão 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,2. ....	<b>78</b>
<b>Figura 35.</b> Estrutura molecular do ácido 1-pireno butírico (Py) [99]. ....	<b>79</b>
<b>Figura 36.</b> Mecanismo de ação do EDC-NHS na formação da ligação amida [101]. ....	<b>80</b>
<b>Figura 37.</b> Diagrama de Nyquist indicando a região de transferência de carga, difusão semi-infinita e a saturação de carga [103]. ....	<b>82</b>
<b>Figura 38.</b> (A) Circuito equivalente (modelo de Randles) para medidas de espectroscopia de impedância em uma célula eletroquímica. (B) Circuito equivalente para processos não faradaicos [62]. ....	<b>83</b>
<b>Figura 39.</b> Espectroscopia de impedância eletroquímica para os diferentes eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF (—), Au/MCP/MNTs-FF/Py (—), Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs (—); No detalhe: Circuito elétrico de Randles. (B) Ampliação referente às regiões de altas frequências para o eletrodo sem funcionalização com Py. Tensão de corrente alternada: 5 mV de amplitude. Intervalo de frequência: 1 Hz a 10 <sup>5</sup> Hz. Eletrólito: solução contendo 5,0 mmol L <sup>-1</sup> de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl. ....	<b>84</b>
<b>Figura 40.</b> SWV do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7,2), contendo diferentes concentrações de ureia. Frequência 50 Hz, Amplitude 70 mV e ΔEs 2 mV. No detalhe: Densidade de corrente <i>versus</i> concentração de ureia. ....	<b>85</b>
<b>Figura 41.</b> Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) dos eletrodos obtidos na AUSÊNCIA dos NTc (A) e na PRESENÇA dos NTc (B,C), denominados Au/MCP/NTc/MNTs-FF. ....	<b>86</b>
<b>Figura 42.</b> Espectros vibracionais obtidos na ausência Au/MCP/MNTs-FF (—) e na presença Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—) dos NTc, respectivamente. ....	<b>88</b>
<b>Figura 43.</b> Espectro Raman deNTC de parede simples metálico e semiconductor usando um laser de excitação 785 nm, mostrando o modo de respiração radial e banda G [106]. ....	<b>89</b>
<b>Figura 44.</b> Espectros Raman (A) Au/MCP/MNTs-FF (—), NTc (—) e Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—). Espectros deconvoluídos (B-D), utilizando funções de Lorentz no software Origin 9.0®. ....	<b>90</b>
<b>Figura 45.</b> Molécula de FF adsorvida na estrutura do grafeno pristino [110]. ....	<b>92</b>

<b>Figura 46.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes eletrodos: Au/MCP/MNTs-FF (—), Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—) e Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs (—). No detalhe: Comparação entre todos os eletrodos. Eletrólito contendo 5,0 mmol L <sup>-1</sup> de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl.....	<b>93</b>
<b>Figura 47.</b> Diagrama de Nyquist para os eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF (-), (B) Au/MCP/NTc/MNTs-FF (-), (C) Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs (-). Tensão de corrente alternada: 5 mV de amplitude. Intervalo de frequência: 10 <sup>-2</sup> Hz a 10 <sup>5</sup> Hz. Eletrólito contendo 5,0 mmol L <sup>-1</sup> de [Fe(CN) <sub>6</sub> ] <sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol L <sup>-1</sup> de KCl.....	<b>94</b>
<b>Figura 48.</b> Medidas de ângulo de contato para os eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF, (B) Au/MCP/NTc/MNTs-FF, (C) Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs. ....	<b>95</b>
<b>Figura 49.</b> Ilustração esquemática de uma gota em contato com uma superfície sólida, mostrando a relação entre os parâmetros energéticos[112].....	<b>97</b>
<b>Figura 50.</b> VPD do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs, frente à detecção de ureia em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7,2). Amplitude de pulso 25 mV, velocidade de varredura 10 mV s <sup>-1</sup> .....	<b>98</b>
<b>Figura 51.</b> VPD para o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs. Detecção simultânea de ureia na presença dos interferentes ácido ascórbico 1,5 mmol L <sup>-1</sup> e ácido úrico 1,0 mmol L <sup>-1</sup> . Eletrólito tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7,2). Amplitude de pulso 25,0 mV, Velocidade de varredura 10 mV s <sup>-1</sup> . ....	<b>99</b>

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Efeito do solvente na automontagem de nanoestruturas de L,L-difenilalanina [71]. .....	<b>52</b>
<b>Tabela 2.</b> Informações cristalográficas obtidas para a micro/nanoestrutura de FF sintetizada em vapor de água. Número de moléculas por célula unitária (Z). A concordância entre o perfil observado e calculado são os resíduos, obtidos a partir da diferença entre as intensidades observadas e calculadas. A qualidade dos ajustes são representados por $R_{Bragg}$ , $R_{wp}$ , $R_{exp}$ e $\chi^2$ . .....	<b>55</b>
<b>Tabela 3.</b> Informações cristalográficas obtidas para a micro/nanoestrutura de FF sintetizada em vapor de anilina. A concordância entre o perfil observado e calculado são os resíduos, obtidos a partir da diferença entre as intensidades observadas e calculadas. A qualidade dos ajustes são representados por $R_{Bragg}$ , $R_{wp}$ , $R_{exp}$ e $\chi^2$ . .....	<b>57</b>
<b>Tabela 4.</b> Número de onda e o modo vibracional esperado para o micro/nanomaterial obtido utilizando água na fase vapor [73]. .....	<b>59</b>
<b>Tabela 5.</b> Número de onda e o modo vibracional esperado para o micro/nanomaterial obtido utilizando anilina na fase vapor [73]. .....	<b>60</b>
<b>Tabela 6.</b> Comparação de desempenho de sensores de íon amônio baseados em eletrodos com diferentes materiais. ....	<b>66</b>
<b>Tabela 7.</b> Comparação com outros sensores descritos na literatura* .....	<b>68</b>
<b>Tabela 8.</b> Estados de oxidações mais importantes da polianilina e suas respectivas estruturas [96]. .....	<b>73</b>
<b>Tabela 9.</b> Comparação com outros biossensores de ureia descrito na literatura. ....	<b>78</b>
<b>Tabela 10.</b> Resistência à transferência de carga calculada a partir do Diagrama de Nyquist para os diferentes eletrodos. ....	<b>94</b>
<b>Tabela 11.</b> Valores de ângulo de contato para os três eletrodos modificados. ....	<b>96</b>



## Lista de Abreviaturas

<b>A</b>	Área geométrica do eletrodo de ouro
<b>~</b>	Aproximadamente
<b>Q</b>	Carga transferida na reação redox
<b>F</b>	Constante de Faraday
<b>Au</b>	Eletrodo de Ouro
<b>ECS</b>	Eletrodo de calomelano saturado
<b>EDC</b>	(1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida)
<b>EIE</b>	Espectroscopia de Impedância Eletroquímica
<b>FF</b>	L-difenilalanina
<b>FTIR</b>	Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho
<b>HFP</b>	1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>MCP</b>	4-mercaptopiridina
<b>MNTs-FF</b>	Micro/nanoestrutura de FF
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NTc</b>	Nanotubos de Carbono
<b>NHS</b>	N-Hidroxisuccinimida
<b>n</b>	Número de elétrons
<b>Pt</b>	Fio de Platina
<b>PAni</b>	Polianilina
<b>Py</b>	Ácido 1-pireno butírico
<b>R<sub>tc</sub></b>	Resistência à transferência de carga
<b>SWV</b>	Square wave Voltametric (Voltametria de onda quadrada)
<b>Urs</b>	Urease
<b>VC</b>	Voltametria cíclica
<b>VPD</b>	Voltametria de pulso diferencial

## Sumário

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>16</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
OBJETIVOS GERAIS.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>34</b>
3.1. MATERIAIS E REAGENTES .....	34
3.2. LIMPEZA DOS ELETRODOS .....	34
3.3. MODIFICAÇÃO DO ELETRODO DE OURO COM 4-MERCAPTOPYRIDINA (MCP) .....	35
3.4. PREPARAÇÃO E NANOESTRUTURAÇÃO DA L,L-DIFENILALANINA (FF) VIA FASE SÓLIDA-VAPOR .....	35
3.5. SÍNTESE ELETROQUÍMICA DA PANI SOBRE O ELETRODO AU/MCP/MNTs-FF .....	36
3.6. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE SOBRE O ELETRODO AU/MCP/MNTs-FF/PANI.....	37
3.7. FUNCIONALIZAÇÃO DO ELETRODO AU/MCP/MNTs-FF COM O ÁCIDO 1-PIRENO BUTÍRICO (PY).....	37
3.8. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE SOBRE O ELETRODO AU/MCP/MNTs-FF/PY .....	37
3.9. NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DAS MNTs-FF NA PRESENÇA DE NANOTUBOS DE CARBONO (NTC) VIA FASE SÓLIDA-VAPOR .....	38
3.10. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA UREASE SOBRE O ELETRODO AU/MCP/NTC/MNTs-FF .....	38
3.11. CARACTERIZAÇÃO.....	39
3.11.1. Morfológica.....	39
3.11.2. Estrutural.....	39
3.11.3. Eletroquímica .....	41
3.11.4. Superfície.....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM 4-MERCAPTOPYRIDINA (MCP) .....	45
4.1.1. Caracterização eletroquímica e Morfológica.....	45
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICRO/NANOESTRUTURA (MNTs-FF) SINTETIZADA EM ATMOSFERA SATURADA DE VAPOR DE ÁGUA E EM VAPOR DE ANILINA SOBRE ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM MCP .....	50
4.2.1 Caracterização morfológica .....	50
4.2.2 Caracterização Estrutural .....	53
4.2.3 Caracterização Eletroquímica .....	60

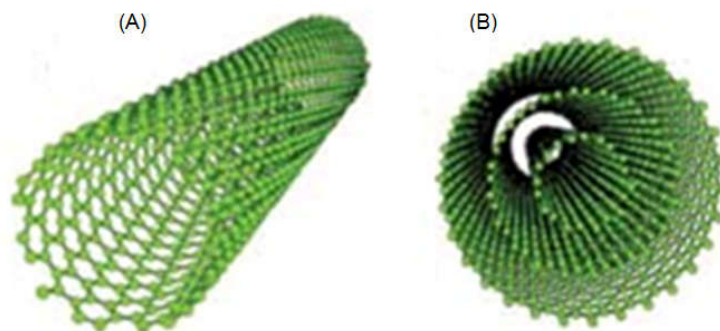
4.3. FUNCIONALIZAÇÃO DAS MNTs-FF COM POLIANILINA.....	70
4.3.1 <i>Síntese e Caracterização da Polianilina sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF</i> .....	71
4.3.2 <i>Imobilização da Enzima urease sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni</i> .....	74
4.4. FUNCIONALIZAÇÃO DA MNTs-FF COM ÁCIDO 1-PIRENO BUTÍRICO (PY) .....	79
4.4.1. <i>Caracterização Eletroquímica</i> .....	81
4.5. INFLUÊNCIA DOS NANOTUBOS DE CARBONO NA NUCLEAÇÃO E CRESCIMENTO DAS MNTs-FF. ....	86
4.5.1. <i>Caracterização Morfológica</i> .....	86
4.5.2. <i>Caracterização Estrutural</i> .....	87
4.5.3. <i>Caracterização Eletroquímica</i> .....	92
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>7. SÚMULA CURRICULAR.....</b>	<b>112</b>

## 1. Introdução

A nanociência e a nanotecnologia oferecem oportunidades para o desenvolvimento de materiais avançados [1]. Materiais biológicos e compostos definidos nanométricos podem ser usados como blocos de construção (*building blocks*) para projetar dispositivos e substratos auto-organizados com propriedades físico-químicas desejadas. Assim, várias biomoléculas, como peptídeos, lipídios, DNA, RNA e proteínas podem se auto-organizar em nanoestruturas altamente ordenadas [2-4] e vem sendo aplicadas nas mais diversas áreas, como em sistemas de liberação controla de fármacos [5], na engenharia de tecidos [6], em sensor [7], biossensor [8], capacitores e supercapacitores [9], em cosméticos [10], entre outras.

Dentre os vários materiais nanoestruturados, os nanotubos de carbono (NTc) destacam-se devido à morfologia tubular e dimensões nanométricas, obtidas a partir do enrolamento das folhas de grafeno, que consiste em arranjo bidimensional hexagonal de átomos de carbono [11]. Os NTc podem ser divididos em duas categorias: (i) nanotubos de parede única (SWCNTs – *single-walled carbon nanotubes*), constituídos de uma camada cilíndrica de grafeno, e (ii) nanotubos de parede múltiplas (MWCNTs – *multi-walled carbon nanotubes*), constituídos de vários cilindros concêntricos de grafeno [12, 13], Figura 1. São considerados materiais estratégicos, devido as suas excelentes propriedades mecânicas e elétricas, bem como, alta flexibilidade, resistência térmica [14, 15]. Além disso, apresentam alterações quanto ao transporte elétrico e podem apresentar características metálicas, semicondutoras ou supercondutoras, de acordo com as variações estruturais e direção do vetor quiral [16, 17]. Este conjunto fantástico de

propriedades, decorrentes da escala nanométrica, fornecem uma grande variedade de aplicações em sistemas tecnológicos altamente avançados [18-20].



**Figura 1.** Representação da estrutura de nanotubos de carbono (a) parede simples e (b) parede múltipla [13].

Nos últimos anos a busca por materiais funcionais promoveu avanços na pesquisa com o desenvolvimento e aplicações de materiais nanoestruturados baseados em compostos orgânicos, inorgânicos e metálicos [21-23]. Nesse sentido, os nanomateriais preparados a partir de mecanismos de auto-organização de peptídeos têm despertado um grande interesse da comunidade científica, devido à grande versatilidade estrutural, biocompatibilidade, habilidade para reconhecimento molecular, seletividade, facilidade para modificação química, bem como, construção de sistemas com diferentes morfologias (nanofibras, nanotubos e nanoesferas) [24-27]. Além disso, têm sido usados como componentes em análise biológica e na fabricação de novos sensores e biossensores [28].

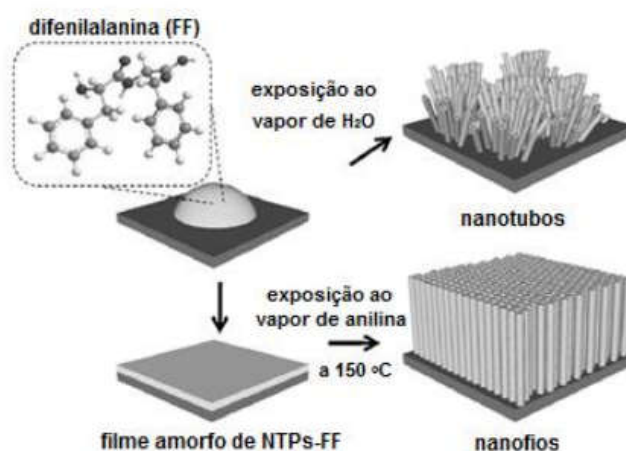
Peptídeos são biomoléculas constituídas por dois ou mais resíduos de aminoácidos unidos por meio de ligações covalentes, denominadas ligações amidas ou peptídicas, entre os grupos N e C terminal pertencente ao carbono- $\alpha$

[29]. Deste modo, podem apresentar estruturas lineares, semi-cíclicas (ligações dissulfeto intra- ou intercadeias peptídicas) ou cíclicas (entre os grupos amino e carboxila dos aminoácidos terminais), e conformações estruturais do tipo  $\alpha$ -hélice e estruturas- $\beta$ , mantidas por interações inter ou intramoleculares [29, 30].

Os compostos peptídicos apresentam dois grupos ionizáveis: na forma protonada ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_3^+$ ) ou desprotonada ( $-\text{COO}^-$ ,  $-\text{NH}_2$ ), de acordo com o pH do meio. Em soluções ácidas os dois grupos apresentam-se protonados, porém, em pH alcalino, ambos apresentam-se desprotonados e, em soluções próximas ao neutro (ponto isoelétrico), o composto apresenta-se como um íon dipolar [30]. Assim, o estudo da variação do pH para os compostos peptídicos é de fundamental importância para obtenção dos materiais nanoestruturados, pois podem influenciar na conformação molecular das cadeias orgânicas. Além disso, os anéis aromáticos presentes nas estruturas dos aminoácidos também exercem uma importante função na conformação das nanoestruturas, pois promovem interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, que conferem direcionalidade durante a auto-organização das estruturas [31].

As nanoestruturas peptídicas se formam por meio do processo de automontagem, sendo um método natural que envolve a associação espontânea de moléculas, organizando-se em estruturas ordenadas por meio de interações não covalentes como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas, interações de Van der Waals e interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking* [32, 33]. Diferentes morfologias podem ser obtidas como nanotubos, nanoesferas, nanofios, nanofitas, dependendo do método de preparação [4]. Os métodos de preparação de nanoestruturas mais citados na literatura são: deposição física a vapor, fase líquida, eletrofiação e fase sólida a vapor. Neste trabalho usamos o

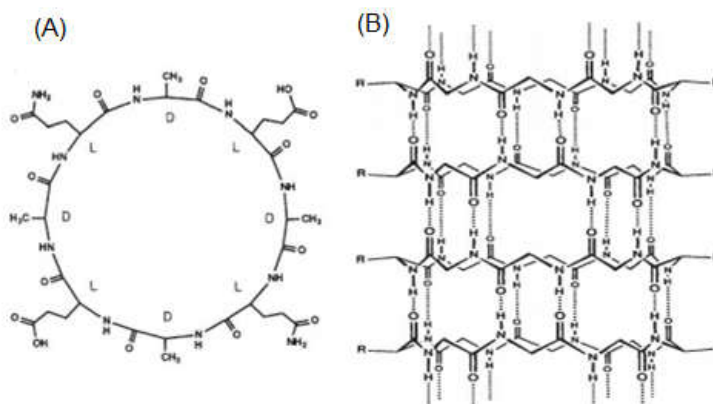
método fase sólida a vapor para promover a nucleação e crescimentos das nanoestruturas de peptídeo. Neste caso, o método baseia-se na estratégia “*bottom up*”, sendo necessária a utilização de dois solventes, um para solubilizar o peptídeo, e o outro para promover a automontagem da nanoestrutura. No primeiro momento, o peptídeo é solubilizado e depositado sobre a superfície do substrato, a formação de um filme amorfo ocorre após evaporação do solvente, na ausência de umidade. O segundo momento, consiste em manter o filme amorfo a uma atmosfera de vapor de solvente, (aqui utilizamos a anilina) à temperatura de  $\sim 100$  °C. Assim, parâmetros como temperatura, pressão de vapor, concentração e tempo de exposição do filme ao vapor de solvente, favorecem para a formação das nanoestruturas. A Figura 2 apresenta o esquema experimental para promover a formação de nanofios e nanotubos em fase sólida-vapor.



**Figura 2.** Método *via* fase sólida-vapor para obtenção de nanoestruturas de L-L-difenilalanina [34].

Os primeiros nanotubos de peptídeo foram sintetizados em 1993 por Ghadiri e colaboradores [35], utilizando o método fase sólida-vapor. Eles usaram um resíduo peptídico cíclico com a seguinte sequência:  $[-(D\text{-Ala-Glu-D-Ala-Gln})_2]$

em que as subunidades podem empilhar de forma antiparalela por meio de ligações intermoleculares de hidrogênio, produzindo estrutura  $\beta$ -folha, Figura 3. Contudo, a formação de nanotubos a partir de peptídeos lineares foi obtida pelo grupo de Reches e colaboradores [36], quando estudaram a habilidade que algumas sequências de peptídeos aromáticos curtos (até no máximo hexapeptídeos) possuíam para formar fibrilas amilóides bem organizadas. As fibrilas amilóides são a marca registrada de um grupo diverso de doenças de origem não relacionada, incluindo a doença de Alzheimer e diabetes tipo II, partilham propriedades biofísicas e estruturais semelhantes [36, 37]

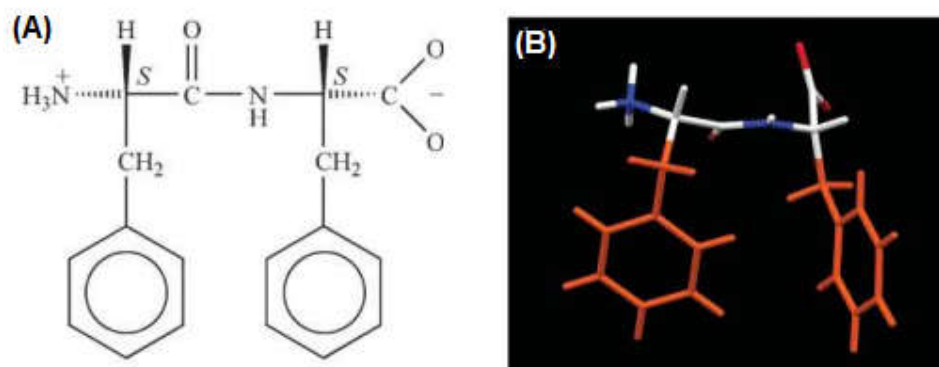


**Figura 3.** (A) Representação estrutural (em 2D) da estrutura química da subunidade peptídica do nanotubo de peptídeo de ciclo  $[-(D\text{-Ala-Glu-D-Ala-Gln})_2]$ . (B) Configuração nanotubular automontada com empilhamento antiparalelo, As ligações de hidrogênio são mostradas por linhas pontilhadas. [Adaptado Ref. [35]].

O peptídeo mais utilizado na preparação de nanoestruturas é o dipeptídeo L,L-difenilalanina (FF), Figura 4. Os nanomateriais obtidos a partir dessa sequência apresentam diversas propriedades interessantes, Kol e colaboradores [38] estudaram algumas propriedades mecânicas da FF e observaram um módulo de Young elevado igual a 19 GPa, valor muito maior do que qualquer outro encontrado



para estruturas biológicas. Adler-Abramovich e colaboradores [39] analisaram a estabilidade térmica e química dos nanotubos de FF (NTs-FF) e revelaram que após tratamento em autoclave, os NTs-FF se mantêm estáveis em solução aquosa a temperaturas acima do ponto de ebulição da água e preservam sua estrutura secundária a temperatura até 90°C. Além da estabilidade térmica, os NTs-FF mostram-se quimicamente estáveis em solventes orgânicos tais como etanol, 2-propanol, acetona e acetonitrila.

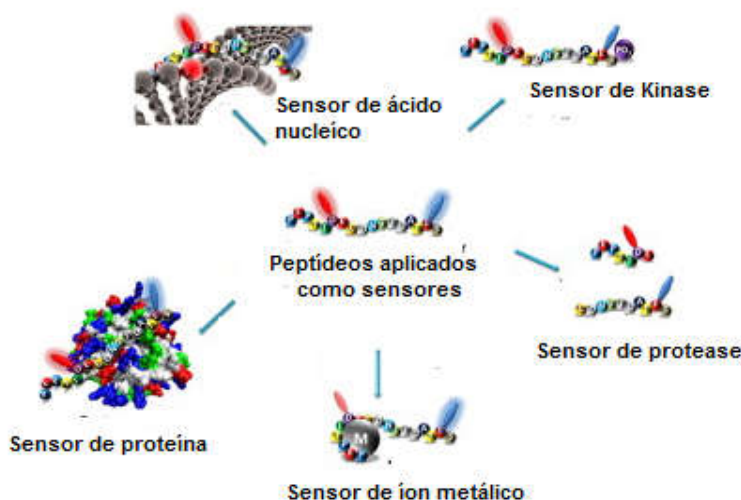


**Figura 4.** (A) Fórmula estrutural e (B) Estrutura tridimensional do peptídeo L,L-difenilalanina [40].

Um trabalho recentemente desenvolvido no nosso grupo de pesquisa mostra os resultados relacionados às propriedades eletrônicas das micro/nanoestruturas de L,L-difenilalanina (MNTs-FF) sintetizada em fase líquida. A MNTs-FF sintetizada em fase líquida apresenta estrutura hexagonal com grupo de simetria ( $P6_1$ ) e após tratamento térmico a 150°C ocorre a transição de fase para estrutura ortorrômbica ( $P22_12_1$ ). A estrutura de banda da MNTs-FF mostra que a energia de band-gap da fase hexagonal é em torno de 4,0 eV, e para a fase ortorrômbica, cerca de 4,5 eV. No entanto, a energia da banda de valência da estrutura ortorrômbica permite que seja dopada de forma semelhante para os semicondutores tipo p, onde o polímero polialilamina hidroclorada (PAH) atua como um agente de dopagem para a estrutura

do peptídeo ortorrômico, diminuindo o band-gap para 1,0 eV, o que resulta na diminuição da resistência à transferência de carga [41].

A significativa propriedade mecânica, estabilidade térmica, química e eletrônica dessas estruturas, além de outras propriedades como bicompatibilidade, habilidade em auto-organizar em diferentes morfologias como: nanotubos, nanofios, nanofitas, apontam sua possível utilização em microeletrônica convencional e fabricação de dispositivos nanotecnológicos funcionais. Nesse sentido, muitos trabalhos descritos na literatura [28] tem se baseado em nanoestruturas de peptídeo para o desenvolvimento de novos sensores e biossensores. A Figura 5 apresenta uma vasta aplicação de sensores baseados em nanoestruturas de peptídeo.

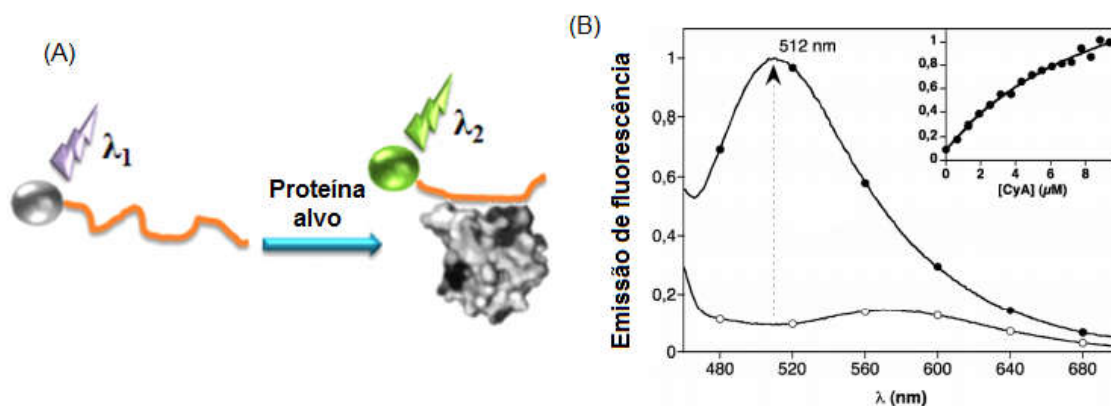


**Figura 5.** Representação de uma plataforma de peptídeos plicados como sensor para diversas análises. [Adaptado ref [28]].

