



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAPEBA
ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**SÍNTESE E PREPARAÇÃO DE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE
TITÂNIO PARA USO EM BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
UREIA**

ANA CAROLINA RAGI RIBEIRO

OURO BRANCO – MG

2016

ANA CAROLINA RAGI RIBEIRO

**SÍNTESE E PREPARAÇÃO DE NANOTUBOS DE DIÓXIDO DE
TITÂNIO PARA USO EM BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
UREIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de São João Del-Rei como
exigência parcial para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elidia Maria Guerra

OURO BRANCO – MG

2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Sensores Químicos	5
1.2 Biossensores	7
1.3 Imobilização do elemento biológico	15
1.4 Urease	22
1.5 Síntese e preparação dos nanotubos de Dióxido de Titânio	24
1.6 Uso de nanoestruturas em biossensores	26
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
3.1 Síntese	31
3.2 Confeção dos Filmes	33
3.3 Métodos de Caracterização	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura	36
4.2 Análises dos resultados da Difração de Raios-X	38
4.3 Estudo eletroquímico avaliado em voltametria cíclica (VC) para análise do NTiO ₂	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

NTiO₂ – nanotubos de dióxido de titânio;

GOx - enzima glucose oxidase;

MEV – Microscopia eletrônica de varredura;

VC – Voltametria cíclica;

PET/ITO – filme dupla face, a qual possui um lado condutor (ITO - óxido de índio dopado com estanho) e outro não condutor (PET – polímero).

RESUMO

Biossensores são ferramentas de uso imprescindível na área médica por apresentarem diversas aplicações, envolvendo uma demanda por um sensor específico. Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para o uso em análises clínicas e se baseiam no preparo de eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados. A enzima urease, devido a sua alta especificidade, estabilidade e baixo custo tem tido destaque em estudos para atuação em biossensores para detecção de ureia, atuando como catalisador altamente eficiente durante a hidrólise da mesma. A construção de biossensores para detecção de ureia é de extrema importância, pois se trata de um bioproduto monitorado no sangue como indicador de função renal e um elevado nível causa insuficiência renal. Dessa forma, estudiosos têm buscado substâncias como o dióxido de titânio (TiO_2), pigmento branco, estável quimicamente, atóxico e de custo relativamente baixo para a construção de biossensores. Sendo assim, os objetivos abordados neste trabalho têm como intuito, a partir de rotas clássicas já estabelecidas em literatura e outras adaptadas, realizar e preparar nanotubos de dióxido de titânio através da rota hidrotérmica e realizar a imobilização da urease na superfície desses nanotubos. Os resultados demonstraram que, ainda, será necessário realizar uma nova adaptação na síntese para a preparação do nanotubos de TiO_2 , pois não houve a sua formação. Embora houvesse a tentativa de adaptação da uma nova síntese, os materiais para a preparação de nanotubos de TiO_2 , via anodização eletroquímica, não chegaram em tempo hábil. Com o intuito de realizar a imobilização de urease no material inorgânico de TiO_2 , testes eletroquímicos de voltametria cíclica foram realizados e foi observado que o material contendo TiO_2 /urease, em presença de ureia, apresentou um comportamento puramente capacitivo.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sensores Químicos

Nos últimos anos, os sensores químicos têm atraído atenção significativa em diversas áreas como no processamento de alimentos, no meio ambiente, na agricultura, em diagnósticos médicos. [1]. Desta forma, as atividades de pesquisa estão direcionadas no desenvolvimento de materiais e tecnologias de detecção que atendam as características essenciais, incluindo seletividade, sensibilidade a limites de detecção mais baixos, tempo de resposta mais curto possível, baixo custo de fabricação, robustez e portabilidade [2].

Os sensores podem ser definidos como dispositivos que recebem e respondem a um sinal ou estímulo, podendo ser encontrados desde em organismos vivos, caracterizando sensores naturais, até os fabricados pelo homem, caracterizando os sensores artificiais. O objetivo do sensor é responder a algum tipo de propriedade física de entrada, um estímulo, e convertê-lo em sinal elétrico compatível com circuitos eletrônicos. Este sinal de saída pode ser na forma de potencial, corrente e carga elétrica [3]. Os sensores químicos transformam a informação química, desde a concentração de um componente específico à composição total, em um sinal analiticamente útil possuindo como componentes básicos um receptor e um transdutor físico-químico, conforme **Figura 1.1** [4].

Uma analogia ao sistema biológico é usualmente realizada para identificar como é construído um sensor químico, sendo ilustrada na **Figura 1.1**. No organismo vivo, o órgão sensor recepta o estímulo que é transformado em sinal elétrico. Este sinal é conduzido e amplificado pelas células nervosas (neurônios) na forma de pulsos de potencial. No cérebro, a informação é avaliada e posteriormente executada. Na comparação de como adquirem e processam os sinais, os organismos vivos e sensores artificiais possuem grande semelhança. No último, encontra-se um receptor que responde aos parâmetros ambientais por mudança de algumas de suas propriedades inerentes. Em seguida, esta informação é transformada em sinal elétrico por um transdutor. Nos sensores mais modernos, encontram-se partes que amplificam o sinal. E por fim, o sinal é processado por um computador, assim como no cérebro do sistema biológico [4].

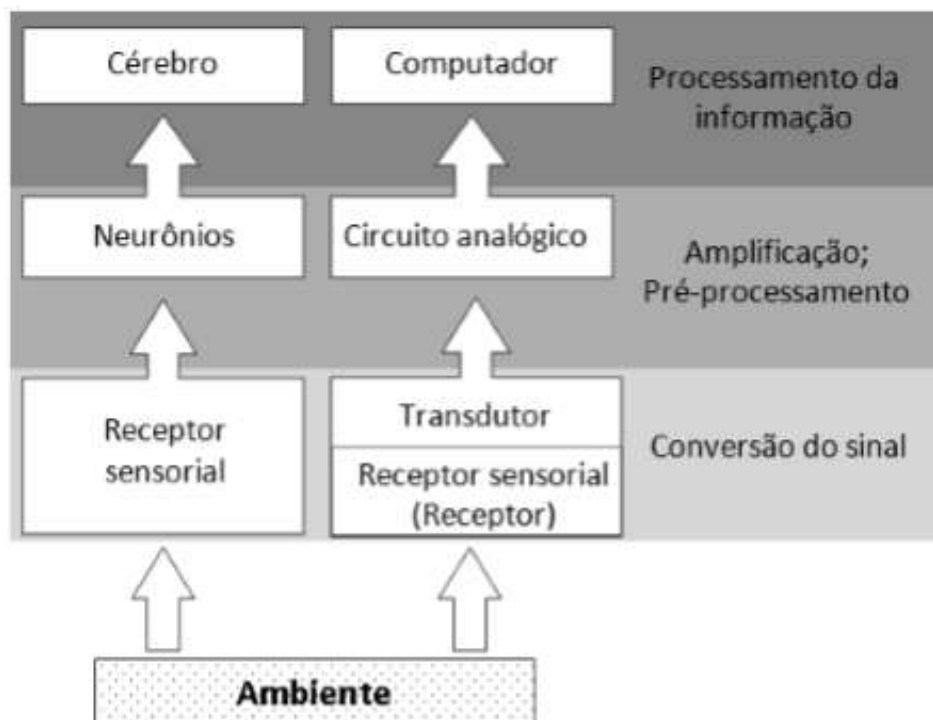


Figura 1.1: Analogia do processamento do sinal em sensores químicos com o organismo vivo. Adaptado