Biossensores são um subgrupo de sensores químicos que são capazes de proporcionar informação analítica quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas ou microorganismos) em contato a transdutores (como os eletroquímicos, ópticos,

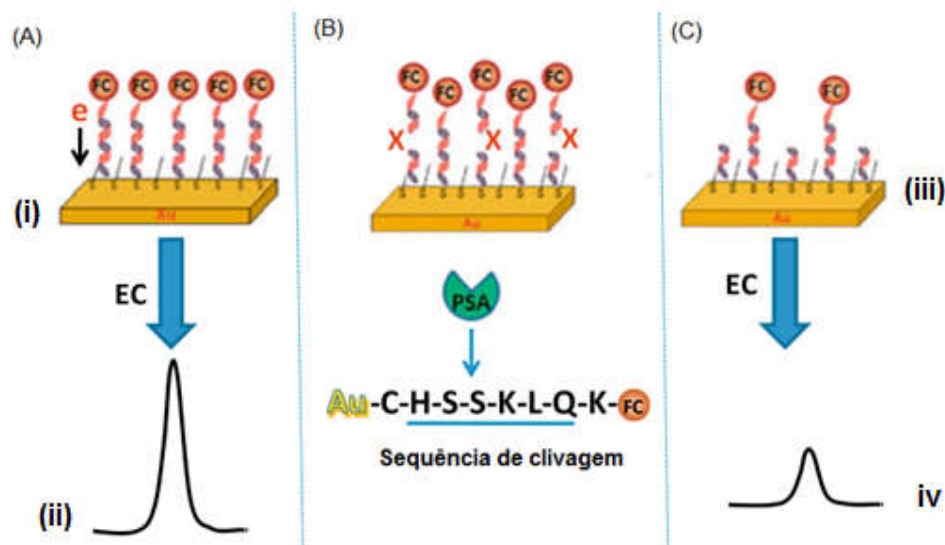
térmicos, etc) [42]. Neste sentido, os nanomateriais peptídicos desempenham vários papéis no comportamento de um biossensor incluindo a atuação como receptor (elemento de bio-reconhecimento) e como um substrato enzimático. No entanto, não geram um sinal mensurável diretamente em resposta ao sinal do analito, então, se faz necessária a conjugação com um marcador de sinal como uma estratégia eficaz para converter a informação do analito para um sinal mensurável. Fluoróforos ambientalmente sensíveis são marcadores de sinais comuns que são amplamente utilizados quando conjugados com peptídeos. Essas arquiteturas podem ser utilizadas para a detecção de vários analitos, incluindo íons metálicos, proteínas, proteases, quinases, ácidos nucleicos e anticorpos [28].

Pazos e colaboradores [43] desenvolveram um sensor fluorescente para determinar ciclina A, que é uma proteína que desempenha um papel chave na regulação do ciclo celular. O processo inicial para a detecção da proteína é a afinidade/reconhecimento entre o peptídeo e o analito. Após o reconhecimento, ocorre alteração nas propriedades espectrais do fluoróforo. Estudos computacionais mostraram que a alteração espectral é causada pela inserção do peptídeo conjugado ao fluoróforo na cavidade da ligação hidrofóbica da proteína alvo. A Figura 6 ilustra o mecanismo do biossensor de proteína.



**Figura 6.** (A) Representação esquemática de um sensor baseado em peptídeo conjugado com um fluoróforo sensível ao ambiente. (B) Espectros de fluorescência em solução tampão de HEPES 10 mM e NaCl 100 mM, pH 7,6. Emissão (○) antes e após a adição de seis equivalentes de ciclina A (●). O detalhe mostra a curva com quantidades crescentes de ciclina A. [Adaptado das ref. [28, 43], respectivamente.

Um sensor eletroquímico para detecção do antígeno ativo específico da próstata, chamado de PSA foi desenvolvido por Liu e colaboradores [44]. Em seu trabalho um peptídeo sensível ao PSA foi funcionalizado com ferroceno (FC) para modificar covalentemente a superfície do eletrodo de ouro, Figura 7. O PSA pode clivar a sequência do peptídeo, e o ferroceno livre ativa a superfície do eletrodo de ouro, resultando na diminuição da intensidade da corrente. A porcentagem da corrente que diminuiu é linear com a concentração de PSA ativo, na faixa de  $0,5\text{-}40\text{ ng mL}^{-1}$  com um limite de detecção de  $0,2\text{ ng mL}^{-1}$ .



**Figura 7.** Esquema ilustrando o ensaio eletroquímico do PSA ativo sobre um eletrodo de ouro contendo peptídeo funcionalizado com ferroceno (FC). (A) Automontagem de sonda de peptídeo-FC sobre a superfície do eletrodo de ouro (i) e leitura eletroquímica da atividade redox do ferroceno (ii). (B) Clivagem proteolítica específica de peptídeos na superfície do eletrodo de ouro na presença de PSA ativo, que reconhece e cliva a sequência mostrada na parte inferior. (C) Remoção dos segmentos de peptídeo-FC clivado a partir da superfície do eletrodo (iii) e leitura eletroquímica do FC que permaneceu sobre a superfície do eletrodo de ouro (iv) [Adaptado Ref. [44]].

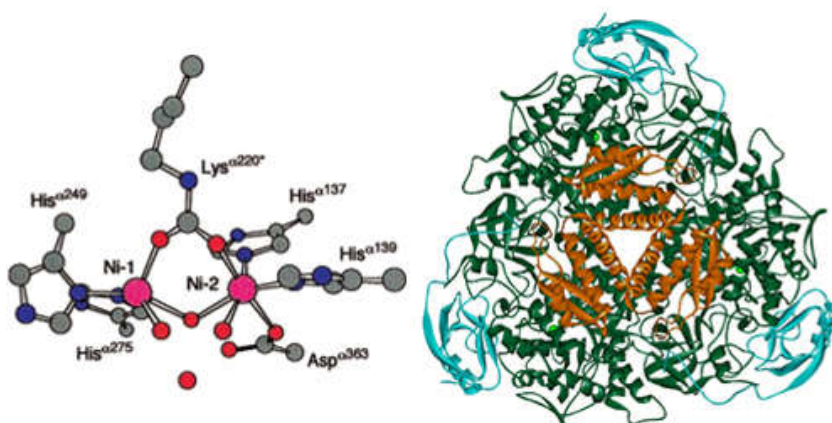
Recentemente, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de sistemas biomiméticos que podem promover interações desejáveis com células, proteínas, metais, através de reconhecimentos biomoleculares [45]. Nesse sentido, as biomoléculas de peptídeos possuem habilidades únicas para formação de nanomateriais biomiméticos e funcionais e têm sido empregadas na confecção de sensores [46]. Wang e colaboradores [47] desenvolveram um sensor eletroquímico biomimético para detecção de peróxido de hidrogênio, a partir da formação de uma nanoestrutura híbrida constituída por nanofibras de peptídeo e nanofios de prata, sobre um eletrodo modificado com grafeno, apresentando alta sensibilidade e seletividade, baixo limite de detecção e ampla faixa linear para a determinação de  $H_2O_2$ . Outro sensor biomimético foi proposto

por Matos e colaboradores [48], no qual estudaram a detecção eletroquímica da dopamina, utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de peptídeo (PNTs) e complexo tetranuclear de cobre. Desse modo, observaram que a modificação dos PNTs com complexos metálicos não só aumentou o pico de oxidação, como diminuiu o sobrepotencial de oxidação da dopamina. Além disso, o limite de detecção foi relativamente menor comparado a outros sensores descritos na literatura.

Além de todas as aplicações relatadas acima, as nanoestruturas de peptídeo, também vêm sendo usadas como substrato para imobilização de enzimas devido a sua biocompatibilidade e capacidade de reconhecimento molecular [28]. Dessa maneira, para o desenvolvimento de um biossensor de glicose, Yemini e colaboradores [49] promoveram a modificação do eletrodo de ouro com nanotubos de peptídeo e com a enzima glicose oxidase na presença de glutaraldeído e de PEI (polietilenoimina). O mecanismo de detecção é baseado na determinação da glicose através do monitoramento do peróxido de hidrogênio, que é produzido por uma reação enzimática entre a glicose oxidase, ligada de forma covalente aos nanotubos de peptídeo por glutaraldeído na superfície do eletrodo de ouro. Entre as aplicações do biossensor, esse pode ser utilizado para detectar a glicose no sangue e urina para o diagnóstico de diabetes e também para controlar a quantidade de glicose durante processos de fermentação na indústria de alimentos.

Contudo, vale ressaltar que uma das etapas mais difíceis no desenvolvimento de um biossensor é, sem dúvida, com relação a imobilização da enzima. Grande quantidade de enzima ativa deve estar ligada à superfície do eletrodo, fazendo com que as biomoléculas imobilizadas apresentem boa

estabilidade e maior eficiência comparadas às enzimas em solução [50]. Várias técnicas para imobilização de biomoléculas são relatadas na literatura, porém, as mais comuns são a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, adsorção física e a encapsulação. A partir das técnicas de imobilização apresentadas, a ligação covalente tem sido empregada para ligar a enzima urease sobre as nanoestruturas de peptídeo. A urease é composta por vários resíduos de aminoácidos como: lisina, histidina, glicina, alanina e apresenta dois átomos de níquel como sítios ativos, Figura 8. Esses resíduos podem interagir com as nanoestruturas de peptídeos por meio de ligações de hidrogênio. Além disso, é responsável por catalisar a reação de hidrólise da ureia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono.



**Figura 8.** Representação da enzima urease: (A) estrutural e (B) 3D [51].

A ureia é amplamente observada na natureza, e sua análise é de grande interesse em muitas áreas, incluindo clínica, agrícola, alimentar e química [52]. Ela desempenha um papel primordial no metabolismo dos mamíferos e é reconhecida como um importante marcador para avaliar níveis de toxina urêmica [53]. Por exemplo, o nível normal no soro humana varia de 2,5 para 7,5 mmol L<sup>-1</sup>. Em pacientes que sofrem de insuficiência renal, essa concentração pode ser tão

elevada ( $30 - 80 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em que a hemodiálise pode ser requerida [54]. Portanto, a detecção de ureia em condições adequadas é biologicamente relevante e de extrema importância. Neste sentido, um sensor para determinar níveis de ureia torna-se indispensável.

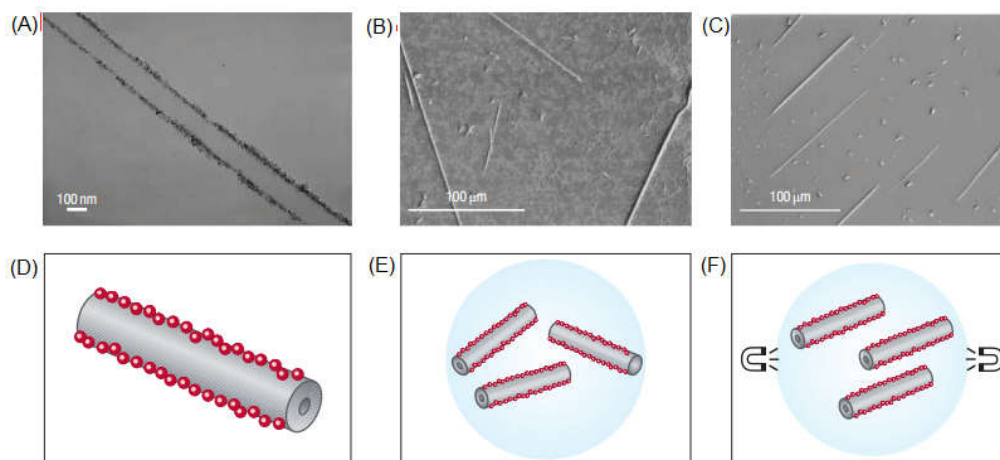
Nos últimos anos, vários métodos têm sido explorados para detectar ureia, como cromatografia líquida, espectrometria de massa, quimiluminescência, e dispositivos eletroquímicos [55, 56]. No entanto, a complexidade de fabricação é muitas vezes um grande problema para estas abordagens. Assim, evidencia-se a importância de se obter novas rotas sistemáticas para a determinação de ureia que podem resultar em métodos analíticos mais fáceis, rápidos e economicamente viáveis, como, por exemplo, o desenvolvimento de sensores e biossensores a partir de materiais nanoestruturados.

Com o propósito de obter novas propriedades, assim como aperfeiçoar e potencializar as propriedades existentes e, portanto, aumentar a esfera de aplicações dos nanomateriais, pesquisas estão sendo realizadas buscando estratégias que promovam a interação destes materiais com outros compostos. Esse tipo de procedimento é denominado funcionalização e nesse caso, átomos ou moléculas podem se ligar de forma covalente ou não-covalente com as nanoestruturas peptídicas, promovendo modificações químicas e alterando as propriedades originais desses materiais. Muitos estudos estão sendo realizados nesta área, dentre eles a funcionalização de nanoestruturas peptídicas com: nanopartículas de metais de transição [25], polímeros [24], fluoróforos [57], entre outros.

Reches e Gazit [58] estudaram a formação de nanotubos de peptídeo numa solução contendo nanopartículas de magnetita  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , a fim de verificar a



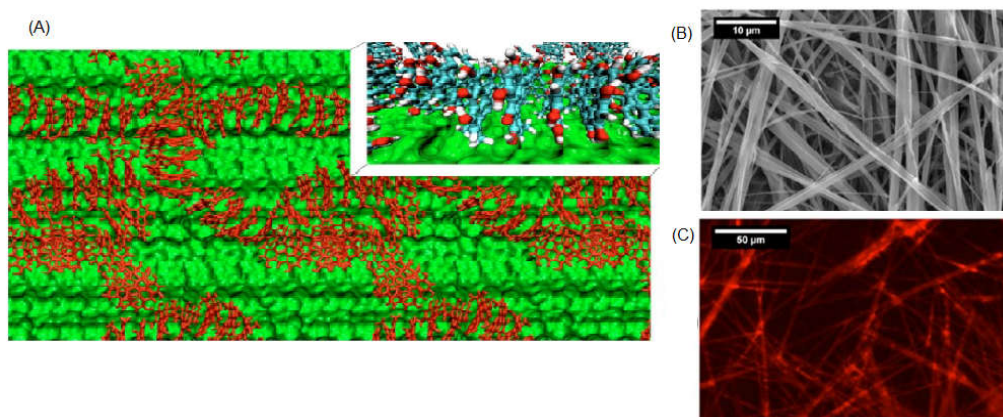
funcionalização de nanotubos de peptídeo com nanopartículas magnéticas. A presença de nanopartículas sobre uma superfície de nanotubo de peptídeo foi facilmente detectada por microscopia eletrônica de transmissão e varredura (TEM-SEM), Figura 9. Estes resultados sugerem que estes sistemas híbridos podem encontrar aplicação em sensores e dispositivos nano (eletro) mecânicos.



**Figura 9.** (A) Imagem de TEM de um tubo de peptídeo automontado revestido com partículas magnéticas. Imagens de SEM: (B) dos tubos magnéticos automontados. (C), disposição horizontal dos tubos magnéticos automontados após exposição a um campo magnético. (D) Representação esquemática dos tubos magnéticos automontados. (E e F) Representações esquemáticas dos tubos magnéticos orientados aleatoriamente antes da exposição ao campo magnético (E) e horizontalmente alinhados em exposição ao campo magnético (F) [58].

Em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, Souza e colaboradores [57], estudaram as propriedades fotofísicas dos nanotubos de peptídeos NTs-FF funcionalizados com Hipericina (Hyp). A Hipericina é um fotossensibilizador com potenciais aplicações em terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer e doenças infecciosas. No entanto, estudos por meio de simulações de dinâmica molecular revelaram a intercalação do fluoróforo na matriz peptídica, o qual é suportado por imagens de MEV e fluorescência, Figura

10. Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio é mais rápida e mais eficiente para o sistema NTs-FF/Hyp. Quando a hipericina está conjugada com NTs-FF, a fluorescência característica e seu tempo de vida são aumentadas de forma significativa, o que demonstra o papel do NTs-FF em melhorar as propriedades fotofísicas e de estabilização do fluoróforo em estados excitados.



**Figura 10.** (A) Estudos de simulação computacional mostrando moléculas de hipericina empilhadas na superfície do nanotubo. Em destaque, visão ampliada da superfície do nanotubo (em verde) e as interações entre as moléculas de hipericina e do nanotubo peptídeo. (B) Imagens de SEM e (C) Imagens de fluorescência [57].

Neste trabalho estudamos uma nova rota para determinar ureia baseada em nanoestrutura de L,L-difenilalanina (FF), preparada *via* fase sólida a vapor, devido à habilidade estrutural de auto-organização, bem como eficiência para construir sistemas com diferentes morfologias [31]. Além disso, o arranjo estrutural no qual a FF pode se cristalizar influencia fortemente na estabilidade do material e na detecção do analito de interesse.

## **2. Objetivos**

### **Objetivos Gerais**

Esse trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar as nanoestruturas de L,L-difenilalanina (FF) obtidas pelo método fase sólida-vapor, e estudar sua interação com diferentes materiais, de modo a obter um sensor eletroquímico enzimático e não enzimático para detecção de ureia.

### **Objetivos específicos**

- Investigar a influência do solvente no processo de auto-organização da L,L-difenilalanina (FF) na superfície de ouro.
- Mostrar potencial aplicação das nanoestruturas como sensores e/ou biossensores.
- Funcionalizar as nanoestruturas de FF com polianilina e analisar o seu comportamento eletroquímico como biossensor.
- Estudar a influência dos nanotubos de carbono na nucleação e crescimento das nanoestruturas de L,L-difenilalanina.

### **3. Metodologia Experimental**

#### **3.1. Materiais e Reagentes**

Hidróxido de sódio P.A., ureia e ácido sulfúrico são de procedência da Synth. O 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFP), peptídeo L,L-difenilalanina (FF), glutaraldeído, urease tipo III (EC 3.5.1.5, Jack bean, 2800 U g<sup>-1</sup>), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), NHS (N-hidroxisulfosuccinimida ou sulfo-NHS), ácido 1-pireno butírico, 4-mercaptopiridina (MCP) e anilina são de procedência da Sigma-Aldrich. Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas com 95% de pureza, diâmetro externo < 8 nm e comprimento entre 10 e 30 µm são de procedência da cheaptubes, foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Mauro Coelho dos Santos da Universidade Federal do ABC (UFABC). Suspensão de alumina 1 µm n° 4 e o pano de polimento NTR Ø 200mm de uso geral abrasivo < 1 µm, utilizados na limpeza dos eletrodos, são de procedência da Panambra.

#### **3.2. Limpeza dos eletrodos**

Para a realização dos experimentos foram utilizados eletrodos de ITO, ouro e carbono vítreo. A limpeza do eletrodo de ITO foi realizada pela imersão do substrato nos solventes: diclorometano, metanol, etanol e água destilada, respectivamente, por dez minutos em banho ultra-sônico. A secagem foi realizada por exposição à atmosfera de nitrogênio. O eletrodo de carbono vítreo foi polido mecanicamente em alumina sobre pano de polimento e lavados com água destilada. A secagem foi realizada à temperatura ambiente. A limpeza do eletrodo de ouro foi realizada em

dois passos: mecanicamente e eletroquimicamente. Primeiro, o eletrodo de ouro foi polido em alumina sobre pano de polimento e, lavados com água destilada para obter uma superfície espelhada, após esse processo, foi imerso em uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  durante cinco minutos em banho ultra-sônico. Depois da limpeza mecânica, o eletrodo de ouro foi limpo eletroquimicamente em solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , variando o potencial entre  $-0,2$  a  $1,6 \text{ V}$  vs. ECS ( Eletrodo de calomelano saturado) durante 80 ciclos a  $50,0 \text{ mV s}^{-1}$ .

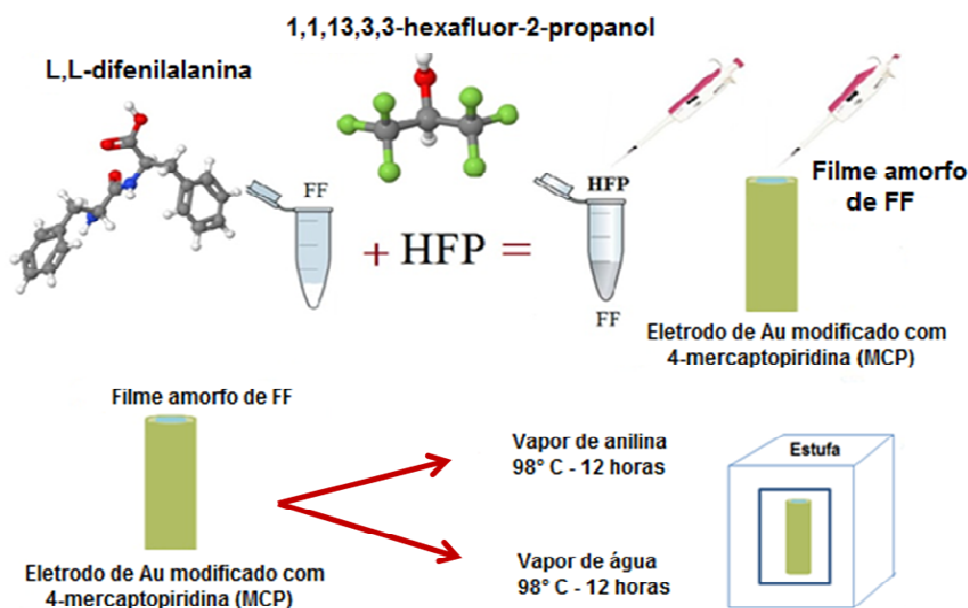
### **3.3. Modificação do eletrodo de ouro com 4-mercaptopiridina (MCP)**

Para promover a modificação do eletrodo de ouro, foram preparadas soluções da MCP em etanol ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ). A adsorção do tiól e a formação da monocamada auto-organizada sobre a superfície metálica foi alcançada após imersão do eletrodo na solução MCP por duas horas [59]. Após esse período, os eletrodos foram lavados com etanol para retirar as moléculas fisicamente adsorvidas e secados à temperatura ambiente.

### **3.4. Preparação e nanoestruturação da L,L-difenilalanina (FF) via fase sólida-vapor**

O peptídeo L,L-difenilalanina FF foi dissolvido em 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFP) para uma concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Após a dissolução, uma alíquota de  $10 \mu\text{L}$  foi depositada sobre a superfície do eletrodo de ouro, modificado previamente com MCP formando o filme amorfo. O método *via* fase sólida-vapor foi utilizado para promover a nanoestruturação do filme amorfo e, para estudar a

influência do solvente no processo de nanoestruturação, o eletrodo contendo o filme amorfo foi exposto ao vapor de anilina e ao vapor de água durante 12 horas a 98° C [34, 60]. Após o processo de nanoestruturação, o eletrodo foi denominado Au/MCP/MNTs-FF. A Figura 11 apresenta uma ilustração da síntese do filme amorfo.



**Figura 11.** Ilustração da síntese do filme amorfo.

### 3.5. Síntese eletroquímica da PANi sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF

A polianilina (PANi) foi sintetizada eletroquimicamente por voltametria cíclica, sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF no intervalo de potencial entre -0,2 a 1,0 V vs. ECS, com velocidade de varredura de 25 mV s<sup>-1</sup> até atingir a carga anódica desejada. O eletrólito consistiu numa solução aquosa contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup> e anilina 0,1 mol L<sup>-1</sup>, previamente destilada. Após a polimerização, o eletrodo foi denominado Au/MCP/MNTs-FF/PANi.

### **3.6. Imobilização da Enzima Urease sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni**

Para o acoplamento covalente da urease ao eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni foi usada uma solução de glutaraldeído (0,5%). Então, 10  $\mu\text{L}$  da solução de glutaraldeído (0,5%) foram depositados na superfície do eletrodo modificado (Au/MCPMNTs-FF/PAni) e deixado secar à temperatura ambiente. Após a secagem, o eletrodo foi lavado com água deionizada para remover as moléculas não ligadas. Em seguida, adicionou-se 15  $\mu\text{L}$  de uma solução de urease, preparada pela dissolução de 50 mg de urease em 1,0 ml de solução tampão fosfato pH 7,2 e secados a temperatura ambiente.

### **3.7. Funcionalização do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF com o ácido 1-pireno butírico (Py).**

Foi preparada uma solução do ácido 1-pireno butírico 7,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em etanol e adicionados 5  $\mu\text{L}$  dessa solução sobre a superfície do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF até o máximo de 15  $\mu\text{L}$ . Para cada adição foi esperada a evaporação completa do solvente.

### **3.8. Imobilização da Enzima Urease sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py**

Para a imobilização da enzima, 15  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 50  $\text{mg mL}^{-1}$  de urease (Urs) + 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de EDC + 50  $\text{mmol L}^{-1}$  de NHS em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,2 foram adicionados sobre a superfície do Au/MCP/MNTs-FF/Py. O eletrodo foi seco a temperatura ambiente.

### **3.9. Nucleação e crescimento das MNTs-FF na presença de nanotubos de carbono (NTc) *vía* fase sólida-vapor**

Para promover a nucleação e crescimento das MNTs-FF na presença de NTC, primeiro solubilizou a FF em 1,1,1,3,3,3-hexafluor-2-propanol (HFP) numa concentração de  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . Após a dissolução, foram adicionados à solução 2,0 mg de NTc. A solução contendo o NTc foi levada ao banho de ultrassom durante quinze minutos para promover a dispersão do material. Após esse procedimento, uma alíquota de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  da solução foi depositada sobre a superfície do eletrodo de ouro, modificados previamente com MCP. O eletrodo foi levado à estufa para promover a nanoestruturação, como descrito no item 4.4.

### **3.10. Imobilização da enzima urease sobre o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF**

Para a imobilização da enzima,  $15 \text{ }\mu\text{L}$  de uma solução contendo  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  urease (Urs) +  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDC +  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de NHS em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,2 foram adicionados sobre a superfície do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF. Os eletrodos foram secos à temperatura ambiente.



### **3.11. Caracterização**

#### **3.11.1. Morfológica**

##### **3.11.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNANO) – CNPEM em Campinas. O equipamento utilizado foi um microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo (MEV/LV) JEOL 5900LV, operado com voltagem de 15 e 20 kV e modo de varredura baseado em elétrons secundários. Todas as amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro.

#### **3.11.2. Estrutural**

##### **3.11.2.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho**

A caracterização por espectroscopia na região do infravermelho foi realizada utilizando-se um espectrômetro FTIR modelo Varian 660-IR, que fica no Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) da Universidade Federal do ABC (UFABC). As amostras foram expostas a uma radiação com comprimento de onda na região do infravermelho de 600 a 2000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **3.11.2.2 Difração de Raios-X**

Os ensaios de difração foram realizados em um equipamento Stoe-STADI-P, localizado no Laboratório de Cristalografia e Caracterização Estrutural de Materiais da UFABC. Filmes contendo as nanoestruturas foram cuidadosamente removidos da superfície dos eletrodos e em seguida triturados até a obtenção de um pó fino. As amostras foram acondicionadas entre duas folhas de mica e carregadas no porta-amostra na configuração de Scherrer (feixe por transmissão). Para minimizar efeitos de anisotropia, a amostra foi mantida em rotação de  $\sim 30$  r.p.m. no plano perpendicular ao feixe. O comprimento de onda da radiação foi de  $\lambda = 1,54056$  Å, correspondente à transição  $K\alpha$  de um alvo de cobre, selecionada por um monocromador curvo de Ge (111). Foi utilizado um detector linear de estado sólido, modelo Mythen 1K, com  $D2\theta = 0.015^\circ$ , com tempos da ordem de 30 minutos por registro.

### **3.11.2.3. Espectroscopia Raman**

Os espectros Raman foram obtidos em um espectrômetro microRaman Triplo T64000, HoribaJobin-Yvon com detector CCD que fica na Central Multiusuário da UFABC. Foram utilizadas linhas de excitação na região do visível em 532,8 nm com um Laser Verdi G5, Coherent Inc., operando com potência de 0,5W, sendo a potência nas amostras de 10 mW.

### 3.11.3. Eletroquímica

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica com três compartimentos onde os eletrodos estudados foram utilizados como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contra eletrodo e o ECS como eletrodo de referência. As análises foram feitas em um potenciostato Autolab Fra 2, Type III, disponível no Laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) – UFABC.

#### 3.11.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica foi utilizada para investigar a eletroatividade do eletrodo de ouro referente ao tempo de adsorção da 4-mercaptopiridina (MCP) sobre a sua superfície. Voltamogramas cíclicos foram obtidos no intervalo de potencial -0,2 a 1,0 V vs. ECS, a uma velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ,

Para investigar a dessorção da MCP, voltamogramas foram obtidos no intervalo de potencial de -0,4 a -1,3 V vs. ECS, a uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . Ambas as análises foram realizadas em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 10.

A eletroatividade dos eletrodos nanoestruturados sintetizados em vapor de água e vapor de anilina foram investigadas aplicando um intervalo de potencial entre -0,2 a 1,0 V vs. ECS e velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , na ausência e na presença de sucessivas adições de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Na presença de sucessivas adições de ureia, somente o eletrodo sintetizado em vapor de anilina foi analisado.

Para investigar a eletroatividade da polianilina sintetizada na superfície do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF. Voltamogramas cíclicos foram obtidos no intervalo de

potencial -0,2 a 1,0 V vs. ECS, a uma velocidade de varredura de 25 mV s<sup>-1</sup> em solução contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Para investigar a eletroatividade do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF. Os voltamogramas cíclicos foram obtidos no intervalo de potencial -0,2 a 1,0 V vs. ECS, a uma velocidade de varredura de 25 mV s<sup>-1</sup> em solução contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e KCl. 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.11.3.2 Voltametria de Onda Quadrada

Para calcular a sensibilidade do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF mediante sucessivas adições de NH<sub>4</sub>OH, os parâmetros foram otimizados em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> na presença de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH. O mesmo foi feito para calcular a sensibilidade do eletrodo na presença de sucessivas adições de ureia.

Para calcular a sensibilidade do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni mediante sucessivas adições de ureia, os parâmetros foram otimizados em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,2 na presença de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de ureia.

Para calcular a sensibilidade do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs mediante sucessivas adições de ureia, os parâmetros foram otimizados em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 na presença de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de ureia.

Para todos os estudos, os parâmetros otimizados foram:

- Frequência = 50 Hz;
- Amplitude de pulso = 70 mV e
- ΔEs = 2 mV.

### 3.11.3.3. Voltametria de Pulso Diferencial

Para calcular a sensibilidade do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs mediante sucessivas adições de ureia, os parâmetros foram otimizados em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 na presença de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de ureia amplitude de pulso 25 mV, velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>.

### 3.11.3.4. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi empregada para investigar os processos cinéticos e difusionais das amostras que ocorrem nas interfaces eletrodo/eletrólito [61]. Os valores de impedância são normalmente apresentados através do diagrama de Nyquist, onde pode-se observar os valores da parte imaginária da impedância ( $Z''$ ) em função da parte real ( $Z'$ ) [62].

Para caracterizar o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs, foram aplicadas perturbações senoidais com amplitudes de  $\pm 10$  mV no intervalo de frequência entre 1 e 10<sup>5</sup> Hz, em potencial de circuito aberto (0,26 V vs. ECS), os testes foram realizados em solução aquosa de contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e KCl. 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

Para caracterizar o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs foram aplicadas perturbações senoidais com amplitudes de  $\pm 10$  mV no intervalo de frequência entre 10<sup>-2</sup> Hz a 10<sup>5</sup> Hz, em potencial de circuito aberto (0,24 V vs. ECS), os testes foram realizados em solução aquosa de contendo [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> 5,0 mmol L<sup>-1</sup> e KCl. 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

### **3.11.4. Superfície**

#### **3.11.4.1. Ângulo de Contato**

O estudo da molhabilidade foi determinado a partir do ângulo de contato no equipamento Digi Drop MCAT à 20°C, localizado no laboratório de Eletroquímica e Materiais Nanoestruturados (LEMN) – UFABC. Os eletrodos de ouro, com as respectivas modificações, foram posicionados na base do equipamento. Uma alíquota de 5 µL de água ultra pura (sistema Milli-Q 18,2MΩ) foi depositada manualmente sobre a superfície do material. Foram estudados três tempos de equilíbrio da gota na superfície dos eletrodos modificados: 0, 120 e 300 segundos. Para cada região foram realizadas cinco medições de ângulo contabilizando no total 15 pontos de amostragem.

## **4. Resultados e Discussão**

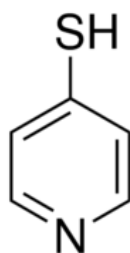
Propomos utilizar o eletrodo de ITO para promover a nanoestruturação do peptídeo. No entanto, durante a realização dos experimentos, verificou-se que as micro/nanoestruturas lixiviaram da superfície do ITO e, desta maneira, foi necessária a sua substituição. Foram testados dois eletrodos, ouro e carbono vítreo e em ambos os eletrodos, foi possível promover a nanoestruturação. Contudo, durante os ensaios eletroquímicos, observou-se baixa adesão do material sintetizado sobre a superfície do carbono vítreo. Diante desse fato, o eletrodo escolhido para a realização dos estudos foi o eletrodo de ouro.

### **4.1. Caracterização do Eletrodo de Ouro Modificado com 4-mercaptopiridina (MCP)**

#### **4.1.1. Caracterização eletroquímica e Morfológica**

A superfície do eletrodo de ouro foi modificada com uma solução de 4-mercaptopiridina para assegurar que as nanoestruturas de peptídeos ficassem adsorvidas sobre a sua superfície. No entanto, a limpeza da superfície do ouro é uma etapa de grande influência na formação das monocamadas auto-organizadas (SAM). Superfícies contendo impurezas diminuem a adsorção dos tióis e, conseqüentemente, afetam a cinética de formação das SAM. Sabe-se que tióis como a molécula 4-mercaptopiridina (MCP), (Figura 12) adsorvem rapidamente em superfícies de ouro de forma ordenadas [63] através da ligação entre o grupo tiol (SH), chamada também de mercaptana e o ouro. Contudo, a literatura apresenta

divergências quanto ao tempo de adsorção dos tióis e organização das monocamadas [64-66]. Mas, há um consenso geral de que a formação de SAM de tióis ocorre em duas etapas, segundo um processo adsortivo descrito pelo modelo de Langmuir: inicialmente uma quimissorção caótica, seguida de uma etapa organizacional que é dependente do tempo [63-66].



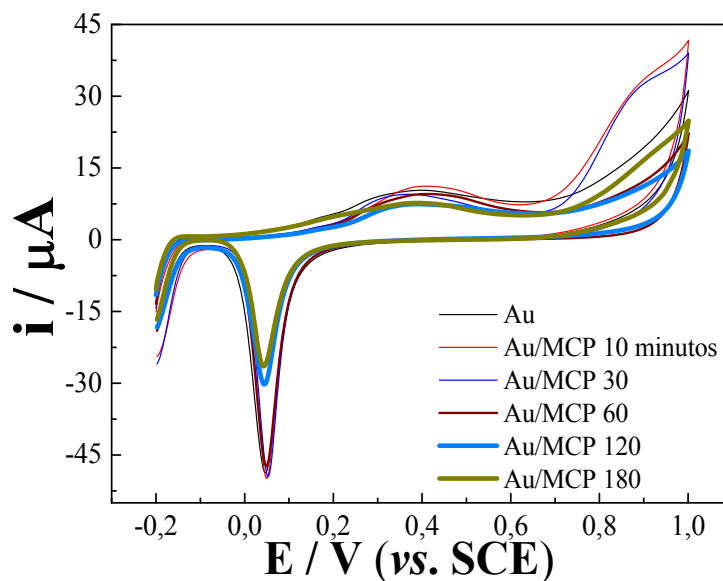
**Figura 12.** Fórmula estrutural da molécula de tiol 4-mercaptopiridina (MCP).

Para assegurar a adsorção do tiól sobre a superfície do eletrodo de ouro, foi realizado um estudo referente ao tempo de adsorção. Os eletrodos foram imersos em uma solução contendo MCP durante 10, 30, 60, 120 e 180 minutos. A Figura 13 apresenta o perfil voltamétrico do eletrodo de ouro puro em NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> e em diferentes tempos de exposição à solução de MCP.

Observa-se em todos os voltamogramas (Figura 13), a presença de um pico anódico por volta de +0,4 V e um pico catódico em +0,05 V que pode ser atribuído a oxidação e redução de óxido ou hidróxido de ouro Au(OH)<sub>3</sub> formado na superfície do eletrodo [67]. Os eletrodos que ficaram imersos na solução de MCP durante 10, 30 e 60 minutos não apresentaram mudança significativa de corrente comparado ao eletrodo de ouro puro, esse comportamento indica que não houve uma adsorção significativa da MCP sobre a superfície do ouro. Já para os tempos 120 e 180 minutos verifica-se uma diminuição da corrente anódica e catódica quando

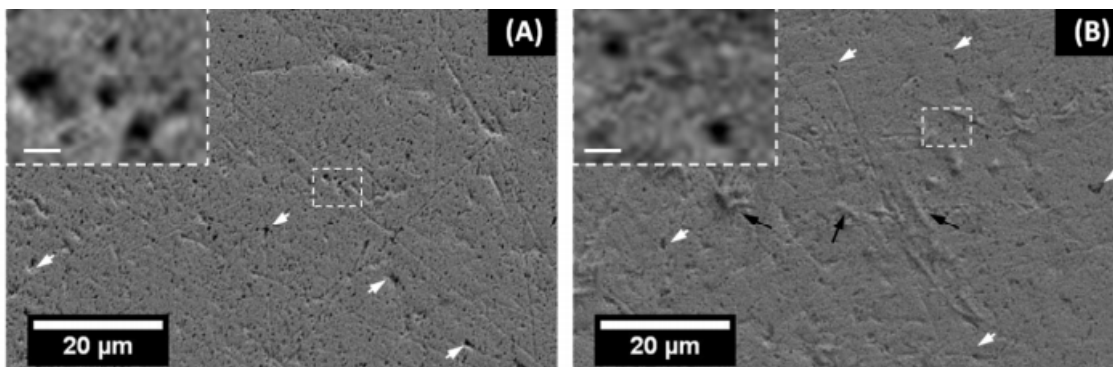


comparado aos demais tempos, indicando que houve o recobrimento da superfície do ouro com a molécula MCP. Contudo, comparando-se os dois tempos 120 e 180 minutos, a mudança no perfil voltamétrico não foi significativa, portanto, o tempo escolhido para os demais ensaios foi o de 120 minutos.



**Figura 13.** Voltamograma cíclico do eletrodo de ouro puro e em diferentes tempos de exposição à solução de MCP. Eletrólito NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura 25 mV s<sup>-1</sup>.

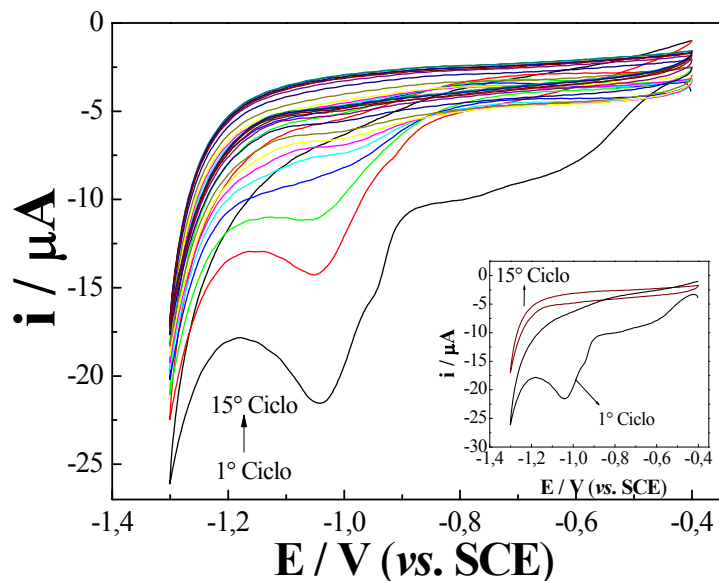
As imagens de microscopia eletrônica de varredura, Figura 14, mostram a superfície do eletrodo de ouro puro e modificado, após 120 minutos imersos em solução de MCP.



**Figura 14.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) eletrodo de ouro puro. (B) eletrodo de ouro modificado, após 120 minutos imersos em solução de MCP. Linha branca tracejada corresponde a ampliação dos buracos indicados pela seta branca (barra de escala 1 µm).

O eletrodo de ouro puro (Figura 14(A)) apresenta alguns buracos, indicados por setas brancas, a área branca tracejada indica a ampliação desses buracos. As estimativas sobre o tamanho dessas cavidades (30 contagens) revelam diâmetros médios de  $\sim 450$  nm. O recobrimento com MCP é distribuído por todo o substrato (Figura 14(B)), mas parece não ser homogêneo em escala micrométrica e alguns agregados são facilmente encontrados na camada (setas pretas em B).

Continuando a caracterização do eletrodo de ouro modificado com MCP, foi realizado o estudo de dessorção eletroquímica. Foram registrados voltamogramas cíclicos em solução de NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  variando o potencial entre  $-0,4$  a  $-1,3 \text{ V vs. ECS}$  a  $50 \text{ mV s}^{-1}$ . A Figura 15 apresenta os voltamogramas referentes à dessorção da MCP sobre a superfície do eletrodo de ouro imerso por duas horas na solução de MCP.



**Figura 15.** Voltamograma cíclico referente à dessorção da MCP (eletrodo imerso em 120 minutos n solução de MCP). Eletrólito NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>.

A dessorção de tióis ocorre através da redução por volta de -1,0 V e pode variar  $\pm 0,25$  V dependendo do tamanho da cadeia carbônica da mercaptana [68]. O processo dessortivo pode ser explicado pela seguinte reação:



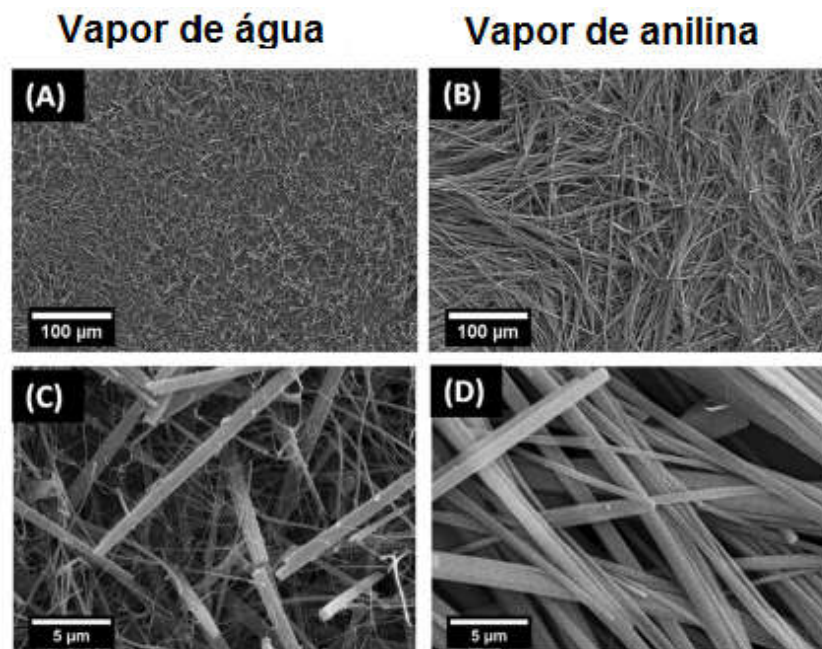
De acordo a Figura 15, observa-se um pico catódico em -1,03 V, referente à dessorção da MCP, quinze ciclos foram necessários para remover todo o tiol da superfície do ouro, como pode ser visualizado na figura inserida. Neste caso, tanto o tiol como a superfície metálica se tornam solvatados, o que faz com que o tiol se difunda para longe da superfície. O processo é reversível, ou seja, pode ocorrer a readsorção dos tióis nos metais em potenciais mais positivos. Contudo, o potencial no qual ocorre a dessorção dos tióis depende de vários fatores tais como: o tamanho da cadeia, o grau de organização da SAM, a força das interações intermoleculares no filme orgânico e a cristalinidade dos substratos [68].

## **4.2. Caracterização da micro/nanoestrutura (MNTs-FF) sintetizada em atmosfera saturada de vapor de água e em vapor de Anilina sobre eletrodo de ouro modificado com MCP**

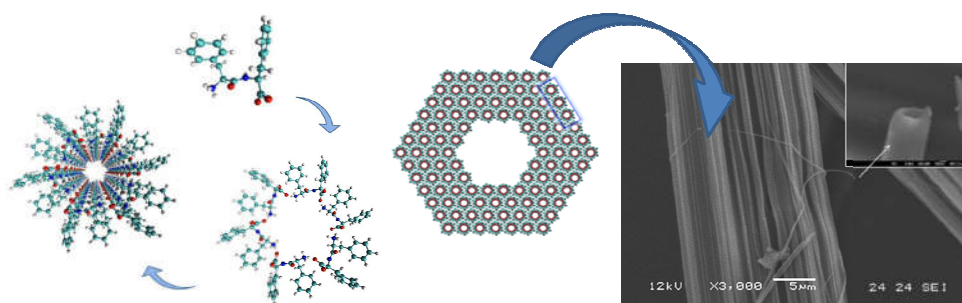
### **4.2.1 Caracterização morfológica**

Para promover a nanoestruturação do filme amorfo foi utilizado o método fase sólida-vapor. Esse método foi descrito por Ryu e colaboradores [34, 60]. Para investigar a influência do solvente no processo de nanoestruturação da FF foram realizadas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), (Figura 16). Em ambos os solventes observa-se a formação de micro/nanoestruturas de FF (MNTs-FF). A hipótese de formação dessas MNTs-FF, de acordo com trabalhos anteriormente descritos pelo grupo [69], se dá a partir da geração de nanoestruturas via interações hidrofóbicas entre os resíduos aromáticos da FF que por agregação formam microestruturas, Figura 17.

Observando as imagens de MEV, detalhes foram revelados para as micro/nanoestruturas formadas em diferentes atmosferas. Quando incubado em atmosfera saturada de vapor de água (Figura 16(A e C)), as MNTs-FF auto-organizaram em microfilamentos retos dispostos em feixes. No entanto, quando incubado em uma atmosfera gerada pelo vapor de anilina, (Figura 16(B e D)), as MNTs-FF estão distribuídas por todo o substrato, formando uma rede entrelaçada de estruturas fibrilares. Esse fato pode estar relacionado com a pressão de vapor da anilina [60].



**Figura 16.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micro/nanestruturas (MNTs-FF) obtidas em vapor de água (A e C). Vapor de anilina (D e F).



**Figura 17.** Representação do possível mecanismo de formação das micro/nanoestruturas [69, 70].

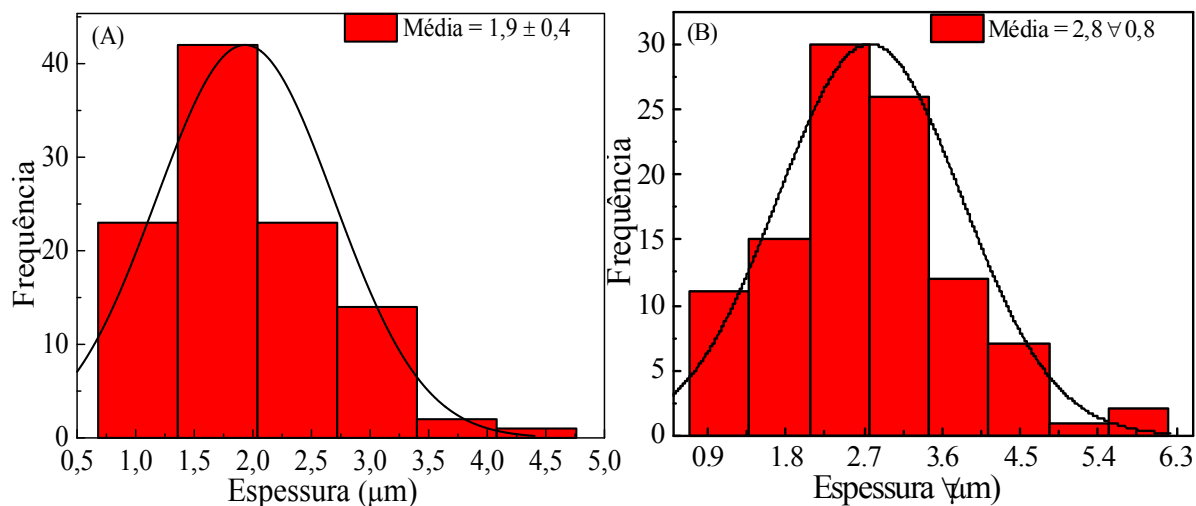
A pressão de vapor da anilina em 98 °C é de aproximadamente 0,055 atm. Dessa maneira, a pressão não seria suficiente para a deposição de gotículas de solvente na superfície do eletrodo modificado, favorecendo a distribuição homogênea das fibras por todo o substrato. Em atmosfera de vapor de água, a água está muito próxima do seu ponto de ebulição, o que implica uma elevada taxa de evaporação, ocasionando a coalescência de gotículas de água na superfície do

eletrodo. Esta coalescência permite a formação de aglomerados e de centros de nucleação, favorecendo a formação de microfilamentos retos. Demirel e colaboradores [71] estudaram a influência do solvente no processo de nanoestruturação. Para tanto, os autores prepararam nanoestruturas com a concentração da solução precursora em  $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ , e promoveram variações quanto ao solvente. Os resultados revelaram a relação entre o efeito solvente e as constantes dielétricas para as morfologias das nanoestruturas formadas, conforme listado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Efeito do solvente na automontagem de nanoestruturas de L,L-difenilalanina [71].

Solvente	Constante Dielétrica	Estrutura Formada
Água	80,1	Nanotubo
Metanol	32,6	Nanotubo
Etanol	24,3	Nanotubo
Acetona	20,7	Nanovesícula

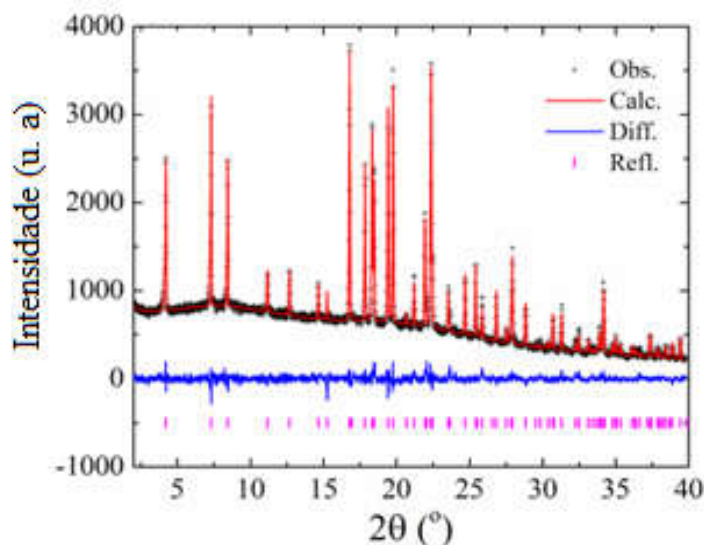
Ainda, por meio das imagens de MEV, foi realizada a distribuição da espessura das MNTs-FF para ambos os solventes. As análises qualitativas referentes aos histogramas foram realizadas sobre uma população de 100 partículas para cada vapor de solvente. A Figura 18(A e B) mostra o histograma para as MNTs-FF obtidas em vapor de água e vapor de anilina respectivamente. A espessura média foi de aproximadamente  $1,9 \pm 0,4 \text{ }\mu\text{m}$  para a MNTs-FF sintetizada em vapor de água e  $2,8 \pm 0,8 \text{ }\mu\text{m}$  para a MNTs-FF obtida em vapor de anilina. Atmosfera de vapor de anilina permite sintetizar estruturas auto-organizadas maiores e mais homogênea.



**Figura 18.** Histogramas de distribuição de diâmetro das micro/nanoestruturas obtidas em: (A) Vapor de água e (B) Vapor de anilina.

#### 4.2.2 Caracterização Estrutural

Para verificar a influência do solvente quanto à estrutura, as MNTs-FF foram caracterizadas utilizando difração de raios-X (DR-X) e espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR). A Figura 19 apresenta o difratograma para a MNTs-FF sintetizada em vapor de água. O padrão de difração foi indexado para uma estrutura hexagonal com grupo de simetria  $P6_1$ . Isto está de acordo com o grupo de simetria previamente estabelecida por Gorbitz [40], porém, com diferentes arranjos espaciais das moléculas de água no interior dos tubos.



**Figura 19.** Difratograma da micro/nanoestrutura de L,L-difenilalanina (MNTs-FF) sintetizada sob vapor de água. O símbolo x representa os dados observados experimentalmente (observado). O refinamento de Rietveld (linha vermelha) representa o modelo calculado, A linha azul mostra a diferença entre os dados observados e calculados. Os traços em magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase hexagonal ( $P6_1$ ).

O arranjo estrutural no qual o material sintetizado em vapor de água se cristaliza, leva a formação espontânea de uma estrutura tubular contendo seis moléculas de FF em sua célula unitária. Os valores refinados para os parâmetros da cela unitária, após o ajuste de Rietveld são mostrados na Tabela 2.

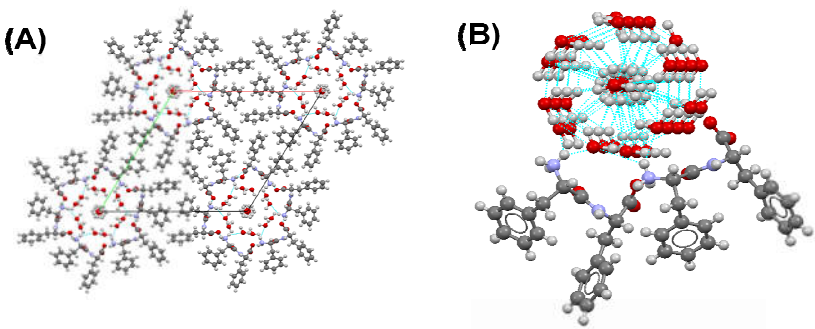
A orientação do crescimento do tubo acontece na direção do parâmetro de rede  $c$ , a partir da interação entre as moléculas localizadas nos vértices das células unitárias mais próximas. Os canais internos possuem moléculas de água que interagem com as cadeias de peptídeo por ligações de hidrogênio (linha tracejada ciano) apresentando um caráter hidrofílico a sua estrutura interna como mostra a Figura 20(A). Curiosamente, algumas outras moléculas de água são dispostas ao longo do eixo  $c$ , formando assim uma cadeia infinita numa conformação em hélice, como mostrado na Figura 20(B). As hélices possuem anéis benzênicos voltados



para fora do tubo interno. Assim estes anéis hidrofóbicos interagem entre si por uma interação não localizada do orbital  $\pi$ , chamado de interações  $\pi$ – $\pi$  *stacking*.

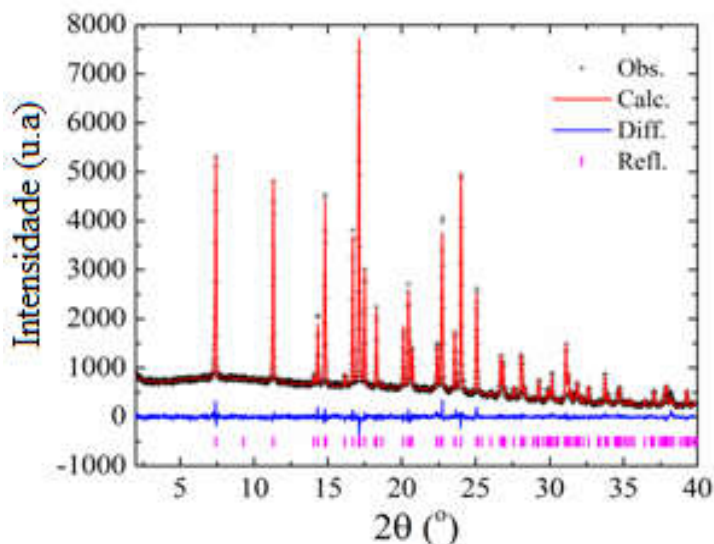
**Tabela 2.** Informações cristalográficas obtidas para a micro/nanoestrutura de FF sintetizada em vapor de água. Número de moléculas por célula unitária (Z). A concordância entre o perfil observado e calculado são os resíduos, obtidos a partir da diferença entre as intensidades observadas e calculadas. A qualidade dos ajustes são representados por  $R_{Bragg}$ ,  $R_{wp}$ ,  $R_{exp}$  e  $\chi^2$ .

Micro/nanoestruturas sintetizadas em vapor de água	
Sistema Cristalino	Hexagonal
Grupo espacial	$P6_1$
$a$ [Å]	24,1616(10)
$c$ [Å]	5,4485(2)
$V$ [Å <sup>3</sup> ]	2754,62(26)
Z	6
$R_{Bragg}$ (%)	2,712
$R_{wp}$ (%)	4.875
$R_{exp}$ (%)	3,917
$\chi^2$	1,244



**Figura 20.** (A) Grupo espacial  $P6_1$  representado ao longo da direção do eixo  $c$ . Moléculas de água localizadas no canal interno do tubo do peptídeo em que aparecem ligadas por linhas sólidas que delimitam a célula unitária. (B) Detalhe das moléculas de água que mostra a estrutura dispostas ao longo do eixo  $c$  formando uma cadeia infinita organizada numa conformação em hélice.

Os picos de difração para as MNTs-FF sintetizadas em vapor de anilina são claramente diferentes, sugerindo assim, outra estrutura de cristal, como mostra a Figura 21. Esta nova fase foi indexada num sistema cristalino ortorrômbico, grupo de simetria  $P22_12_1$ , como descrito por Gdaniec e Liberek [72].



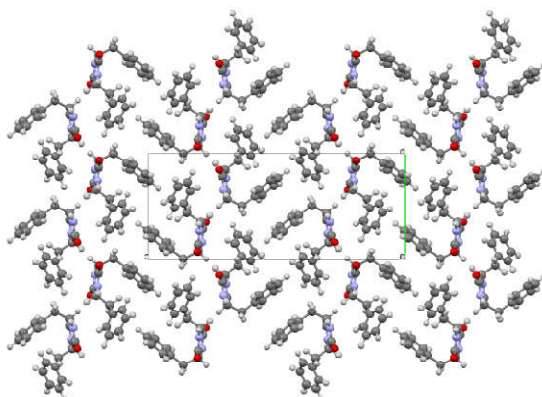
**Figura 21.** Difratograma das MNTs-FF sintetizadas sob vapor de anilina. O símbolo x representa os dados observados experimentalmente (observado). O refinamento de Rietveld (linha vermelha) representa o modelo calculado, A linha azul mostra a diferença entre os dados observados e calculados. Os traços em magenta na parte inferior indicam as reflexões de Bragg da fase ortorrômbica  $P22_12_1$ .

Os valores finais refinados para os parâmetros da cela unitária após o ajuste de Rietveld são mostrados na Tabela 3. Observa-se que as informações cristalográficas obtidas para o material sintetizado em vapor de água e vapor de anilina são distintas, indicando que o solvente realmente influencia na variação estrutural. A estrutura cristalina das MNTs-FF sintetizadas em vapor de anilina é apresentada na Figura 22. A maneira com que as moléculas estão arranjadas na estrutura ortorrômbica confere um caráter mais hidrofílico, quando comparada com a

estrutura hexagonal. Na estrutura ortorrômbica a parte externa é composta por grupos hidrofílicos, enquanto que na estrutura hexagonal a parte externa é composta somente por anéis benzênicos conferindo um caráter hidrofóbico.

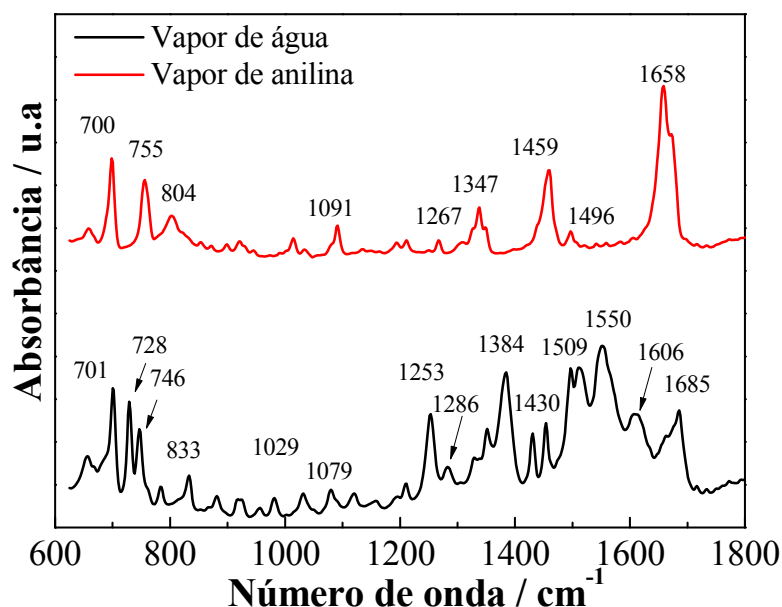
**Tabela 3.** Informações cristalográficas obtidas para a micro/nanoestrutura de FF sintetizada em vapor de anilina. A concordância entre o perfil observado e calculado são os resíduos, obtidos a partir da diferença entre as intensidades observadas e calculadas. A qualidade dos ajustes são representados por  $R_{Bragg}$ ,  $R_{wp}$ ,  $R_{exp}$  e  $\chi^2$ .

Micro/nanoestruturas sintetizadas e vapor de anilina	
Sistema Cristalino	Ortorrômbico
Grupo espacial	$P22_12_1$
$a$ [Å]	6,1764(3)
$b$ [Å]	10,3637(4)
$c$ [Å]	23,7851(10)
$V$ [Å <sup>3</sup> ]	1522,5(1)
$R_{Bragg}$ (%)	1,655
$R_{wp}$ (%)	4,215
$R_{exp}$ (%)	3,800
$\chi^2$	1,109



**Figura 22.** Estrutura cristalina obtida a partir do refinamento, a linha sólida delimita a célula unitária  $P22_12_1$ .

As MNTs-FF foram caracterizadas por FTIR a fim de verificar se o solvente influencia nos modos de vibração. Os espectros de FTIR revelam perfis distintos para as MNTs-FF sintetizadas em diferentes vapores de solvente, Figura 23.



**Figura 23.** Espectros vibracionais para as MNTs-FF sintetizadas em vapor de água e vapor de anilina.

Na MNTs-FF sintetizada em vapor de água, as duas regiões mais importantes são as que mostram a presença de cargas na molécula de FF e, no espectro essas regiões estão entre 1253-1286  $\text{cm}^{-1}$ , que é referente ao íon carboxilato (ânion), e os picos em 1509 e 1606  $\text{cm}^{-1}$ , que são referentes ao íon amônio (cátion), comparando com o espectro da MNTs-FF sintetizada em vapor de anilina nota-se que esses picos não aparecem, esse fato pode estar relacionado com a mudança de simetria da molécula. Qualitativamente, pode-se discutir a diferença do número de picos de cada um dos espectros em relação ao tipo de interação entre os mesmos. Na amostra obtida em vapor de água a estrutura hexagonal faz com que muitas

ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os grupos amina, carbonila e amida do peptídeo aconteçam, aumentando a rigidez do sistema e com isso, a frequência referente à vibração do grupo amida acaba sendo deslocada para maior número de onda ( $1685\text{ cm}^{-1}$ ). A atribuição acerca dos modos vibracionais consta na Tabela 4.

**Tabela 4.** Número de onda e o modo vibracional esperado para o micro/nanomaterial obtido utilizando água na fase vapor [73].

Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo Vibracional Esperado
<b>701</b>	Deformação angular C=C anel aromático
<b>728</b>	Deformação angular simétrica N-H
<b>746</b>	Deformação angular assimétrica fora do plano (abano) C-H
<b>782/833</b>	Deformação angular simétrica (abano) N-H
<b>1029</b>	Deformação angular simétrica (scissoring) $\text{CH}_2$
<b>1079</b>	Estiramento C-N
<b>1253/1286</b>	Estiramento C=O
<b>1384</b>	Deformação axial simétrica $(\text{C=O})_2$
<b>1430</b>	Deformação angular C-O-H
<b>1459</b>	Estiramento C=C anel aromático
<b>1496</b>	Deformação angular N-H
<b>1509</b>	Estiramento C=C anel aromático
<b>1550</b>	Estiramento assimétrico $\text{CO}_2$
<b>1606</b>	Deformação angular N-H (banda amida II)
<b>1685</b>	Estiramento C=O (banda amida I)

Quando existe um material com a estrutura ortorrômbica, a interação é menor e, devido à ausência de moléculas água para formar ligações de hidrogênio, faz com que a cadeia apresente menor rigidez para a nanoestrutura e por consequência, as ligações amidas apresentam menor força, diminuindo a absorção de radiação no

infravermelho ( $1658\text{ cm}^{-1}$ ). A atribuição dos modos vibracionais para a MNTs-FF sintetizada em vapor de anilina consta na Tabela 5.

**Tabela 5.** Número de onda e o modo vibracional esperado para o micro/nanomaterial obtido utilizando anilina na fase vapor [73].

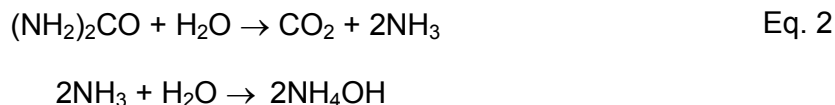
Número de Onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	Modo Vibracional Esperado
700	Deformação angular C=C anel aromático
755	Deformação angular assimétrica fora do plano (abano) C-H
804	Deformação angular simétrica (torção) N-H
1091	Estiramento C-N
1193/1211	Deformação angular $\text{CO}_2^-$
1267	Estiramento C=O
1347	Estiramento N-C=O (banda amida III)
1459	Estiramento C=C anel aromático
1496	Deformação angular N-H
1658	Estiramento C=O (banda amida I)

#### 4.2.3 Caracterização Eletroquímica

Com o intuito de utilizar a MNTs-FF como sensor de ureia, estudos eletroquímicos foram realizados com adição de hidróxido de amônio e posteriormente, adição de ureia, para verificar se a mesma apresentaria alguma resposta eletroquímica. Como já discutido anteriormente, o método fase sólida-vapor foi utilizado para sintetizar a micro/nanoestrutura de FF (MNTs-FF) sobre um eletrodo de ouro modificado com 4-mercaptopiridina (MCP), desta maneira, para melhor compreensão será abordada a nomenclatura Au/MCP/MNTs-FF referente ao eletrodo de ouro modificado.

#### 4.2.3.1. Estudo do Comportamento eletroquímico da micro/nanoestrutura (Au/MCP/MNTs-FF) sintetizada em vapor de anilina e em vapor de água frente à adição de Hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH)

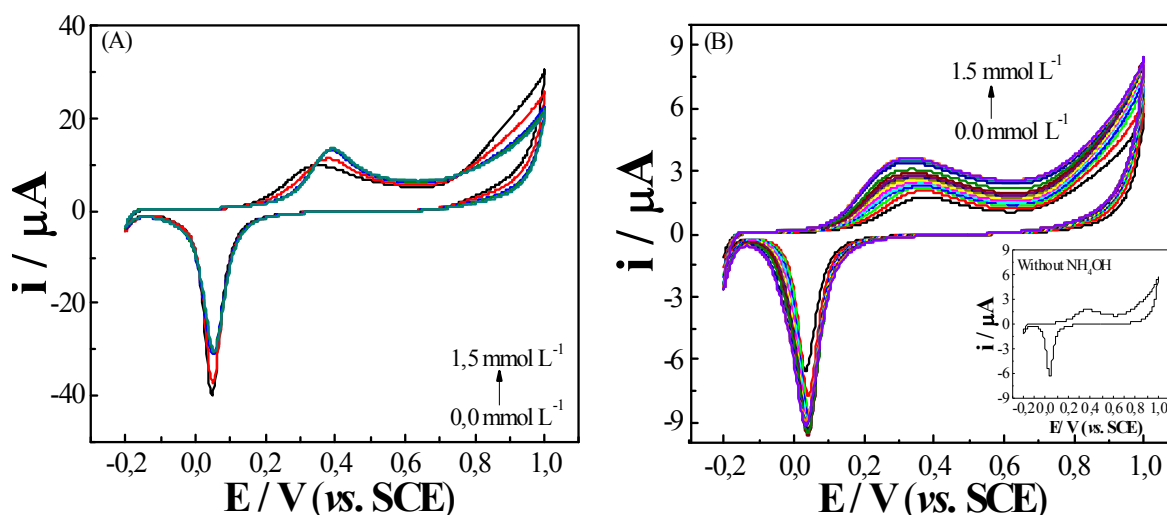
Antes de iniciar os estudos eletroquímicos com o eletrodo de ouro modificado (Au/MCP/MNTs-FF) para a detecção de ureia, é essencial um estudo preliminar por voltametria cíclica para compreender o comportamento redox do eletrodo na presença de íons amônio em solução. Sabe-se que em solução aquosa, a ureia sofre hidrólise de acordo com a equação [74]:



Assim, íons amônio são um importante intermediário que aparece na catálise da ureia. A Figura 24(A) apresenta o voltamograma para o eletrodo contendo a MNTs-FF organizada na fase hexagonal. Quando alíquotas de NH<sub>4</sub>OH foram adicionadas ao eletrólito no intervalo de concentração entre 0,1 a 1,5 mmol L<sup>-1</sup>, observa-se um pico anódico bem definido em E<sub>pa</sub> = + 0,4 V e um pico catódico em E<sub>pc</sub> = +0,04 V. Ambos os picos podem ser atribuídos a oxidação e redução do oxi-hidroxi de ouro (AuO ou Au(OH)<sub>2</sub>), espécies formadas na superfície do eletrodo [75]. Apesar do notável comportamento catalítico inicial, percebeu-se que o sistema não se mantém estável, apresenta baixa adesão das MNTs-FF à superfície do ouro, seguido por um forte decréscimo da resposta eletroquímica depois de alguns ciclos de potenciais.

A liberação do material corrobora uma mudança no potencial de oxidação, Figura 24(A), onde um claro ponto isobéstico aparece em +0,34 V. Este ponto de cruzamento é provavelmente relacionado à lixiviação dos peptídeos da superfície do

eletrodo, resultando na variação do potencial da dupla camada elétrica. Atribuímos à lixiviação eletroquímica ao comportamento entre as interações das unidades da piridina da camada da mercaptopiridina (MCP) com os anéis aromáticos do peptídeo. Os anéis de piridina são capazes de interagir entre si e com grupos aromáticos por meio de fortes interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  *stacking* [76]. Porém, no método fase sólida-vapor, as moléculas de MCP são previamente ancoradas no eletrodo de ouro por meio de interações Au-S, dessa maneira, suas unidades de piridina não são livres para virar ou intercalar na matriz do peptídeo para estabelecer interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking* com os anéis aromáticos. Como mostra a figura 20(A), a simetria  $P6_1$  exibe hexâmeros aromáticos formando uma fase colunar, orientado paralelo ao longo do eixo de montagem. Nesta configuração, obstáculos estéricos presumidamente impedem a formação de ligações  $\pi$ - $\pi$  com piridina presa na camada de tiol, fazendo a interação entre MNTs-FF e o substrato de ouro ser mais fraca.



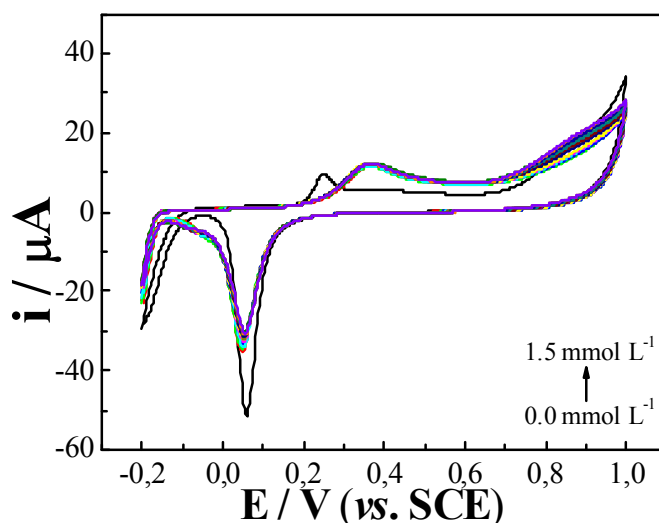
**Figura 24.** Voltamograma cíclico para os eletrodos Au/MCP/MNTs-FF sintetizado em (A) vapor de vapor de água e (B) vapor de anilina, o detalhe corresponde ao voltamograma sem adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Os ensaios foram conduzidos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10 com sucessivas adições de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .



Voltamogramas cíclicos são mostrados na Figura 24(B) para o eletrodo obtido em vapor de anilina. Ao contrário dos eletrodos organizados na simetria  $P6_1$ , esse eletrodo parece ser muito estável e apresenta um comportamento eletrocatalítico depois de vários ciclos voltamétricos. Essa estabilidade resulta dos aspectos estruturais singulares da MNTs-FF agora organizadas em uma simetria ortorrômbica. Nessa organização, a fase colunar observada no arranjo  $P6_1$  já não é encontrada e os anéis aromáticos da FF que se encontram na superfície externa da estrutura são capazes de se ligar com os anéis de piridina por interações  $\pi$ - $\pi$  *stacking*. Além disso, sítios de nitrogênio e oxigênio fornecem uma interface mista (hidrofóbica/hidrofílica) com maior afinidade para permitir interações com a piridina e ligações de hidrogênio. Aqui, as micro/fitas podem estabelecer interação mais forte com anéis de piridina na camada contendo a MCP. Esta descoberta é um exemplo notável do papel fundamental da estrutura do cristal em arquiteturas de sensoriamento e destaca as características exclusivas fornecidas pela utilização de anilina na fase gasosa durante o processo de nanoestruturação.

Similar ao primeiro eletrodo, o sistema exibe um pico anódico em aproximadamente +0,4 V e um pico catódico em  $\approx$  +0,05 V (VS. SCE) devido a reação redox do oxi-hidroxi de ouro ( $\text{AuO}$  ou  $\text{Au(OH)}_2$ ), espécies formadas na superfície do eletrodo [75]. No entanto, o eletrodo modificado exibiu um potencial decrescente, em conjunto com o aumento da corrente de pico anódica, após a adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , indicando atividade catalítica frente à oxidação de amônia. O eletrodo de ouro puro não mostrou atividade em meio alcalino contendo solução de amônia, Figura 25. Esses resultados sugerem que a MNTs-FF pré concentram íons  $\text{NH}_4^+$  e facilitam as reações redox dos clusters de óxido/hidroxi de ouro no substrato. De fato, a função do ouro como um eletrocatalisador em meio alcalino por adsorver

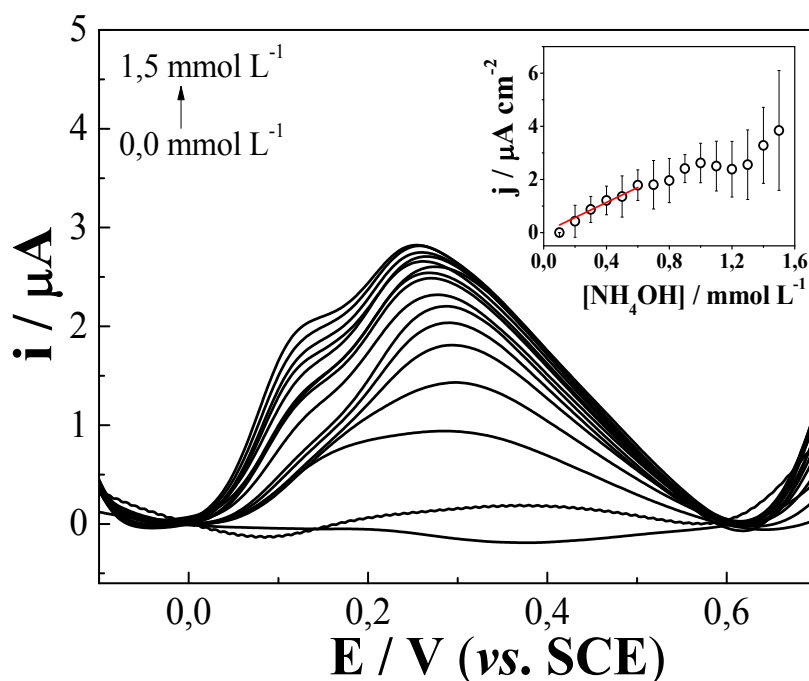
grupos hidroxila facilita as reações de oxidação [75, 77, 78]. No entanto, a amônia não exibe uma forte interação com a superfície de ouro, porque não adsorve ou é fracamente adsorvido e é restrita a uma orientação específica do ouro [75, 77], Nosso eletrodo Au/MCP/MNTs-FF mostrou melhor desempenho catalítico nesse meio, provavelmente devido à formação de complexos facilitando a transferência eletrônica.



**Figura 25.** Voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro puro. Os ensaios foram conduzidos a  $25 \text{ mV s}^{-1}$  em NaOH  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 10 com sucessivas adições de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

Estudos de concentração foram realizados através da resposta do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF para diferentes concentrações de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , (Figura 26), usando SWV, que é uma técnica eletroanalítica comum usada em análises quantitativa por causa da sua sensibilidade. Na Figura 26, observa-se que em concentrações de íons  $\text{NH}_4^+$  maior que  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ , a corrente não aumenta mais. Esse fenômeno é normalmente atribuído a saturação de sítios catalíticos. Uma relação linear (Eq. 3) foi observada entre a corrente de resposta e a concentração (detalhe da Figura 26) no intervalo de concentração de  $0,1$  a  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ .

$$I_p (\mu\text{A}) = (2,83 \pm 0,16) [\text{NH}_4^+] / \text{mmol L}^{-1} \quad \text{Eq. 3}$$



**Figura 26.** Voltamograma de onda quadrada do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF sintetizado em vapor de anilina com adições de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $0,1$  a  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de íons amônio na corrente de pico anódica. Eletrólito  $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Frequência  $50 \text{ Hz}$ , Amplitude de pulso  $70 \text{ mV}$  e  $\Delta E$ s  $2 \text{ mV}$ .

A sensibilidade foi obtida a partir do coeficiente angular da reta como sendo  $2,83 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}$  enquanto o limite detecção (LD) foi determinado como sendo  $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$  obtido através da relação:  $\text{LD} = 3 \text{ vezes o desvio Padrão/sensibilidade}$ . Esses valores são comparáveis com os previamente relatados na literatura, como mostra a Tabela 6. Especificamente o LD apresentou valor mais baixo e a sensibilidade foi comparável à de outros eletrodos modificados com nanopartículas para detecção de amônia.

A partir dos ensaios eletroquímicos, verificou-se que a MNTs-FF sintetizada em vapor de água não apresentou boa adesão à superfície do eletrodo de ouro, dessa maneira, os demais resultados serão referentes ao eletrodo Au/MCP/MNTs-FF sintetizada em atmosfera de vapor de anilina.

**Tabela 6.** Comparação de desempenho de sensores de íon amônio baseados em eletrodos com diferentes materiais.

Eletrodo	Sensibilidade ( $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{Lcm}^{-2}$ )	Faixa linear ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Limite de deteccção ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Referência
PPy nanowires/Au	6,15	Não especificado	4,8	[7]
PANI-PSSMA(II)/Au/ $\text{Al}_2\text{O}_3$	10,5	0,0 – 12	Não especificado	[79]
PANI-Nafion/Pt-C	$40 \pm 20$	0,005 – 1	5,0	[80]
L-glutamic acid hydrochloride/SAW devices	Não especificado	0,0 -0,56	30	[81]
Porous SiC/p-type Si wafer/Al	Não Especificado	0,0 -0,56	27	[82]
Au/MCP/MNTs-FF	2,83	0,1- 1	0,17	Esse trabalho

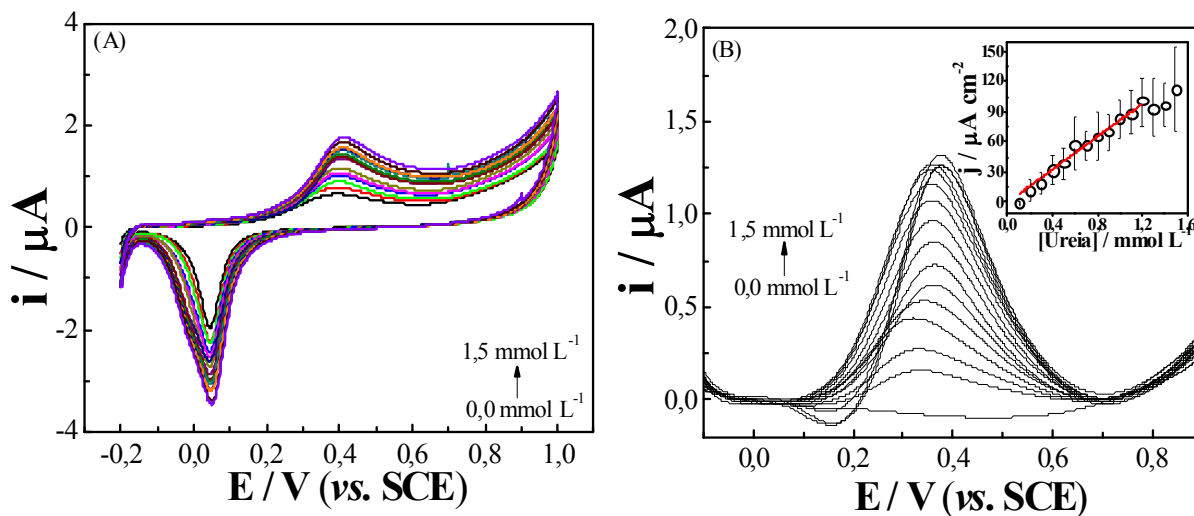
\*PPy, polipirrol, PANI, polianilina, PSSMA(II), poli(estirenosulfonato-co-ácido maleico).

#### 4.2.3.2. Estudo do Comportamento eletroquímico da micro/nanoestrutura (MNTs-FF) sintetizada em vapor de anilina frente à adição de ureia

O comportamento eletroquímico do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF, mediante adições de ureia, apresenta características semelhantes aos obtidos para a adição de amônia, como pode ser observado na Figura 27(A). A oxidação da ureia em meio alcalino, ocorre em potencias acima de +0,35 V [83, 84]. A curva analítica mostrada no detalhe da Figura 27(B) indica uma resposta linear na faixa de concentrações entre 0,1-1,1  $\text{mmol L}^{-1}$ , de acordo com a Eq 4:

$$I_p (\mu\text{A}) = (81,27 \pm 1,75) [\text{ureia}] / \text{mmol L}^{-1} \quad \text{Eq. 4}$$

A sensibilidade e o limite de deteccção foram determinados como 81,27  $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol}^{-1} \text{L}$  e 0,06  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 27.** Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF sintetizados em vapor de anilina com adições de ureia (0,1 a 1,5 mmol L<sup>-1</sup>) em eletrólito NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. (A) voltamograma cíclico, velocidade de varredura 25 mV s<sup>-1</sup>. (B) Voltamograma de onda quadrada. O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de ureia na corrente de pico anódica. Frequência 50 Hz, Amplitude de pulso 70 mV e ΔEs 2 mV.

A tabela 7 apresenta uma comparação entre os eletrodos descritos na literatura com o eletrodo desenvolvido nesse trabalho. Observamos que os eletrodos de ouro modificados exibiram maior sensibilidade para a detecção de ureia, apesar do seu simples protocolo de preparação e a falta de mediadores enzimáticos. Notavelmente, o efeito cooperativo de materiais nanoestruturados aumentou significativamente a sensibilidade do eletrodo. Espécies de AuO ou Au(OH)<sub>2</sub> na superfície do eletrodo provavelmente desempenharam um papel chave no mecanismo da hidrólise de ureia. A principal evidência para apoiar esta afirmação é a assinatura redox dos óxidos de ouro [75], e sua característica anódica/catódica em E<sub>pa</sub> = +0,4 V e E<sub>pc</sub> = +0,04 V que é claramente observada mesmo para os eletrodos revestidos com mercaptopiridina (Figura 24(A)). A partir dessas evidências, determinou-se o grau de recobrimento da superfície do ouro por óxido ou hidróxido

de ouro e o recobrimento com a MCP (assumido como sendo uma monocamada), utilizando a equação 5.

$$\tau = \frac{Q}{nFA} \quad \text{Eq. 5}$$

onde  $\tau$  é grau de recobrimento, ou seja, o número de moléculas por área,  $Q$  é a carga transferida na reação redox (determinada a partir da integral dos picos de oxidação para o óxido de ouro e redução para a MCP) da Figura 13,  $n$  é o número de elétrons por molécula envolvida na reação ( $n=1$ , seja para a MCP ou para Au),  $F$  é a constante de Faraday ( $= 96500 \text{ C mol}^{-1}$ ) e  $A$  é a área geométrica do eletrodo ( $= 0,071 \text{ cm}^2$ ). A cobertura da superfície por óxido no eletrodo de ouro puro foi de  $\tau_{\text{AuO/Au(OH)}_2} \sim 2,9 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ , e para MCP  $\tau_{\text{MCP}} \sim 2,2 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ . Assim, a relação da cobertura da MCP é aproximadamente 75% da área dos nossos eletrodos.

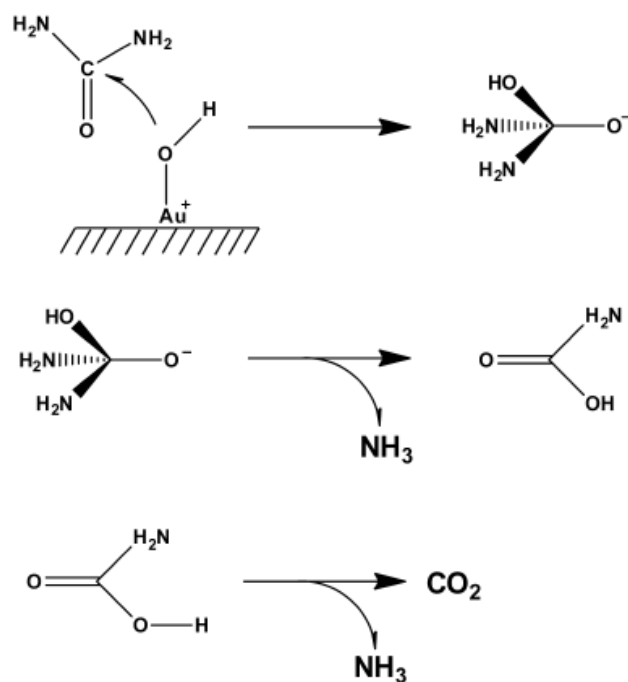
**Tabela 7.** Comparação com outros sensores descritos na literatura\*.

Eletrodo	Sensibilidade ( $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{Lcm}^{-2}$ )	Faixa linear ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Limite de detecção ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Referência
Urs-GLDH/MLG/ITO	32	1,66 – 16,6	0,6474	[85]
Urs-GLDH/ZnO-Ch/ITO	0,13	0,8 – 16,6	0,49	[86]
Urs/PAPCP/ITO	0,47	0,16 – 5,02	0,020	[87]
Urs-PANI-Nafion/Au	4,2	1 -10	1	[88]
Urs-SWCNTs/glassy carbon	Não especificado	0,1- 1 (não linear)	0,1	[89]
Urs-Poly(5-NH <sub>2</sub> -1-NAP)/PPy/P	0,58 – 3,44	Acima de 100	0,22 – 0,58	[90]
Au/MCP/MNTs-FF	81,3	0,1 – 1,0	0,060	Esse trabalho

\*Urs, urease; GLDH, glutamato dehidrogenase; MLG, multicamada de grafeno; ITO, óxido de índio dopado com estanho; PAPCP, poly(aminopropil pirrol-co-pirrol); PANI, polianilina; MWCNTs, nanotubos de carbono de parede de parede múltiplas, SWCNTs, nanotubos de carbono de parede simples; poly(5-NH<sub>2</sub>-1-NAP), poli(5-amino-1-naftol); PPy, polypirrol.

Além da evidência eletroquímica, a presença de óxido de ouro é suportada nas imagens de MEV (Figura 14(B)), que exibem extensa ocorrência de defeitos através da camada de MCP, uma vez que a cobertura da MCP não é homogênea. É possível que os defeitos menores não observáveis estejam presentes na camada da mercaptopiridina. O papel da MNTs-FF é fundamental, pois atua como um agente de pré-concentração da ureia, permitindo que sua difusão ocorra até a superfície onde estão disponíveis os óxidos ou hidróxidos de ouro, como sítios catalíticos. O efeito cooperativo levando à melhoria da sensibilidade também pode estar relacionado com interações atrativas entre ureia e peptídeos, através de ligações cátions-  $\pi$  entre anéis aromáticos e o grupo N-terminal ou por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila da amida e grupos N da ureia.

A Figura 28 apresenta o mecanismo proposto para a hidrólise da ureia em meio básico. Semelhante ao mecanismo utilizando sítios catalíticos de urease [91], o OH terminal do  $\text{Au}(\text{OH})_2$  está posicionado para proporcionar uma interação através do oxigênio carbonilo. Essa configuração conduz a um intermediário tetraédrico que se decompõem liberando  $\text{NH}_3$  e formando ácido carbâmico, seguido por decomposição espontânea em amônia e dióxido de carbono, o qual tem um tempo de detecção muito curto.



**Figura 28.** Mecanismo proposto para a hidrólise da ureia utilizando o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF.

#### 4.3. Funcionalização das MNTs-FF com Polianilina

As MNT-FF são materiais que possuem características de isolante elétrico ( $E_{\text{gap}} = 4,0 \text{ eV}$ ) [92], então, pensamos em funcionalizá-las com polianilina, para tentar melhorar as propriedades eletrônicas e facilitar o processo de imobilização da enzima urease. A Polianilina é um polímero condutor que apresenta propriedades intrínsecas como: estabilidade química, excelente condutividade elétrica e fácil de preparar, além disso, a PAni tem sido muito utilizada como transdutor em biossensor eletroquímico.

Os diferentes graus de oxidação da polianilina são designados pelos termos leucoesmeraldina (forma totalmente reduzida), esmeraldina (parcialmente oxidada) e pernigranilina (totalmente oxidada) [93]. Pode ser dopada por protonação, isto é, sem que ocorra alteração no número de elétrons (oxidação ou redução) associados

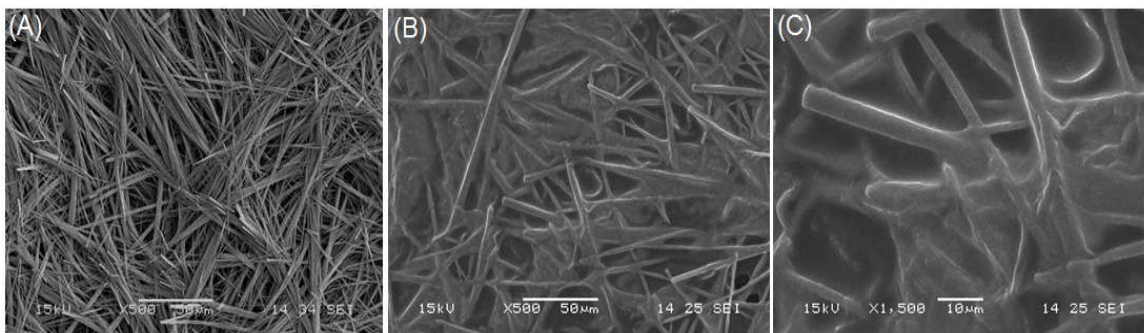


à cadeia polimérica, ou seja, os elétrons são retirados da cadeia durante a oxidação e contra-íons (dopantes) se inserem a fim de balancear a carga. A dopagem química da PANi no estado esmeraldina é feita por protonação em solução ácida aquosa, promovendo um aumento da condutividade de cerca de 10 ordens de grandeza em relação a PANi não dopada sem que aconteça alteração do número de elétrons (oxidação/redução) associados à cadeia polimérica [93-95]. O sal de esmeraldina pode ser obtido tanto por síntese química na forma de pó, utilizando um agente oxidante, quanto por síntese eletroquímica obtendo filmes finos pela oxidação eletroquímica do monômero sobre eletrodos de diferentes materiais inertes [93].

#### **4.3.1 Síntese e Caracterização da Polianilina sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF**

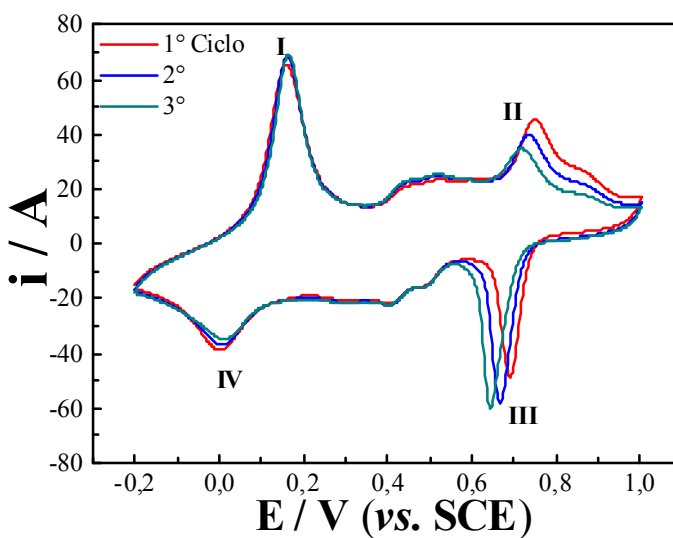
##### **4.3.1.1 Caracterização morfológica e eletroquímica**

O primeiro passo para funcionalizar a MNTs-FF com PANi foi verificar a estabilidade do peptídeo, porque para síntese eletroquímica, o eletrólito consiste de uma solução ácida de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  contendo o monômero anilina. A Figura 29(A) mostra que a MNTs-FF estão distribuídas por toda a superfície do ouro dispostos em rede entrelaçadas entre si. No entanto, após a síntese eletroquímica da PANi (carga anódica de deposição = 5 mC), o mesmo perfil pôde ser observado, Figura 29(B e C), indicando a estabilidade do peptídeo nesse pH.



**Figura 29.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para as MNTs-FF:na ausência (A) e na presença (B e C) de PANi (carga de deposição = 5 mC).

Para investigar a eletroatividade da PANi e a sua estabilidade sobre a MNTs-FF foram realizados experimentos de voltametria cíclica. Os voltamogramas são apresentados na Figura 30.



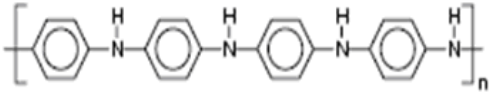
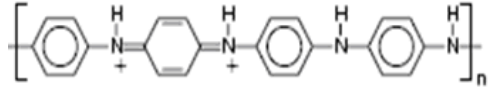
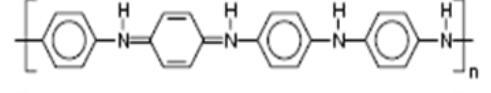
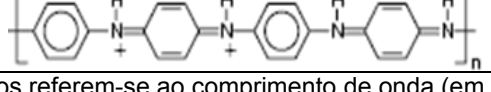
**Figura 30.** Voltamogramas cíclicos de caracterização do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni a  $25 \text{ mV s}^{-1}$ . Eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Observa-se na Figura 30, a presença de dois processos redox durante a variação do potencial, isso ocorre devido a PANi possuir diferentes estados de

oxidação onde picos I-II ocorrem durante o processo anódico (oxidação) e os picos III-IV ocorrem durante o processo catódico (redução).

Então, o pico I pode ser atribuído à interconversão da PAni leucoesmeraldina (estado completamente reduzido) para sal esmeraldina (estado parcialmente oxidado). O pico II, por sua vez, é atribuído ao processo de interconversão do sal esmeraldina para pernigranilina (estado completamente oxidado). O pico III é característico da interconversão de pernigranilina para base esmeraldina (estado parcialmente oxidado) e por fim, o pico IV é referente ao processo de interconversão da base esmeraldina em leucoesmeraldina. A Tabela 8 apresenta os estados de oxidação mais importantes da PAni. Diante dos resultados, a PAni se mantém estável sobre a MNTs e por outro lado, as MNTs também permaneceram estáveis à superfície do ouro, considerando que o pH do meio para esta análise era por volta de 2. Assim, o eletrodo denominado Au/MCPMNTs-FF/PAni será utilizado para imobilizar a enzima urease.

**Tabela 8.** Estados de oxidações mais importantes da polianilina e suas respectivas estruturas [96].

Estado de oxidação	Estrutura	Cor*	Característica
Leucoesmeraldina		Amarela 310	Isolante completamente reduzida
Sal de esmeraldina		Verde 320, 420, 800	Condutora parcialmente oxidada
Base esmeraldina		Azul 320, 620	Isolante parcialmente oxidada
Pernigranilina		Púrpura 320, 530	Isolante completamente oxidada

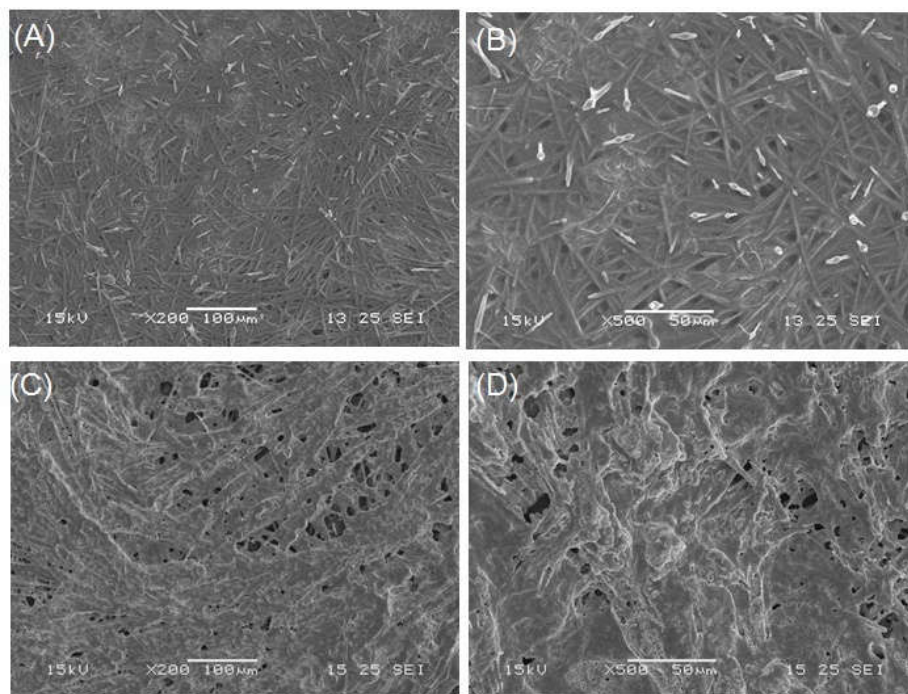
\* Os valores numéricos referem-se ao comprimento de onda (em nanômetros) onde a absorção é máxima

### **4.3.2 Imobilização da Enzima urease sobre o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni**

#### **4.3.2.1 Caracterização morfológica e eletroquímica**

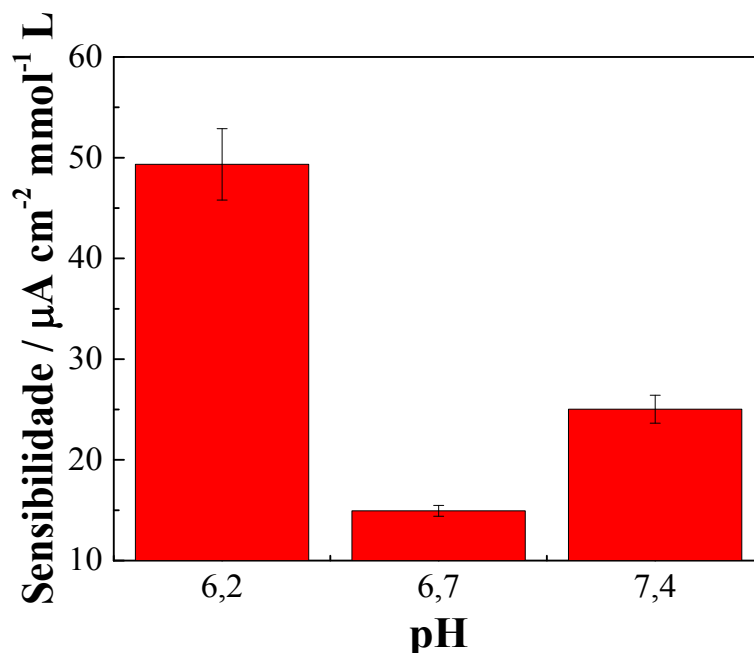
Os biossensores podem ser classificados pela natureza do mediador e quanto ao método de imobilização. A etapa fundamental na fabricação de biossensores para aumentar a seletividade e sensibilidade é a seleção do elemento de bio-reconhecimento, na presença de um composto intermediário (mediador). O mediador deve integrar em conjunto com o elemento de bio-reconhecimento e o eletrodo, a fim de evitar a contaminação da amostra por um mediador artificial.

As enzimas são catalisadores biológicos muito usados em biossensores e polímeros condutores como a polianilina e pode ser usada como mediador redox em biossensores [97]. Dessa maneira, a urease foi selecionada como a enzima de reconhecimento de ureia e a PAni foi usada como mediador. Para promover a imobilização da enzima no eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni utilizou uma solução de glutaraldeído. Assim, a enzima pode se ligar covalentemente com glutaraldeído e também à superfície exposta da PAni. As Figuras 31(A e B) mostram que o glutaraldeído está recobrindo a superfície do eletrodo, além disso, é possível observar as MNTs-FF dispostas sobre o eletrodo de ouro, mas quando foi recoberto com a enzima (Figuras 31(C e D)), observa-se uma diminuição da área exposta das MNTs-FF indicando a imobilização da enzima à superfície do eletrodo.



**Figura 31.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A e B) eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni recoberto com glutaraldeído. (C e D) eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/G recoberto com enzima urease.

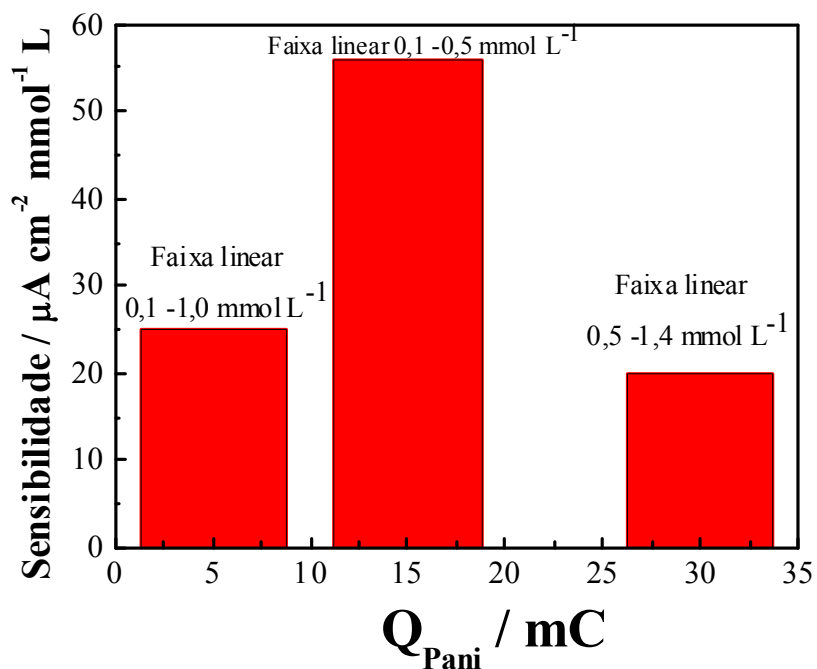
Continuando a caracterização, estudamos a atividade eletrocatalítica do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urs mediante adições de concentrações de ureia em diferentes pH: 6,2, 6,7 e 7,4, neste caso, foi mantida constante a carga anódica de deposição da PAni, Figura 32. A dopagem da PAni no estado esmeraldina é feita por protonação em solução ácida, promovendo um aumento da condutividade de cerca de 10 ordens de grandeza em relação a PAni não dopada sem que aconteça alteração do número de elétrons (oxidação/redução) associados à cadeia polimérica [93-95]. No entanto, o pH ótimo da enzima urease é 7.0, então, o estudo do pH é de extrema importância para verificar a melhor resposta mediante a oxidação do analito de interesse.



**Figura 32.** Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urease. Sensibilidade de resposta obtida para a oxidação da ureia em solução tampão  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  referente à variação de pH. Medidas obtidas em potencial de amplitude = 70 mV, frequência = 50 Hz e  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$ .

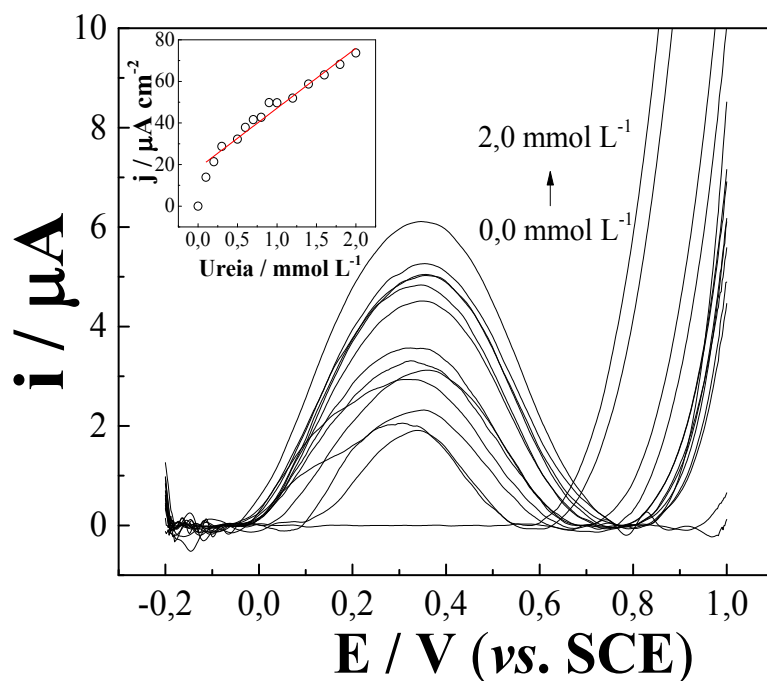
Na Figura 32, observa-se que o maior valor de sensibilidade estimado foi de  $49,33 \mu\text{A mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  em pH 6,2, indicando que a PAni pode estar no seu estado mais condutor e, mesmo com o pH ótimo da enzima ser 7,0 ela ainda manteve sua resposta. Visando ainda a otimização dos parâmetros, estudou-se a influência da carga da PAni na resposta eletrocatalítica. A Figura 33 apresenta os valores de sensibilidade de resposta da oxidação da ureia em função da variação da carga anódica de deposição da PAni. O maior valor de sensibilidade foi de  $56,0 \mu\text{A mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ , obtido para a carga anódica de deposição de 15 mC, porém, a faixa linear de resposta da concentração de ureia foi de  $0,1\text{-}0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , valor esse inferior quando comparado com a faixa de resposta para os eletrodos contendo 5 e 30 mC de deposição de PAni, que foram  $0,1\text{-}1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $0,5\text{-}1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Diante dos resultados apresentados, ficou estabelecido para os

demais estudos que a carga anódica de deposição da PANi escolhida foi a de 5 mC e o pH da solução tampão fosfato 6,2.



**Figura 33.** Eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urs. Efeito da carga de PANi sobre a para a oxidação da ureia em solução tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Medidas obtidas em potencial de amplitude = 70 mV, frequência = 50 Hz e  $\Delta E_s = 2$  mV.

A Figura 34 apresenta o voltamograma do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/PAni/Urs com os parâmetros estabelecidos acima. Para esse sistema, o valor da sensibilidade de resposta foi de  $\sim 30,0 \mu\text{A mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  e limite de detecção 0,17 mmol L<sup>-1</sup>.



**Figura 34.** Voltamograma de onda quadrada. O detalhe da figura corresponde ao efeito da concentração de ureia na corrente de pico anódica. Frequência 50 Hz, Amplitude de pulso 70 mV e  $\Delta E_s$  2 mV. Eletrólito solução tampão 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 6,2.

A tabela 9 apresenta uma prévia comparação entre eletrodos descritos na literatura contendo PANi.

**Tabela 9.** Comparação com outros biossensores de ureia descrito na literatura.

Bioeletrodo	Sensibilidade ( $\mu\text{A mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ )	Faixa linear ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Limite de detecção ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	Ref.
Au/Nafion-PANI-Urs	4,2	1-10	1	[88]
ITO/PAni/PVA-AgNP/Urs	2,5	Acima de 5,0	Não especificado	[98]
Grafite/PAni/NTc	12,5	$10^{-2} - 10^{-5}$	0,22-0,58	[97]
Au/MCP/MNTs- FF/PAni/Urs	30,0	0,1-1,5	0,17	Esse trabalho

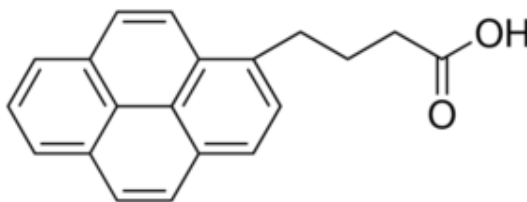
Embora os resultados tenham sido satisfatórios, encontramos muitas dificuldades na reprodução dos eletrodos, principalmente no que diz respeito à



imobilização da enzima. Dessa forma, estudamos outra maneira de imobilizar a urease sobre o eletrodo, A seguir, serão apresentados os resultados referente a funcionalização das MNTs-FF com um fluoróforo a fim de ajudar na imobilização da enzima.

#### 4.4. Funcionalização da MNTs-FF com Ácido 1-Pireno Butírico (Py)

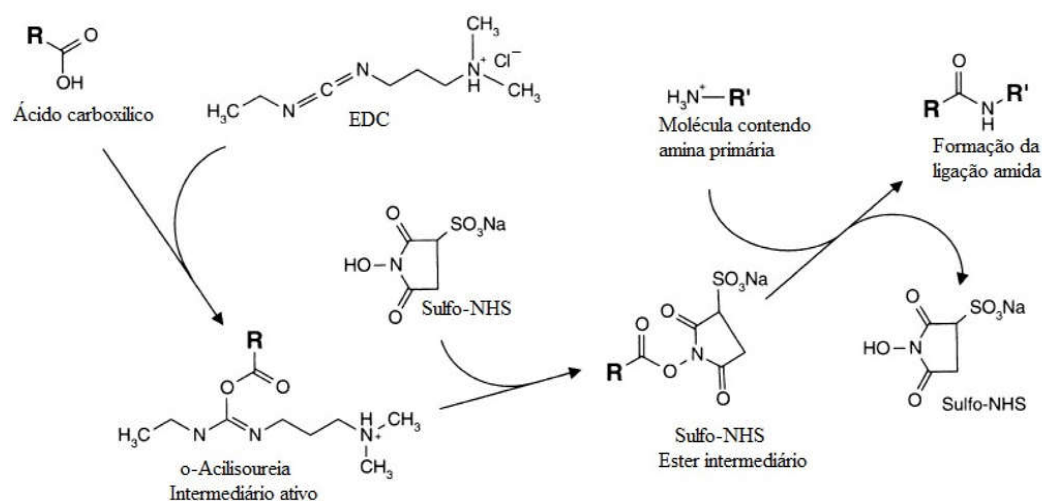
Um estudo desenvolvido pelo grupo pôde verificar a interação do ácido 1-pireno carboxílico com os nanotubos de *L*-difenilalanina (preparado *via* fase líquida) obtendo um recobrimento homogêneo e sem significativas alterações estruturais e morfológicas das nanoestruturas [70]. Com o intuito de aplicar este mesmo sistema para o ancoramento da enzima urease, estudamos a funcionalização do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF obtido em vapor de anilina com o ácido 1-pireno butírico (Py). O Py é uma molécula fotoluminescente muito utilizada como sonda fluorescente [99], sua estrutura é formada por uma parte hidrofóbica contendo quatro anéis aromáticos chamados de pirenilo e uma parte hidrofílica formada pelo grupo carboxílico, a Figura 35 mostra sua estrutura molecular.



**Figura 35.** Estrutura molecular do ácido 1-pireno butírico (Py) [99].

A funcionalização da MNTs-FF com Py se dá pela interação do grupo aromático da MNTs-FF com a parte hidrofóbica do grupo aromático pirenilo via interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking* [70]. O grupo funcional carboxílico da superfície modificada MNTs-FF/Py foi usado para o acoplamento covalente de grupos aminos complementares da enzima urease. Neste caso, os resíduos do ácido carboxílico foram tratados com uma monocamada de éster ativo usando os reagentes EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-hidroxissulfosuccinimida ou sulfo-NHS) entre o eletrodo funcionalizado e a enzima [100].

A carbodiimida e o NHS são os reagentes de bioconjugação mais utilizados para mediar a formação da ligação amida entre o ácido carboxílico e amina. A Figura 36 mostra o mecanismo de ação do EDC/NHS na formação da ligação amida, basicamente, o EDC/NHS reage com o ácido carboxílico da superfície modificada do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py formando dois intermediários, o-acilisourea e o éster sulfo-NHS. Assim, uma ligação amida é formada entre o eletrodo funcionalizado com o Py e a enzima urease [101].



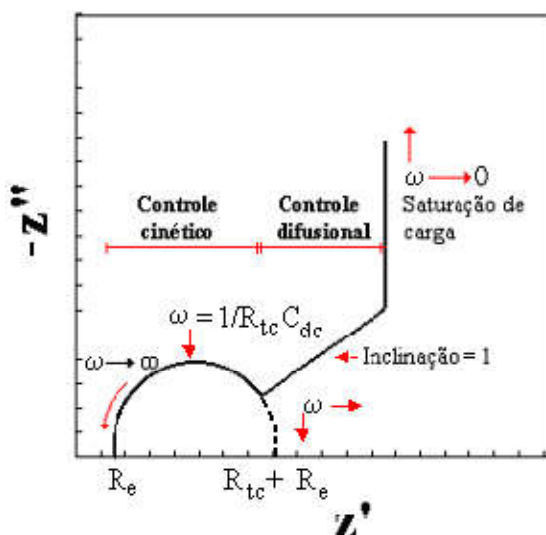
**Figura 36.** Mecanismo de ação do EDC-NHS na formação da ligação amida [101]

#### 4.4.1. Caracterização Eletroquímica

O processo de montagem do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py foi monitorado por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). A EIE permite caracterizar as propriedades elétricas dos materiais, junto as suas interfaces com os eletrodos. Os valores de impedância são normalmente apresentados através do diagrama de Nyquist, onde se pode observar os valores da parte imaginária da impedância ( $Z''$ ) em função da parte real ( $Z'$ ). Se os experimentos são feitos em uma ampla faixa de frequência, é possível a separação de diferentes eventos ocorridos no sistema, distinguindo-se os processos controlados pela cinética das reações redox na região de altas frequências, e os processos controlados pelo transporte de massa, visualizados na região de baixas frequências [102]. A Figura 37 ilustra o Diagrama de Nyquist destacando-se as seguintes regiões:

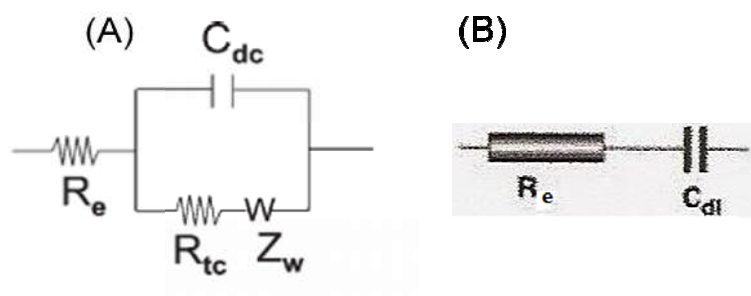
- Limites de altas-médias frequências (kHz): a resposta está associada a processos que ocorrem na interface eletrodo/eletrólito. O efeito de relaxação de transferência de carga é mostrado no diagrama como um semicírculo centrado sobre o eixo  $Z'$ , sua primeira intersecção representa a resistência do eletrólito ( $R_e$ ) e a segunda intersecção é a resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ).
- Limites de baixas frequências (Hz): a resposta é uma linha reta com inclinação de  $45^\circ$  em relação ao eixo real, sendo denominada impedância de Warburg, que é controlada por uma difusão linear semi-infinita.  $C_{dc}$  é a capacidade da dupla elétrica.
- Limites mHz: a difusão é limitada em favor do acúmulo de carga e a impedância se aproxima de uma resposta puramente capacitiva, que é

chamada capacitância limite ( $C_l$ ), que ocorre através da saturação de carga do filme [103].



**Figura 37.** Diagrama de Nyquist indicando a região de transferência de carga, difusão semi-infinita e a saturação de carga [103].

As transformações eletroquímicas que acontecem na interface podem ser modeladas utilizando circuitos eletrônicos equivalentes que correspondam com o espectro de impedância experimental. Um circuito equivalente muito usado para modelar fenômenos interfaciais é o circuito de Randles [104] e inclui a resistência do eletrólito,  $R_e$ , a capacidade de dupla camada elétrica,  $C_{dl}$ , a resistência de transferência de carga,  $R_{tc}$  e os processos difusionais,  $Z_W$ , denominado impedância de Warburg. O circuito equivalente de Randles é esquematizado na Figura 38(A).

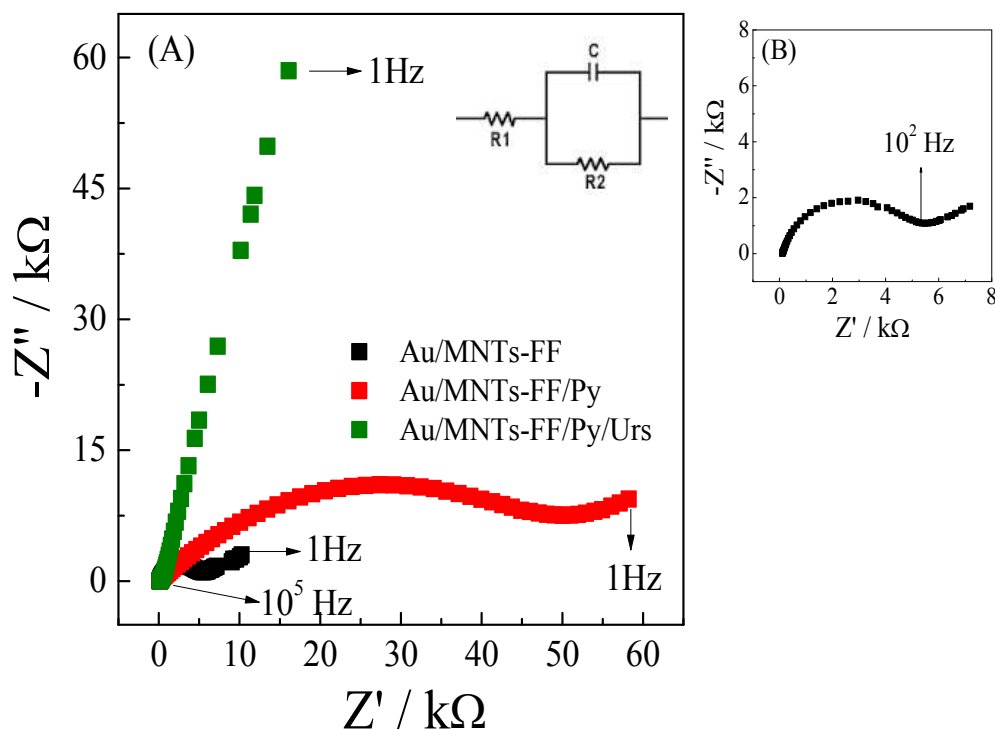


**Figura 38.** (A) Circuito equivalente (modelo de Randles) para medidas de espectroscopia de impedância em uma célula eletroquímica. (B) Circuito equivalente para processos não faradaicos [62].

A Figura 39(A) mostra as características de impedância dos eletrodos na presença equimolar de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em diferentes etapas do processo de funcionalização. Para obter informações mais detalhadas sobre as propriedades elétricas interfaciais entre os eletrodos e o eletrólito, o circuito de Randles (Figura 38(A)) foi escolhido para ajustar os dados de impedância obtidos. No circuito de Randles, presume-se que a resistência de transferência de carga ( $R_{tc}$ ), descrito como  $R_2$ , é paralela à capacitância interfacial ( $C$ ), dando origem a um semicírculo no plano complexo de ( $Z''$ ) parte imaginária da impedância, contra ( $Z'$ ) parte real da impedância. Notamos que neste circuito, a impedância relacionada aos processos difusionais podem ser negligenciados. Observa-se ainda que a  $R_{tc}$  para o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF foi estimada como sendo  $\approx 6 \text{ k}\Omega$  e aumentado para  $\approx 60 \text{ k}\Omega$  quando o eletrodo foi modificado com o Py. Os grupos carboxilatos do Py produzem cargas negativas na superfície do eletrodo modificado, diminuindo a transferência de carga das moléculas  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ .

Verifica-se também que a capacitância aumenta por um fator de quase 3 para o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs, obtido após ativação do Py com EDC/NHS e posterior acoplamento da enzima urease. O acoplamento da enzima na superfície do eletrodo produziu uma camada isolante sobre a superfície, atuando como uma

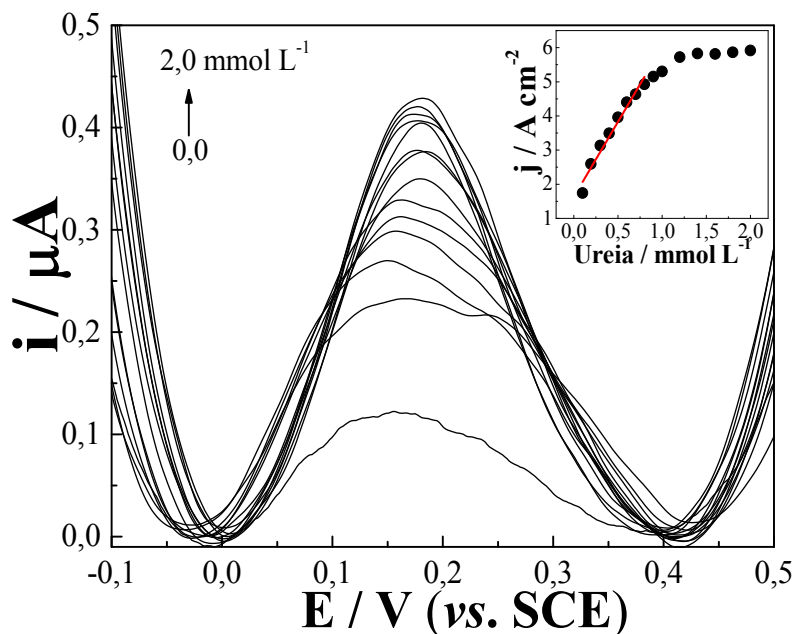
barreira para transferência de elétrons interfacial, o que refletiu para o aumento da  $R_{tc}$  acima de 200 k $\Omega$ . Os resultados demonstram que o Py e posteriormente, a proteína Urs foram imobilizadas sobre a superfície do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF.



**Figura 39.** Espectroscopia de impedância eletroquímica para os diferentes eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF (—), Au/MCP/MNTs-FF/Py (—), Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs (—); No detalhe: Circuito elétrico de Randles. (B) Ampliação referente às regiões de altas frequências para o eletrodo sem funcionalização com Py. Tensão de corrente alternada: 5 mV de amplitude. Intervalo de frequência: 1 Hz a 10<sup>5</sup> Hz. Eletrólito: solução contendo 5,0 mmol L<sup>-1</sup> de [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-/4-</sup> e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl.

A análise referente ao desempenho do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs foi realizada mediante a adições de diferentes concentrações de ureia em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2), utilizando a voltametria de onda quadrada (SWV), como mostra a Figura 40. Observa-se que em concentrações acima de 0,9 mmol L<sup>-1</sup> ocorre uma saturação da corrente na SWV, fenômeno geralmente atribuído à saturação dos

sítios catalíticos da enzima, dessa maneira, uma relação linear de resposta foi obtida na faixa de concentração entre 0,1-0,8 mmol L<sup>-1</sup>.



**Figura 40.** SWV do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2), contendo diferentes concentrações de ureia. Frequência 50 Hz, Amplitude 70 mV e  $\Delta E_s$  2 mV. No detalhe: Densidade de corrente *versus* concentração de ureia.

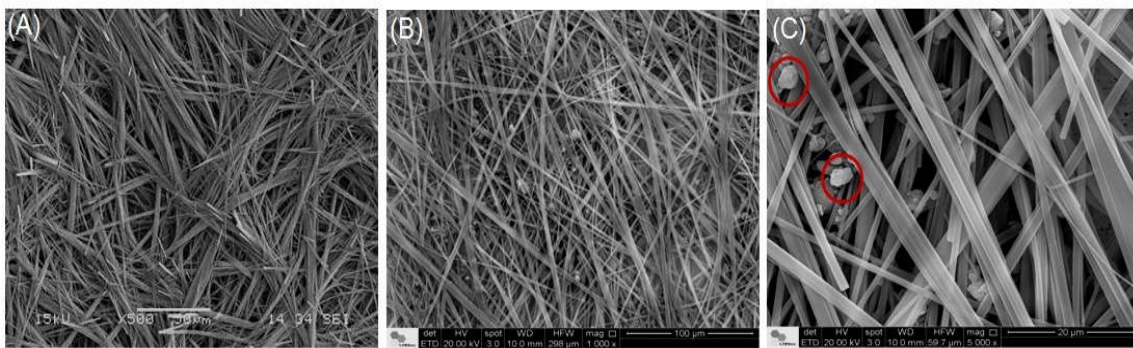
A sensibilidade foi estimada como sendo 4,57  $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$ , enquanto que o limite de detecção foi 0,15 mmol L<sup>-1</sup>. O limite de detecção do nosso eletrodo foi menor e aproximadamente na mesma ordem de grandeza que os valores obtidos na literatura para outros eletrodos modificados com urease (Tabelas 7 e 9).

#### 4.5. Influência dos Nanotubos de Carbono na nucleação e crescimento das MNTs-FF.

Estudamos a influência dos nanotubos de carbono (NTc), no processo de nucleação e crescimento das MNTs-FF em fase sólida-vapor, visando melhorar a sua característica de isolante elétrico. Os NTc apresentam excelentes propriedades mecânicas, devido sua alta flexibilidade, resistência térmica [14, 15], além das propriedades elétricas, já que os elétrons do NTc só podem propagar ao longo do eixo, fazendo com que o transporte eletrônico ocorra balisticamente (sem dissipação de calor). Tal comportamento permite que elevadas correntes sejam transportadas [105].

##### 4.5.1. Caracterização Morfológica

Imagens de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para os eletrodos modificados com as MNTs-FF na ausência e na presença de NTc e são apresentadas na Figura 41.



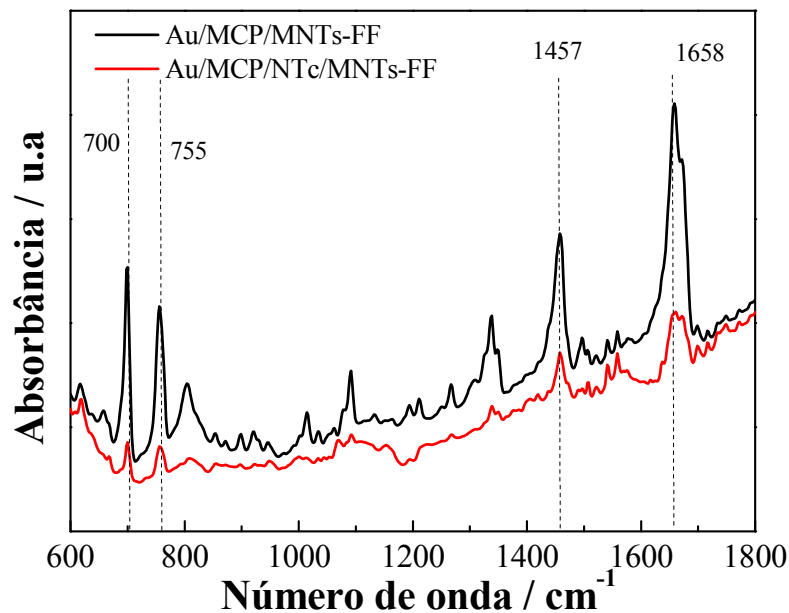
**Figura 41.** Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) dos eletrodos obtidos na AUSÊNCIA dos NTc (A) e na PRESENÇA dos NTc (B,C), denominados Au/MCP/NTc/MNTs-FF.



A Figura 41(A) corresponde ao eletrodo modificado com as MNTs-FF na ausência de NTc. Nesse caso, observa-se que as MNTs-FF estão bem distribuídas por toda a superfície do eletrodo. O mesmo acontece para os eletrodos contendo o NTc, Figura 41(B), indicando que o NTc não interfere na morfologia da MNTs-FF. Porém, nota-se a formação de pequenos aglomerados, que podem estar relacionados com a não-dispersão de alguns nanotubos de carbono, como mostrado na Figura 41(C).

#### 4.5.2. Caracterização Estrutural

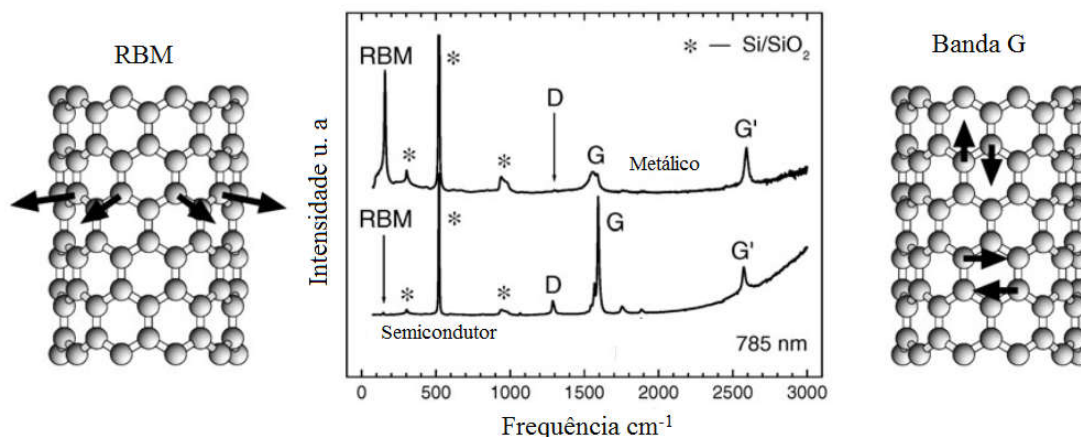
Medidas de FTIR foram realizadas para verificar possíveis mudanças estruturais ou interações no material híbrido formado NTc/MNTs-FF (Figura 42). A análise espectral para o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF mostra uma banda em  $1658\text{ cm}^{-1}$  correspondente a região da banda amida I, atribuída à conformação  $\beta$ -sheet da ligação amida [26, 36]. Observa-se também uma banda em  $1457\text{ cm}^{-1}$  característica do estiramento C=C presente em anéis aromáticos [73]. As bandas em  $755\text{ cm}^{-1}$  e  $700\text{ cm}^{-1}$  são relacionadas aos estiramentos assimétricos do anel aromático substituído [26]. Para o eletrodo modificado Au/MCP/NTc/MNTs-FF observa-se variações nas intensidades relativas atribuídas às bandas  $1457\text{ cm}^{-1}$  e  $1658\text{ cm}^{-1}$ , indicando possivelmente à formação de um material nanocompósito.



**Figura 42.** Espectros vibracionais obtidos na ausência Au/MCP/MNTs-FF (—) e na presença Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—) dos NTc, respectivamente

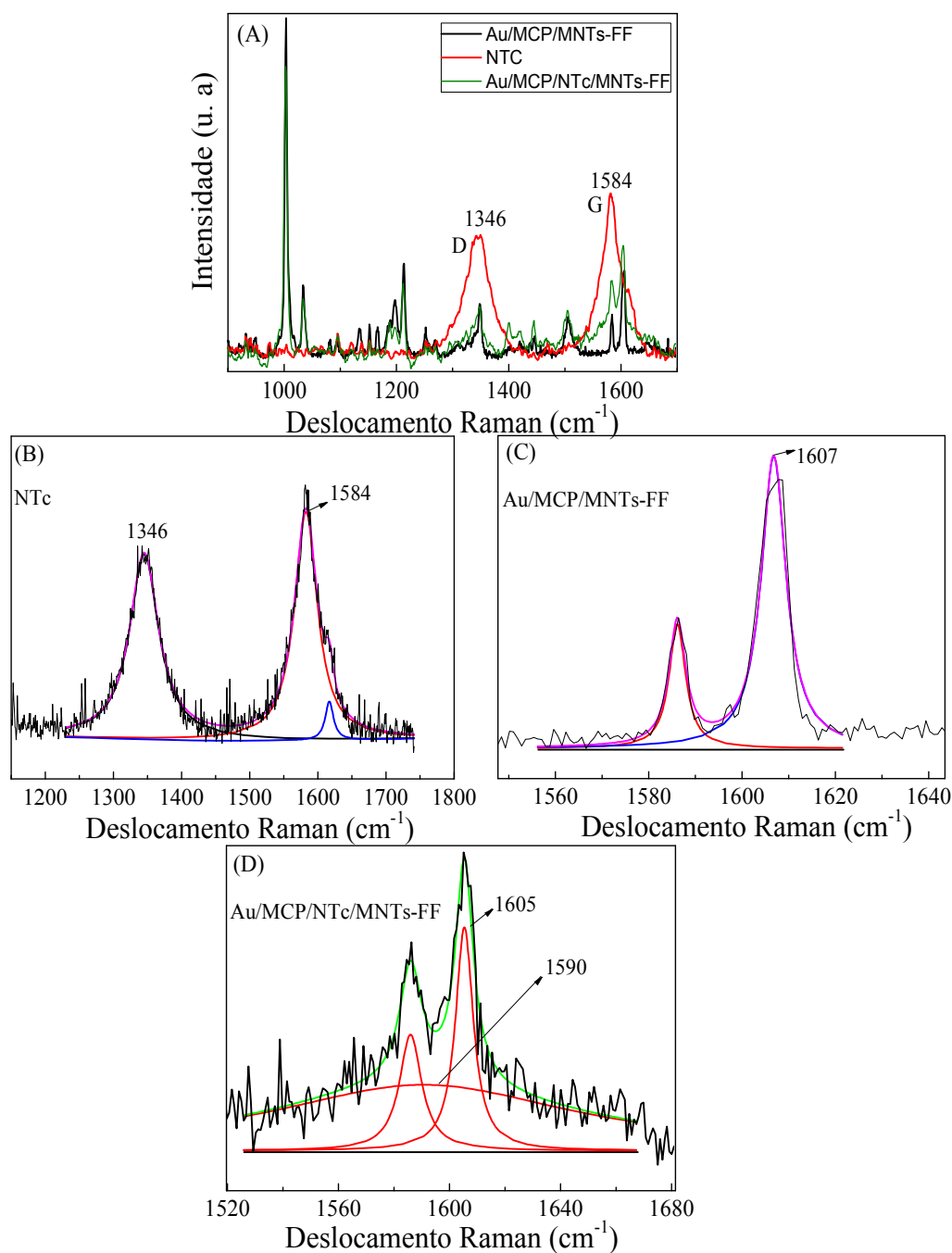
No sentido de melhorar a caracterização do material obtido, foram coletados espectros de Raman. O Raman é uma das técnicas mais utilizadas no estudo de NTc e que permitiu um grande avanço no entendimento das propriedades eletrônicas. As principais características do espectro Raman dos nanotubos de carbono são: modo de respiração radial (“*radial breathing modes*, RBM”), observado em baixos números de onda, entre 100 e 300  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 43), nos quais todos os átomos vibram em fase na direção radial do nanotubo, cuja frequência RBM está relacionada com o diâmetro do nanotubo por  $\text{RBM} = \alpha / d$ , sendo  $\alpha$  uma constante de proporcionalidade, determinada experimentalmente e  $d$  o diâmetro de um nanotubo de carbono de parede simples isolado [106]; Os modos tangenciais de estiramento em  $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$  formam a banda D atribuída à presença de estruturas desordenadas, a qual pode ser originada pela presença de um defeito ou de uma ligação com alguma molécula [107] e a banda G entre 1400 e 1650  $\text{cm}^{-1}$ , que

fornece informações sobre o caráter metálico ou semicondutor dos nanotubos, como mostra a Figura 43 [106].



**Figura 43.** Espectro Raman deNTC de parede simples metálico e semicondutor usando um laser de excitação 785 nm, mostrando o modo de respiração radial e banda G [106].

O deslocamento em número de onda da banda G e a intensidade da banda D fornecem informações importantes sobre as mudanças na estrutura eletrônica do material, quando interagem com espécies químicas. As frequências desses modos são também bastante sensíveis ao processo de transferência de carga entre os nanotubos e espécies químicas ligadas aos nanotubos ou intercaladas entre os tubos [107]. A Figura 44 apresenta os espectros Raman registrados para o nanocompósito e de seus constituintes.



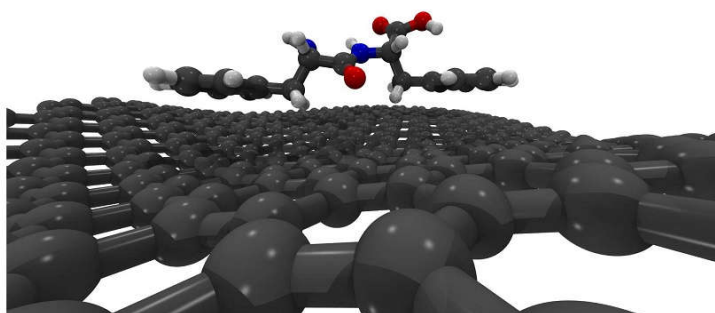
**Figura 44.** Espectros Raman (A) Au/MCP/MNTs-FF (—), NTC (—) e Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—). Espectros deconvoluídos (B-D), utilizando funções de Lorentz no software Origin 9.0®.

Na Figura 44(A e B) observam-se os espectros Raman dos nanotubos de carbono com suas bandas características. A banda G, que aparece em  $1584 \text{ cm}^{-1}$ , se apresenta assimétrica e larga [107]. A banda em  $1346 \text{ cm}^{-1}$ , denominada banda

D, é decorrente de possíveis defeitos estruturais devido à funcionalização, que visou à introdução de grupos hidrofílicos à superfície dos nanotubos de carbono [108]. Os espectros obtidos foram deconvoluídos utilizando funções de Lorentz no software Origin 9.0® de modo a observar mudanças sutis no comportamento dos materiais.

O espectro Raman do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF (Figura 44(A e C)) apresenta um conjunto de vibrações relacionado aos estiramentos e vibrações dos anéis aromáticos da FF, sendo o mais intenso em  $1002\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação do anel aromático no plano, porém, não se observou variações significativas nessa banda, provavelmente devido a maior concentração de peptídeo.

Variações são mais perceptíveis para a região centrada em  $1600\text{ cm}^{-1}$ , essa região é referente aos estiramentos das ligações C-H do anel aromático[109]. A Figura 44(A e D) apresenta o espectro Raman para o nanocompósito e observa-se que houve um deslocamento Raman tanto para a banda característica da FF como da Banda G do NTc. Observa-se inicialmente para o material sem o NTc que as vibrações são localizadas em  $1584$  e  $1607\text{ cm}^{-1}$ , com a presença dos nanotubos de carbono o pico em  $1584\text{ cm}^{-1}$  permanece na mesma posição, porém o segundo pico se desloca para  $1605\text{ cm}^{-1}$ , ao mesmo tempo observa-se que a banda G dos NTc se desloca de  $1584$  para  $1590\text{ cm}^{-1}$ , mostrando interação entre os anéis aromáticos das moléculas de FF e os nanotubos de carbono *via* interação do tipo  $\pi$ - $\pi$  *stacking*. A Figura 45 representa o modo de interação da molécula de FF na estrutura de uma folha de grafeno [15].

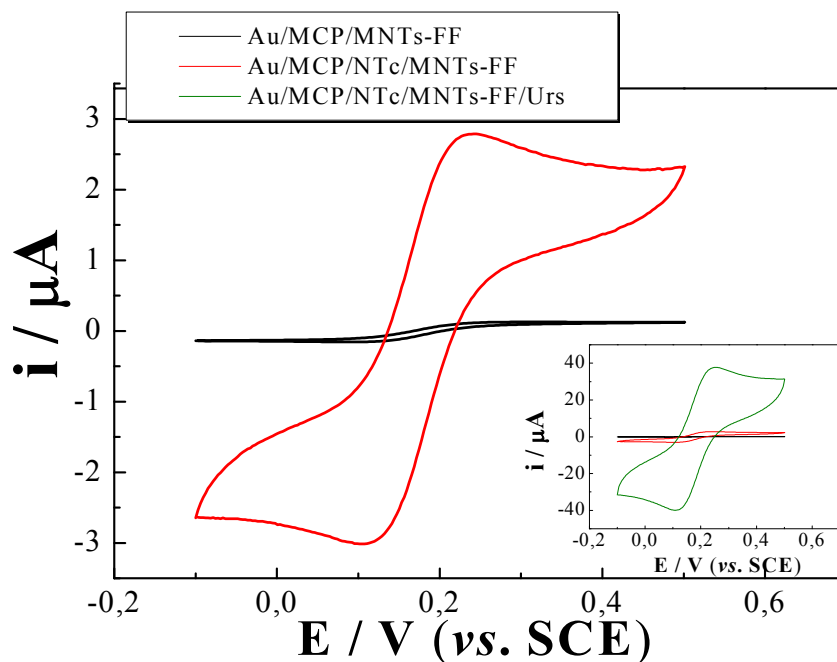


**Figura 45.** Molécula de FF adsorvida na estrutura do grafeno pristino [110].

#### 4.5.3. Caracterização Eletroquímica

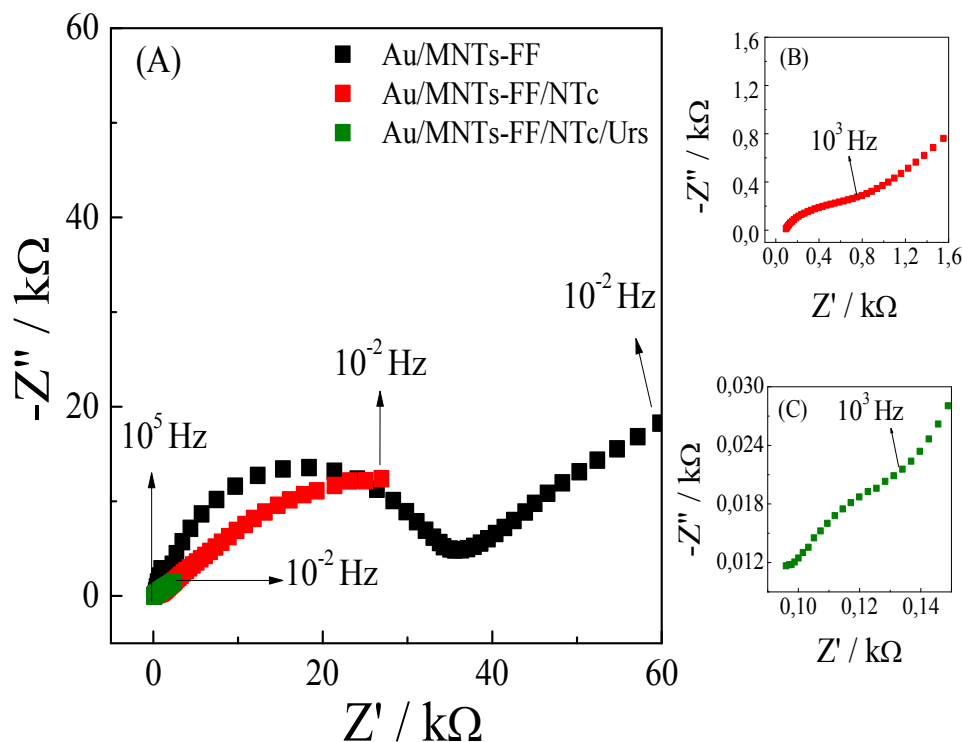
Sobre o nanocompósito (Au/MCP/NTc/MNTs-FF) imobilizou-se a enzima urease, utilizando uma solução EDC/NHS para ativação dos ácidos carboxílicos das MNTs-FF, então, a eletroatividade do eletrodo foi verificado por voltametria cíclica.

A Figura 46 mostra o comportamento dos eletrodos na presença de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e observa-se um par redox em torno de +0,24 V e -0,10 V (vs. ECS), que são atribuídos à oxidação e redução, respectivamente, dos íons  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  em solução. Também se verifica um incremento significativo na corrente para o eletrodo que contém o NTc, facilitando a transferência eletrônica em relação ao eletrodo na ausência de NTc. No entanto, o eletrodo contendo a enzima na superfície Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs, apresentou maior resposta de corrente em relação aos outros dois eletrodos, cujo comportamento não é esperado para esse tipo de funcionalização com a enzima[111].



**Figura 46.** Voltamogramas cíclicos obtidos para os diferentes eletrodos: Au/MCP/MNTs-FF (—), Au/MCP/NTc/MNTs-FF (—) e Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs (—). No detalhe: Comparação entre todos os eletrodos. Eletrólito contendo  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Para avaliar o comportamento quanto a resistência à transferência de carga, os diferentes eletrodos foram caracterizados por espectroscopia de impedância eletroquímica aplicando uma tensão de corrente alternada de 5 mV e intervalo de frequência de  $10^{-2} \text{ Hz}$  a  $10^5 \text{ Hz}$ . A Figura 47 apresenta o diagrama para todos os eletrodos. O eletrodo Au/MCP/MNTs-FF apresentou maior valor de impedância, contudo, um caráter mais capacitivo é observado para o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF, devido ao acúmulo de carga na interface eletrodo/eletrólito. O menor valor de impedância observa-se para o eletrodo que contém a enzima.



**Figura 47.** Diagrama de Nyquist para os eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF (–), (B) Au/MCP/NTc/MNTs-FF (–), (C) Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs (–). Tensão de corrente alternada: 5 mV de amplitude. Intervalo de frequência:  $10^{-2}$  Hz a  $10^5$  Hz. Eletrólito contendo  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  e  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.

Os valores aproximados referentes a resistência à transferência de carga para todos os eletrodos são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Resistência à transferência de carga calculada a partir do Diagrama de Nyquist para os diferentes eletrodos.

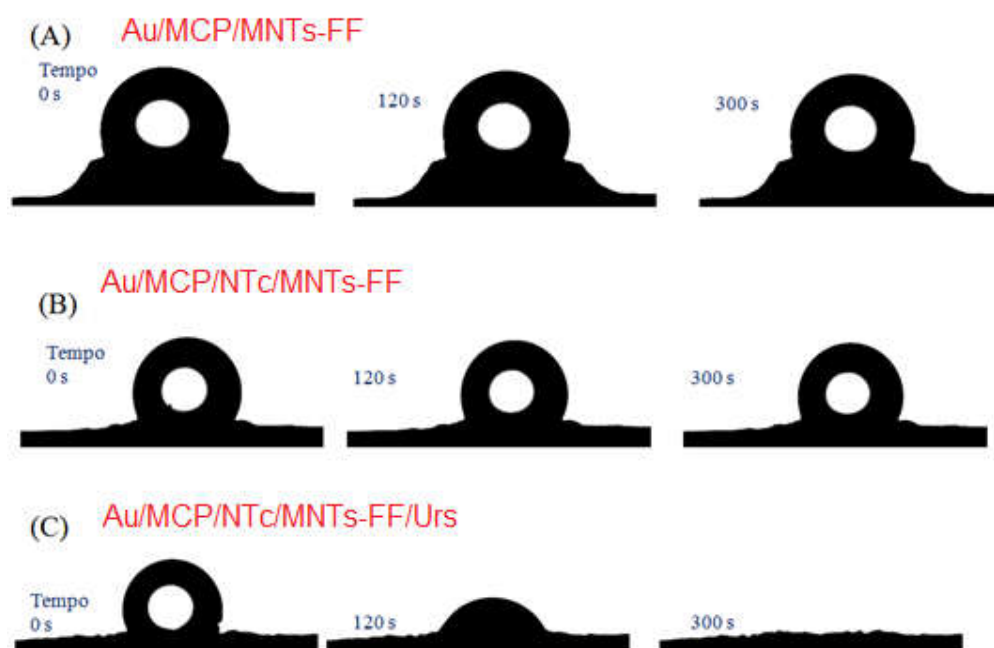
Eletrodo	Resistência a Transferência de Carga ( $R_{tc}$ kΩ)
Au/MNTs-FF	~ 35,0
Au/MNTs-FF/NTc	~ 0,80
Au/MNTs-FF/NTc/Urs	~ 0,14

Comparando os valores, verifica-se que houve uma diminuição na resistência à transferência de carga para os eletrodos contendo NTc. Porém, quando o eletrodo



foi modificado com a urease, essa mudança foi mais significativa. Para entendermos a contribuição da enzima, caracterizamos a superfície dos eletrodos modificados pela técnica de medidas de ângulo de contato, na ausência e presença dos NTc, e posteriormente com a enzima imobilizada no nanocompósito.

O ângulo de interesse foi analisado mediante ao plano horizontal da membrana e pela tangente ao perfil da gota de água na zona de contato. A Figura 48 mostra as fotografias de ângulo de contato para os três eletrodos com os diferentes recobrimentos, além da estabilização da gota em relação ao tempo.



**Figura 48.** Medidas de ângulo de contato para os eletrodos: (A) Au/MCP/MNTs-FF, (B) Au/MCP/NTc/MNTs-FF, (C) Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs.

Os valores dos ângulos de contato são apresentados na Tabela 11.

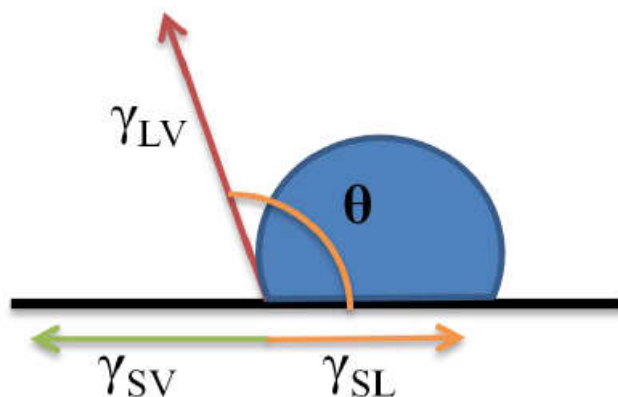
**Tabela 11.** Valores de ângulo de contato para os três eletrodos modificados.

Recobrimento do Eletrodo	Tempo de exposição (segundos)					
	0		120		300	
	Ângulo de Contato (graus)	Cos $\theta$	Ângulo de Contato (graus)	Cos $\theta$	Ângulo de Contato (graus)	Cos $\theta$
Au/MCP/MNTS-FF	112±0,6	- 0,37	111±0,7	- 0,36	109±0,4	- 0,32
Au/MCP/NTc/MNTs-FF	115±0,5	- 0,42	113±0,6	- 0,39	112±0,2	- 0,37
Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs	91±4,0	-0,017	49±3,0	0,65	0	1

Observa-se uma pequena diferença nos valores de ângulo de contato para os eletrodos na ausência e na presença de NTc. Porém, quando se tem a enzima imobilizada na superfície, é notável o decréscimo no valor do ângulo de contato indicando que a presença da enzima aumenta significativamente a hidrofilicidade da superfície.

As medidas de ângulo de contato fornecem ideia sobre as forças intermoleculares que atuam na superfície de um material, e a energia livre de interação de um solvente com a superfície. A energia livre da superfície é um balanço de energia livre entre as componentes de interação do líquido com o ar ( $\gamma_{LV}$ ), a interação da superfície com o líquido ( $\gamma_{SL}$ ) e a interação da superfície com o ar ( $\gamma_{SV}$ ), e essas componentes se relacionam com o cosseno do ângulo de contato ( $\theta$ ), um esquema desse balanço de forças é mostrado na Figura 49 e a equação 6 relaciona todas essas componentes.

$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SV} - \gamma_{SL}}{\gamma_{LV}} \quad \text{Eq. 6}$$



**Figura 49.** Ilustração esquemática de uma gota em contato com uma superfície sólida, mostrando a relação entre os parâmetros energéticos[112].

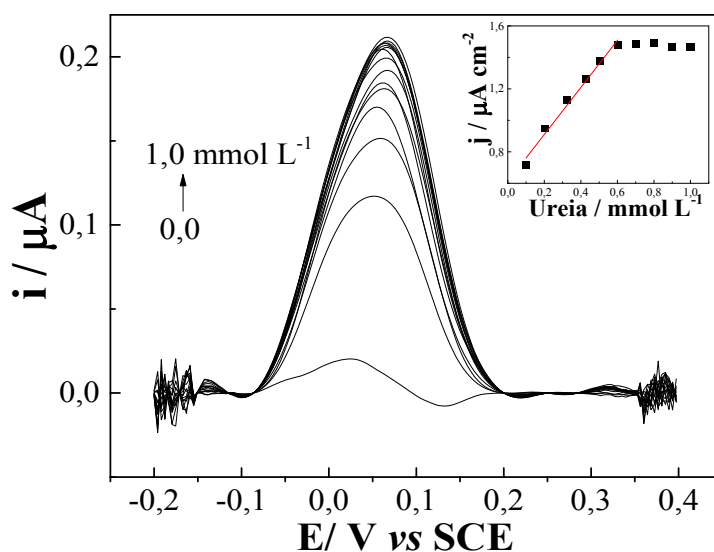
O espalhamento da gota pela superfície e a consequente diminuição do ângulo de contato acarretam em mudança da área de interação. Com o espalhamento, a interação superfície-ar diminui o que é energeticamente favorável, a interação do líquido-ar aumenta o que é desfavorável e, por fim, a interação superfície-líquido é a que faz o balanço energético do sistema [113].

Após 300 segundos de estabilização da gota, os eletrodos Au/MCP/MNTs-FF e Au/MCP/NTc/MNTs-FF apresentaram ângulo de contato  $109^\circ$  e  $112^\circ$ , respectivamente, gerando valores de cosseno negativos e, como consequência, a interação entre a superfície e o líquido tem uma energia livre com valor positivo, fazendo a interação não ser espontânea, formando uma gota na superfície. No entanto, a gota foi totalmente absorvida no eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs, gerando valor de cosseno igual a 1 e, dessa forma, a interação entre a superfície e o líquido tem energia livre com valor negativo, tornando a absorção da gota um fator energeticamente favorável e espontâneo.

A mudança de uma superfície hidrofóbica para hidrofílica está relacionada com a presença da enzima urease. Estima-se que os grupos hidrofílicos da enzima

estão localizados no exterior e assim, interagem com a gota de água, enquanto que os grupos hidrofóbicos podem estar interagindo com os nanotubos de carbono e também com os anéis aromáticos da FF. Essa configuração permite melhor molhabilidade da superfície, contribuindo com a diminuição da resistência à transferência de carga.

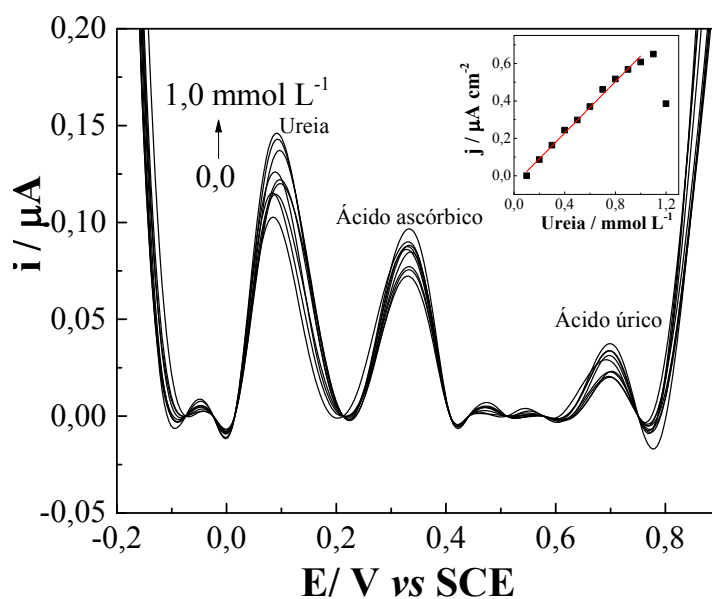
A análise referente ao desempenho do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs foi realizada mediante a adições de diferentes concentrações de ureia em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2), utilizando a voltametria de pulso diferencial (VPD), como mostra a Figura 50. O valor de sensibilidade e limite de detecção foram estimados como 1,50  $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$  e 0,10 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores determinados são compatíveis aos bioeletrodos descritos na literatura, como mostram as Tabelas 7 e 9.



**Figura 50.** VPD do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs, frente à detecção de ureia em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2). Amplitude de pulso 25 mV, velocidade de varredura 10 mV s<sup>-1</sup>

Para verificar a seletividade do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs foram realizados testes de detecção simultânea de ureia na presença do ácido úrico e

ácido ascórbico. Ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas. Nível de concentração anormal poderá conduzir a várias doenças, tais como a hiperuricemia e gota. Outras doenças, tais como a leucemia e pneumonia também estão associadas ao aumento da taxa de urato [114]. O ácido ascórbico é um agente que previne o escorbuto, uma doença causada pela deficiência da vitamina C [115]. A Figura 51 mostra o voltamograma de pulso diferencial, com análise simultânea dos interferentes em solução. Observa-se claramente a presença de três picos em potenciais distintos, sendo atribuídos a oxidação da ureia em +0,1 V, ácido ascórbico +0,32 V e ácido úrico em +0,70V. O detalhe na figura corresponde a curva analítica da ureia obtida na presença dos interferentes, o valor de sensibilidade e limite de detecção foram determinados como  $0,70 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$  e  $0,09 \text{ mmol L}^{-1}$ .



**Figura 51.** VPD para o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs. Detecção simultânea de ureia na presença dos interferentes ácido ascórbico  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$  e ácido úrico  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Eletrólito tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,2). Amplitude de pulso  $25,0 \text{ mV}$ , Velocidade de varredura  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .

## 5. Conclusão

A tese apresentou o desenvolvimento de uma arquitetura capaz de detectar íon amônio e ureia através de uma rota não enzimática, empregando o método fase sólida-vapor para promover a nucleação e crescimento das micro/nanoestruturas de FF, sobre o eletrodo de ouro previamente modificado com o tiol 4-mercaptopiridina. Além disso, observou-se que o solvente influencia fortemente na estrutura final do material. A MNTs-FF sintetizada em vapor de água apresenta uma espessura média de 1,9  $\mu\text{m}$  e se organiza numa estrutura hexagonal com grupo de simetria  $P6_1$ . A espessura média da MNTs-FF sintetizada em vapor de anilina foi de 2,9  $\mu\text{m}$ , esta nova fase foi indexada num sistema cristalino ortorrômbico com grupo de simetria  $P22_12_1$ . Ambos os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente mediante adições de íon amônio. No entanto, a MNTs-FF organizada na fase hexagonal apresentou baixa adesão à superfície do ouro, atribui esse fato a baixa interação entre os anéis aromáticos da FF com as unidades de piridina dispostas na superfície do ouro. Por outro lado, a amostra sintetizada na estrutura ortorrômbica com grupo espacial  $P22_12_1$  apresentou excelente estabilidade com a camada de mercaptopiridina. Essa diferença estrutural é a chave para o bom desempenho do eletrodo porque fornece uma interface de peptídeos contendo sítios de nitrogênio e oxigênio capaz de estabelecer ligações com a piridina do substrato e com os íons amônio e ureia, que conduz a concentração desses analitos, via interações cátions  $\pi$  e ou ligações de hidrogênio.

A resposta do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF para detecção de ureia apresentou uma relação linear na faixa de concentração ente 0,1 a 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . A sensibilidade e o limite de detecção foi estimado como sendo 81,3  $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol}^{-1}\text{L}$  e

0,06 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses resultados mostram uma rota não-enzimática promissora, que possuem características analíticas adequadas para detectar ureia.

A MNTs-FF foi Funcionalizada com a PAni para ajudar no ancoramento da enzima urease sobre o eletrodo e também porque a PAni pode atuar como um mediador redox. As Imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram que as MNTs-FF se mantiveram estáveis depois da síntese eletroquímica da PAni, que ocorre em pH ~2. Além disso, indicou a diminuição da área exposta de MNTs-FF quando a enzima foi ancorada à superfície. Estudos de otimização apontaram que, maiores valores de sensibilidade foram obtidos para pH 6.2 e carga anódica de deposição da PAni como sendo 5mC. A sensibilidade estimada para o eletrodo Au/MNTs-FF/PAni/Urs após a determinação dos parâmetros foram ~ 30,0 µA mmol L<sup>-1</sup> cm<sup>-2</sup> e limite de detecção 0,17 mmol L<sup>-1</sup>. Embora os resultados tenham sido promissores comparados aos descritos na literatura, encontramos muitas dificuldades na reprodução dos mesmos, principalmente na etapa de imobilização da enzima.

Para melhorar o ancoramento da enzima ao eletrodo, o ácido 1-pireno butírico (Py) foi utilizado para funcionalizar a MNTs-FF, cuja interação entre o Py e MNTs-FF ocorre *via* interação  $\pi$ - $\pi$  *stacking* entre o grupo pirenilo e os anéis aromáticos da MNTs-FF. O grupo carboxílico foi utilizado para promover o ancoramento da urease sobre a superfície do eletrodo de ouro modificado. Nesse caso, observou-se por medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica, que a resistência à transferência de carga para o eletrodo Au/MCP/MNTs-FF foi dez vezes menor em relação ao eletrodo contendo Py ( $\approx$  60 k $\Omega$ ). No entanto, a resistência à transferência de carga para o eletrodo funcionalizado com a enzima Au/MCP/MNT-FF/Py/Urs foi estimado como sendo  $\approx$  200 k $\Omega$ . Essa diferença no aumento da  $R_{tc}$  pode ser devido

a presença da urease na superfície do eletrodo, já que é uma molécula com característica de isolante elétrico. A análise referente ao desempenho do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF/Py/Urs foi realizada pela voltametria de onda quadrada, o valor da sensibilidade estimada para esse sistema foi de  $4,57 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$  e o valor do limite de detecção como sendo  $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Foi estudado a influência dos nanotubos de carbono na nucleação e crescimento das MNTs-FF, as imagens de MEV revelaram que os NTc não interferem na morfologia da MNTs-FF. As análises espectrais de FTIR indicaram um pico em  $1658 \text{ cm}^{-1}$  na região da banda amida atribuída a conformação  $\beta$ -sheet da ligação amida da FF para o eletrodo sem NTC, Além disso, observa-se variações nas intensidades relativas atribuídas às bandas  $1457 \text{ cm}^{-1}$  e  $1658 \text{ cm}^{-1}$ , indicando possivelmente à formação de um material compósito.

Estudos por espectroscopia Raman revelaram as duas bandas características dos NTc sendo elas, a banda D em  $1346 \text{ cm}^{-1}$ , relacionado aos possíveis defeitos estruturais devido à funcionalização, que visou a introdução de grupos hidrofílicos à superfície dos nanotubos de carbonos e a banda G  $1584 \text{ cm}^{-1}$  que se apresenta assimétrica e larga, característica de nanotubos metálicos. O espectro Raman da MNTs-FF apresentam um conjunto de vibrações relacionados a estiramentos e vibrações dos anéis aromáticos, sendo o mais intenso o em  $1002 \text{ cm}^{-1}$ , referente a deformação do anel aromático no plano, porém não são observadas variações nessa banda, devido possivelmente a maior concentração de peptídeo não coordenado aos NTCs. Porém, variações mais perceptíveis são observadas na região centrada em  $1600 \text{ cm}^{-1}$ , essa região é referente aos estiramentos das ligações C-H do anel aromático. Para o nanocompósito Au/MCP/NTc/MNTs-FF observa-se que houve um deslocamento Raman tanto para a banda característica



da FF como da Banda G do NT mostrando que existe a interação entre os anéis aromáticos da FF com a estrutura dos NTc.

Os resultados de EIE apontaram que, o valor de  $R_{tc}$  para o eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs foi de aproximadamente 0,14 k $\Omega$ , inferior ao do eletrodo Au/MCP/MNTs-FF, indicando que o NTc facilita a transferência eletrônica.

As medidas de ângulo de contato revelaram a mudança de uma superfície hidrofóbica para uma superfície hidrofílica quando a enzima urease está imobilizada. Assim, presume-se que os grupos hidrofílicos da enzima estão na parte externa e interage com a gota de água enquanto que, os grupos hidrofóbicos interagem com os nanotubos de carbono e também com os anéis aromáticos da FF. Essa configuração permite melhor molhabilidade da superfície e, conseqüentemente, melhor difusão das espécies, contribuindo com a diminuição da resistência a transferência de carga.

A análise quanto ao desempenho do eletrodo Au/MCP/NTc/MNTs-FF/Urs foi realizada por VDP e apresentou valor de sensibilidade e limite de detecção como sendo 1,50  $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$  e 0,12  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente. Foram realizados estudos de interferentes e os picos em +0,32 V e +0,70 V são atribuídos a oxidação do ácido ascórbico e ácido úrico, respectivamente. O estudo de interferentes é importante por coexistir em amostras fisiológicas. O eletrodo proposto nessa etapa se mostra promissor para detecção de ureia na presença de possíveis interferentes.

## 6. Referências Bibliográficas

1. Cao, G., *Nanostructures & Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*. Imperial College Press: London, 2004; p 433.
2. Hu, F.-Q., Jiang, S.-P., Du, Y.-Z., Yuan, H., Ye, Y.-Q. and Zeng, S., Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2005**, 45, (3–4), 167-173.
3. Maye, M. M., Nykypanchuk, D., van der Lelie, D. and Gang, O., DNA-Regulated Micro- and Nanoparticle Assembly. *Small* **2007**, 3, (10), 1678-1682.
4. Adler-Abramovich, L., Badihi-Mossberg, M., Gazit, E. and Rishpon, J., Characterization of Peptide-Nanostructure-Modified Electrodes and Their Application for Ultrasensitive Environmental Monitoring. *Small* **2010**, 6, (7), 825-831.
5. Krishna, K. S., Li, Y., Li, S. and Kumar, C. S. S. R., Lab-on-a-chip synthesis of inorganic nanomaterials and quantum dots for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2013**, 65, (11–12), 1470-1495.
6. Takei, K., Takahashi, T., Ho, J. C., Ko, H., Gillies, A. G., Leu, P. W., Fearing, R. S. and Javey, A., Nanowire active-matrix circuitry for low-voltage macroscale artificial skin. *Nat Mater* **2010**, 9, (10), 821-826.
7. Massafra, M. P. and Córdoba de Torresi, S. I., Evaluating the performance of polypyrrole nanowires on the electrochemical sensing of ammonia in solution. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2012**, 669, (0), 90-94.
8. Zhu, X., Li, J., He, H., Huang, M., Zhang, X. and Wang, S., Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, 74, 113-133.
9. Gupta, V. and Miura, N., Influence of the microstructure on the supercapacitive behavior of polyaniline/single-wall carbon nanotube composites. *Journal of Power Sources* **2006**, 157, (1), 616-620.
10. Lu, P.-J., Huang, S.-C., Chen, Y.-P., Chiueh, L.-C. and Shih, D. Y.-C., Analysis of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in cosmetics. *Journal of Food and Drug Analysis* **2015**, 23, (3), 587-594.
11. Masheter, A. T., Abiman, P., Wildgoose, G. G., Wong, E., Xiao, L., Rees, N. V., Taylor, R., Attard, G. A., Baron, R., Crossley, A., Jones, J. H., and Compton, R. G., Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pKa values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies *Journal of Materials Chemistry* **2007**, 17, 2616-2626.
12. Deepak, F. L. a. T., R., Gas-phase synthesis of inorganic fullerene-like structures and inorganic nanotubes. *Central European Journal of Chemistry* **2008**, 6, 373-389.
13. Zarbin, A. J. G., Química de (nano)materiais. *Química Nova* **2007**, 30, 1469-1479.

14. Yang, H. K. and Wang, X., Torsional buckling of multi-wall carbon nanotubes embedded in an elastic medium. *Composite Structures* **2007**, 77, (2), 182-192.
15. Thostenson, E. T., Ren, Z. and Chou, T.-W., Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology* **2001**, 61, (13), 1899-1912.
16. L, D., Review of the doping of carbon nanotubes (multiwalled and single-walled). *Carbon* **2002**, 40, (10), 1751-1764.
17. Li, L.-J., Glerup, M., Khlobystov, A. N., Wiltshire, J. G., Sauvajol, J. L., Taylor, R. A. and Nicholas, R. J., The effects of nitrogen and boron doping on the optical emission and diameters of single-walled carbon nanotubes. *Carbon* **2006**, 44, (13), 2752-2757.
18. Kuchibhatla, S., Karakoti, A., Bera, D. and Seal, S., One dimensional nanostructured materials Program. *Mater. Sci* **2007**, 52, 699.
19. Masheter, A. T., Abiman, P., Wildgoose, G. G., Wong, E., Xiao, L., Rees, N. V., Taylor, R., Attard, G. A., Baron, R., Crossley, A., Jones, J. H. and Compton, R. G., Investigating the reactive sites and the anomalously large changes in surface pKa values of chemically modified carbon nanotubes of different morphologies. *Journal of Materials Chemistry* **2007**, 17, (25), 2616-2626.
20. Marek, T., Analytical applications of carbon nanotubes: a review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, 25, (5), 480-489.
21. Zhang, W., Qiao, X. and Chen, J., Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT microemulsion system. *Chemical Physics* **2006**, 330, (3), 495-500.
22. Chandrasekhar, S., Rao, C. L., Seenaiiah, M., Naresh, P., Jagadeesh, B., Manjeera, D., Sarkar, A. and Bhadra, M. P., Total Synthesis of Azumamide E and Sugar Amino Acid-Containing Analogue. *The Journal of Organic Chemistry* **2008**, 74, (1), 401-404.
23. Jagannadh, B., Reddy, M. S., Rao, C. L., Prabhakar, A., Jagadeesh, B. and Chandrasekhar, S., Self-assembly of cyclic homo- and hetero-[small beta]-peptides with cis- furanoid sugar amino acid and [small beta]-hGly as building blocks. *Chemical Communications* **2006**, (46), 4847-4849.
24. Ryu, J., Park, C. B., Synthesis of Diphenylalanine/Polyaniline Core/Shell Conducting Nanowires by Peptide Self-Assembly. *Nanotechnology* **2009**, 48, 4820-4823.
25. Song, Y., Challa, S. R., Medforth, C. J., Qiu, Y., Watt, R. K., Pena, D., Miller, J. E., Swol, F. v. and Shelnutt, J. A., Synthesis of peptide-nanotube platinum-nanoparticle composites. *Chemical Communications* **2004**, (9), 1044-1045.
26. Yuan, J., Chen, J., Wu, X., Fang, K. and Niu, L., A NADH biosensor based on diphenylalanine peptide/carbon nanotube nanocomposite. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, 656, (1-2), 120-124.
27. Silva, R. F., Araújo, D. R., Silva, E. R., Ando, R. A. and Alves, W. A., L-Diphenylalanine Microtubes As a Potential Drug-Delivery System: Characterization, Release Kinetics, and Cytotoxicity. *Langmuir* **2013**, 29, (32), 10205-10212.

28. Liu, Q., Wang, J. and Boyd, B. J., Peptide-based biosensors. *Talanta* **2015**, 136, 114-127.
29. LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman: Nova Iorque, 2005; Vol. 4<sup>a</sup> edition.
30. VOET, D. V., J.G.; PRATT, C.W. , *Fundamentos de Bioquímica: A vida em nível molecular*. Artmed: Porto Alegre, RS, 2008.
31. Reches, M., Gazit, E. , Designed aromatic homo-dipeptides: formation of ordered nanostructures and potential nanotechnological applications. *Physical Biology* **2006**, 3, S10-S19.
32. Lee, Y. S., *Self-Assembly and Nanotechnology: A Force Balance Approach*. John Wiley & Sons, Inc.: 2008.
33. Toksöz, S. and Guler, M. O., Self-assembled peptidic nanostructures. *Nano Today* **2009**, 4, (6), 458-469.
34. Ryu, J. and Park, C. B., High stability of self-assembled peptide nanowires against thermal, chemical, and proteolytic attacks. *Biotechnology and Bioengineering* **2010**, 105, (2), 221-230.
35. Ghadiri, M. R., Granja, J. R., Milligan, R. A., McRee, D. E. and Khazanovich, N., Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature* **1993**, 366, (6453), 324-327.
36. Reches, M. and Gazit, E., Casting Metal Nanowires Within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes. *Science* **2003**, 300, (5619), 625-627.
37. Tennent, G. A., Lovat, L. B. and Pepys, M. B., Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, 92, (10), 4299-4303.
38. Kol, N., Adler-Abramovich, L., Barlam, D., Shneck, R. Z., Gazit, E. and Rousso, I., Self-Assembled Peptide Nanotubes Are Uniquely Rigid Bioinspired Supramolecular Structures. *Nano Letters* **2005**, 5, (7), 1343-1346.
39. Adler-Abramovich, L., Reches, M., Sedman, V. L., Allen, S., Tendler, S. J. B. and Gazit, E., Thermal and Chemical Stability of Diphenylalanine Peptide Nanotubes: Implications for Nanotechnological Applications. *Langmuir* **2006**, 22, (3), 1313-1320.
40. Gorbitz, C. H., The structure of nanotubes formed by diphenylalanine, the core recognition motif of Alzheimer's [small beta]-amyloid polypeptide. *Chemical Communications* **2006**, (22), 2332-2334.
41. Kogikoski, S., Sousa, C. P., Liberato, M. S., Andrade-Filho, T., Prieto, T., Ferreira, F. F., Rocha, A. R., Guha, S. and Alves, W. A., Multifunctional biosensors based on peptide-polyelectrolyte conjugates. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, 18, (4), 3223-3233.
42. THÉVENOT, D. R. T., K.; DURST, R.A.; WILSON, S.G. , Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, (1-2), 121-131.

43. Pazos, E., Perez, M., Gutierrez-de-Teran, H., Orzaez, M., Guevara, T., Mascarenas, J. L. and Vazquez, M. E., Rational design of a cyclin A fluorescent peptide sensor. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, 9, (22), 7629-7632.
44. Zhao, N., He, Y., Mao, X., Sun, Y., Zhang, X., Li, C.-z., Lin, Y. and Liu, G., Electrochemical assay of active prostate-specific antigen (PSA) using ferrocene-functionalized peptide probes. *Electrochemistry Communications* **2010**, 12, (3), 471-474.
45. Kokkoli, E., Mardilovich, A., Wedekind, A., Rexeisen, E. L., Garg, A. and Craig, J. A., Self-assembly and applications of biomimetic and bioactive peptide-amphiphiles. *Soft Matter* **2006**, 2, (12), 1015-1024.
46. Cui, Y., Kim, S. N., Naik, R. R. and McAlpine, M. C., Biomimetic Peptide Nanosensors. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, (5), 696-704.
47. Wang, J., Zhao, X., Li, J., Kuang, X., Fan, Y., Wei, G. and Su, Z., Electrostatic Assembly of Peptide Nanofiber–Biomimetic Silver Nanowires onto Graphene for Electrochemical Sensors. *ACS Macro Letters* **2014**, 3, (6), 529-533.
48. Matos, I. d. O. and Alves, W. A., Electrochemical Determination of Dopamine Based on Self-Assembled Peptide Nanostructure. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, 3, (11), 4437-4443.
49. Yemini, M., Reches, M., Gazit, E. and Rishpon, J., Peptide Nanotube-Modified Electrodes for Enzyme–Biosensor Applications. *Analytical Chemistry* **2005**, 77, (16), 5155-5159.
50. Mendes, A. A., Oliveira, P. C. d., Castro, H. F. d. and Giordano, R. d. L. C., Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova* **2011**, 34, 831-840.
51. Ciurli, S. Laboratory of Bioinorganic Chemistry. Department of Pharmacy and Biotechnology - FaBiT. Disponível em <<http://bioinorg.agrsci.unibo.it/>>Acesso em 17/11/2015.
52. Taylor, A. J. and Vadgama, P., Analytical Reviews in Clinical Biochemistry: The Estimation of Urea. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine* **1992**, 29, (3), 245-264.
53. Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argiles, A., Baurmeister, U., Brunet, P., Clark, W., Cohen, G., De Deyn, P. P., Deppisch, R., Descamps-Latscha, B., Henle, T., Jorres, A., Lemke, H. D., Massy, Z. A., Passlick-Deetjen, J., Rodriguez, M., Stegmayr, B., Stenvinkel, P., Tetta, C., Wanner, C. and Zidek, W., Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* **2003**, 63, (5), 1934-1943.
54. Chen, J.-C. C., J.-C.; Sun, T.-P.; Hsiung, S.-K. , Portable Urea Biosensor Based on the Extended-gate Field Effect Transistor. *Sens. Actuators, B.* **2003**, 91, 180-186.
55. Vostiar, I., Tkac, J., Sturdik, E. and Gemeiner, P., Amperometric urea biosensor based on urease and electropolymerized toluidine blue dye as a pH-sensitive redox probe. *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, (1–2), 113-115.
56. Singh, M., Verma, N., Garg, A. K. and Redhu, N., Urea biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2008**, 134, (1), 345-351.

57. Souza, M. I., Jaques, Y. M., de Andrade, G. P., Ribeiro, A. O., da Silva, E. R., Fileti, E. E., Ávila, É. d. S., Pinheiro, M. V. B., Krambrock, K. and Alves, W. A., Structural and Photophysical Properties of Peptide Micro/Nanotubes Functionalized with Hypericin. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 117, (9), 2605-2614.
58. Reches, M., Gazit, E. , Controlled patterning of aligned self-assembled peptide nanotubes. *Nature Nanotechnology* **2006**, 1, (3), 195-200.
59. Banerjee, I. A., Yu, L., MacCuspie, R. I., Matsui, H., Thiolated Peptide Nanotube Assembly as Arrays on Patterned Au Substrates. *Nano Letters* **2004**, 4, (12), 2437-2440.
60. Amaral, H. R., Kogikoski Jr, S., Silva, E. R., Souza, J. A. and Alves, W. A., Micro- and nano-sized peptidic assemblies prepared via solid-vapor approach: Morphological and spectroscopic aspects. *Materials Chemistry and Physics* **2012**, 137, (2), 628-636.
61. Lasia, A., Impedance of porous electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, 397, (1-2), 27-33.
62. Carvalho, L. A. d., Andrade, A. R. d. and Bueno, P. R., Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em ânodos dimensionalmente estáveis. *Química Nova* **2006**, 29, 796-804.
63. Sawaguchi, T., Mizutani, F., Yoshimoto, S. and Taniguchi, I., Voltammetric and in situ STM studies on self-assembled monolayers of 4-mercaptopyridine, 2-mercaptopyridine and thiophenol on Au(111) electrodes. *Electrochimica Acta* **2000**, 45, (18), 2861-2867.
64. Bain, C. D., Troughton, E. B., Tao, Y. T., Evall, J., Whitesides, G. M. and Nuzzo, R. G., Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, (1), 321-335.
65. Kim, H. J., Kwak, S., Kim, Y. S., Seo, B. I., Kim, E. R. and Lee, H., Adsorption kinetics of alkanethiols studied by quartz crystal microbalance. *Thin Solid Films* **1998**, 327-329, (0), 191-194.
66. Shimazu, K., Yagi, I., Sato, Y. and Uosaki, K., In situ and dynamic monitoring of the self-assembling and redox processes of a ferrocenylundecanethiol monolayer by electrochemical quartz crystal microbalance. *Langmuir* **1992**, 8, (5), 1385-1387.
67. Tremiliosi-Filho, G., Dall'Antonia, L. H., Jerkiewicz, G., Limit to extent of formation of the quasi-two-dimensional oxide state on Au electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1997**, 422, 149-159.
68. Kawaguchi, T., Yasuda, H., Shimazu, K. and Porter, M. D., Electrochemical Quartz Crystal Microbalance Investigation of the Reductive Desorption of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols and Mercaptoalkanoic Acids on Au. *Langmuir* **2000**, 16, (25), 9830-9840.
69. Cipriano, T., Takahashi, P., de Lima, D., Oliveira, V., Souza, J., Martinho, H. and Alves, W., Spatial organization of peptide nanotubes for electrochemical devices. *Journal of Materials Science* **2010**, 45, (18), 5101-5108.
70. Martins, T. D., de Souza, M. I., Cunha, B. B., Takahashi, P. M., Ferreira, F. F., Souza, J. A., Fileti, E. E., Alves, W. A. J. Phys. Chem. C, 2011, 115, 7906., Influence

of pH and Pyrenyl on the Structural and Morphological Control of Peptide Nanotubes. *J. Phys. Chem. C* **2011**, 115, 7906-7913.

71. Demirel, G. k., Malvadkar, N. and Demirel, M. C., Control of Protein Adsorption onto Core-Shell Tubular and Vesicular Structures of Diphenylalanine/Parylene. *Langmuir* **2009**, 26, (3), 1460-1463.

72. Gdaniec, M. and Liberek, B., Structure of cyclo(-l-phenylalanyl-l-phenylalanyl-). *Acta Crystallographica Section C* **1986**, 42, (10), 1343-1345.

73. Silverstein, R., Webster, F. X. , Kiemle, D. , *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2007; p 550.

74. Petrij, O. A. and Vassina, S. Y., Adsorption of urea on platinum at low positive potentials: The time dependence and unexpectedly strong effect on the oxidation of uni-carbon particles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1993**, 349, (1-2), 197-209.

75. Kotnik, D., Novič, M., LaCourse, W. R. and Pihlar, B., Cathodic re-activation of the gold electrode in pulsed electrochemical detection of carbohydrates. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011**, 663, (1), 30-35.

76. Smith, Q. A., Gordon, M. S. and Slipchenko, L. V., Benzene-Pyridine Interactions Predicted by the Effective Fragment Potential Method. *The Journal of Physical Chemistry A* **2011**, 115, (18), 4598-4609.

77. Declan Burke, L. and O'Mullane, A. P., Generation of active surface states of gold and the role of such states in electrocatalysis. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2000**, 4, (5), 285-297.

78. Oesch, U. and Janata, J., Electrochemical study of gold electrodes with anodic oxide films—I. Formation and reduction behaviour of anodic oxides on gold. *Electrochimica Acta* **1983**, 28, (9), 1237-1246.

79. Luo, Y.-C. and Do, J.-S., Amperometric ammonium ion sensor based on polyaniline-poly(styrene sulfonate-co-maleic acid) composite conducting polymeric electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2006**, 115, (1), 102-108.

80. Strehlitz, B., Gründig, B. and Kopinke, H., Sensor for amperometric determination of ammonia and ammonia-forming enzyme reactions. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 403, (1-2), 11-23.

81. Shen, C.-Y., Huang, C.-P. and Huang, W.-T., Gas-detecting properties of surface acoustic wave ammonia sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2004**, 101, (1-2), 1-7.

82. Connolly, E. J., Timmer, B., Pham, H. T. M., Groeneweg, J., Sarro, P. M., Olthuis, W. and French, P. J., A porous SiC ammonia sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, 109, (1), 44-46.

83. Vidott, M. S., M. R., Salvador, R. P., Córdoba de Torrési, S. I., Dall'Antonia, L. H., Electrocatalytic oxidation of urea by nanostructured nickel/cobalt hydroxide electrodes. *Electrochimica Acta* **2008**, 53, 4030-4034.

84. Vedharathinam, V. and Botte, G. G., Understanding the electro-catalytic oxidation mechanism of urea on nickel electrodes in alkaline medium. *Electrochimica Acta* **2012**, 81, 292-300.

85. Srivastava, R. K., Srivastava, S., Narayanan, T. N., Mahlotra, B. D., Vajtai, R., Ajayan, P. M. and Srivastava, A., Functionalized Multilayered Graphene Platform for Urea Sensor. *ACS Nano* **2012**, 6, (1), 168-175.
86. Solanki, P. R., Kaushik, A., Ansari, A. A., Sumana, G. and Malhotra, B. D., Zinc oxide-chitosan nanobiocomposite for urea sensor. *Applied Physics Letters* **2008**, 93, (16), -.
87. Rajesh, Bisht, V., Takashima, W. and Kaneto, K., An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. *Biomaterials* **2005**, 26, (17), 3683-3690.
88. Luo, Y. C., Do, J. S. , Urea biosensor based on PANi(urease)-Nafion/Au composite electrode *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, 20, 15-23.
89. Xu, Z., Chen, X., Qu, X., Jia, J. and Dong, S., Single-wall carbon nanotube-based voltammetric sensor and biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, 20, (3), 579-584.
90. Massafera, M. P. and Torresi, S. I. C. d., Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: Comparing enzyme immobilization methods. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2009**, 137, (2), 476-482.
91. Carter, E. L. F., N.; Boer, J. L.; Mulrooney, S. B.; Hausinger, R. P. , Interplay of metal ions and urease. *Metallomics* **2009**, 1, 207-221.
92. Poteau, R. and Trinquier, G., All-cis Cyclic Peptides. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (40), 13875-13889.
93. Mattoso, L. H. C., Polianilinas: Síntese, estruturas e propriedades. *Química Nova* **1996**, 19, (4), 388-399.
94. Ryu, K. S., Kim, K. M., Park, N.-G., Park, Y. J. and Chang, S. H., Symmetric redox supercapacitor with conducting polyaniline electrodes. *Journal of Power Sources* **2002**, 103, (2), 305-309.
95. Zoppi, R. A., De Paoli, M. A. , Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais. *Química Nova* **1993**, 16, (6), 560-569.
96. FAEZ, R. R., C.; FREITAS. P.S.; KOSIMA. O.K.; RUGGERI, G.; DE PAOLI, M.A. . , Polímeros Condutores. *Química Nova na Escola* **2000**, (1), 13-18.
97. Emami Meibodi, A. S. and Haghjoo, S., Amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrochemically polymerized film of polyaniline containing MWCNTs. *Synth. Met.* **2014**, 194, (0), 1-6.
98. Crespilho, F. N., Iost, R. M., Travain, S. A., Oliveira Jr, O. N. and Zucolotto, V., Enzyme immobilization on Ag nanoparticles/polyaniline nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 24, (10), 3073-3077.
99. Kuila, B. K., Gowd, E. B. and Stamm, M., Supramolecular Assembly of Poly(styrene)-b-poly(4-vinylpyridine) and 1-Pyrenebutyric Acid in Thin Film and Their Use for Nanofabrication. *Macromolecules* **2010**, 43, (18), 7713-7721.



100. Ahuja, T., Kumar, D., Singh, N., Biradar, A. M. and Rajesh, Potentiometric urea biosensor based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/silica composite material. *Materials Science and Engineering: C* **2011**, 31, (2), 90-94.
101. Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: Boston, 2013; p 1146.
102. Sandí, G. and Vanýsek, P., Impedance and voltammetric studies of electrogenerated polyaniline conducting films. *Synth. Met.* **1994**, 64, (1), 1-8.
103. Skinner, N. G. and Hall, E. A. H., The relevance of an equivalent circuit for polyaniline using immittance spectroscopy. *Synth. Met.* **1994**, 63, (2), 133-145.
104. Bard, A. J., Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. Wiley: New York, 2000.
105. Herbst, M. H., Macêdo, M. I. F. and Rocco, A. M., Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. *Química Nova* **2004**, 27, 986-992.
106. Filho, A. G. S., Jorio, A., Ge, G. S., Dresselhaus, G., Saito, R. and Dresselhaus, M. S., Raman spectroscopy for probing chemically/physically induced phenomena in carbon nanotubes. *Nanotechnology* **2003**, 14, (10), 1130.
107. Souza Filho, A. G. d. and Fagan, S. B., Funcionalização de nanotubos de Carbono. *Química Nova* **2007**, 30, 1695-1703.
108. Wei, D., Kvarnström, C., Lindfors, T. and Ivaska, A., Electrochemical functionalization of single walled carbon nanotubes with polyaniline in ionic liquids. *Electrochemistry Communications* **2007**, 9, (2), 206-210.
109. Knill, C., Handbook of Fourier Transform Raman and Infrared Spectra of Polymers A.H. Kuptsov and G.N. Zhizhin. *Bioseparation* **2000**, 9, (1), 55-55.
110. Filho, T. S. d. A. Simulações Computacionais de Efeitos de Solvente em Sistemas Nanosópios. Tese (Doutorado em Nanociências e Materiais Avançados), Universidade Federal do ABC., 2014.
111. Sumana, G., Das, M., Srivastava, S. and Malhotra, B. D., A novel urea biosensor based on zirconia. *Thin Solid Films* **2010**, 519, (3), 1187-1191.
112. Whitesides, G. M. and Laibinis, P. E., Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface. *Langmuir* **1990**, 6, (1), 87-96.
113. Yasuda, T., Okuno, T. and Yasuda, H., Contact Angle of Water on Polymer Surfaces. *Langmuir* **1994**, 10, (7), 2435-2439.
114. Chen, J., Zhang, J., Lin, X., Wan, H. and Zhang, S., Electrocatalytic Oxidation and Determination of Dopamine in the Presence of Ascorbic Acid and Uric Acid at a Poly (4-(2-Pyridylazo)-Resorcinol) Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* **2007**, 19, (5), 612-615.
115. Raj, M. A., Revin, S. B. and John, S. A., Selective determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the presence of ascorbic acid using 4-(dimethylamino)pyridine capped gold nanoparticles immobilized on gold electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, 87, (2), 353-360.

## 7. Súmula Curricular

### Dados Pessoais

**Roberta Martins da Costa Bianchi**

### 1. Formação

#### *Graduação*

Bacharel em Química Industrial. Universidade São Francisco

Início: Fevereiro de 2008 / Conclusão: Dezembro 2010.

#### 1.1. Formação complementar

4ª Escola de Nanociência e Nanotecnologia da UFRJ.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil

Treinamento - Analisador Voltamétrico 797. (Carga horária 12h)

### 2. Produção Científica

#### Publicações

##### Artigos

1. **BIANCHI, R.C.**; SILVA, E.R.; DALL'ANTONIA L.H.; FERREIRA, F.F.; ALVES, W.A. A Nonenzymatic Biosensor Based on Gold Electrodes Modified with Peptide Self-Assemblies for Detecting Ammonia and Urea Oxidation. *Langmuir* **2014**, 30, 11464-11473.

2. CIPRIANO, T.C.; KNOTTS, G.; LAUDARI, A.; **BIANCHI, R.C.**; ALVES, W.A.; GUHA, S. Bioinspired Peptide Nanostructures for Organic Field-Effect Transistors. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2014**, 6, 21408-21415.

## Capítulos de livros

1. SILVA, E. R.; LIBERATO, M. S.; SOUZA, M. I.; SILVA, R. F.; KOGIKOSKI JR, S.; **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A.. Microscopy tools for investigating nano-to-mesoscale peptide assemblies. In: Antonio Méndez-Vilas. (Org.). Current microscopy contributions to advances in science and technology. 5ed. Spain: Formatex Research Center, 2012, v. 2, p. 1456 -1467.
2. Kogikoski Jr., S.; **Bianchi, R.M.C.**; Liberato, M.S.; Decandio, C.C.; Alves, W.A.; Auto-Organização Hierárquica de Peptídeos: Das Moléculas aos Nanomateriais. In: Wendel Andrade Alves (Org.) Química Supramolecular, Editora Atheneu, submetido para publicação em maio de 2013.

## Participação e Apresentação de Trabalhos em Congressos

1. **BIANCHI, R.C.**; Kogikoski Jr., Sérgio; ALVES, W.A. "Influence of carbon nanotubes in the nucleation and growth of L-diphenylalanine micro/nanostructures via solid-vapor phase. Potential application as urea biosensor. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE) 2015. Uberlândia, MG.
2. **BIANCHI, ROBERTA C.**; SILVA, E. R.; DALL'ANTONIA, LUIZ H. ; ALVES, W. A. . Eletrodo de Au modificado com L-difenilalanina como sensor de íon amônio e ureia: papel do solvente na auto-organização. In: 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2014, Natal. Eletroquímica, 2014.
3. **Bianchi, Roberta C.**; SILVA, E. R.; DALL'ANTONIA, LUIZ H.; FERREIRA, F. F.; ALVES, W. A.. A Rationally Designed Device For Ammonia And Urea Oxidation Based On Gold Electrodes Modified With L-Diphenylalanine Microstructures. In: 65th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE), 2014, Lausanne.
4. III *School on Bioanalytical Chemistry* (ESCBIO) realizado nos dias 21 e 22 de outubro de 2015 na cidade de Goiânia, GO.
5. **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Urea sensor based on Au electrodes modified with peptide micro/nanostructures. *Peptide Materials for Biomedicine and Nanotechnology* (PepMat) 2013. Sorrento – Itália.
6. **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Study of the electrochemical behavior of gold modified electrode with peptide micro/nanostructures for urea detection. In: XIX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE) 2013, Campos do Jordão.

7. II *School of Bioanalytical Chemistry* (ESCBIO), realizado no período de 11 a 13 de novembro de 2013 na cidade de Maceió - AL.

8. AMARAL, H. R.; KOGIKOSKI JR, S.; KUBOTA, L. T.; MENDES, R. K.; MELO, D. C. F.; **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Síntese e Caracterização de Nanoestruturas Peptídicas Funcionalizadas com Polianilina. In: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2012, Bento Gonçalves.

9. KOGIKOSKI JR, S.; AMARAL, H. R.; **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Nanomateriais de Peptídeo Modificados com Polianilina: Estudos Espectroscópicos e Eletroquímicos. In: XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica (SIBAE), 2012, Fortaleza.

10. **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Non-enzymatic Urea Detection Using Peptide-Based Nanostructure Architecture Functionalized with CuO. In: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE), 2012, Praga – República Theca.

11. **BIANCHI, R. C.**; ALVES, W. A. Peptide Micro/Nanostructures As A Plataform For Detection Of Urea. In: International Conference on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials, 2012, Nice – França.

12. I *School of Bioanalytical Chemistry* (ESCBIO), realizado no período de 4 a 6 de Setembro de 2012, no Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - SP.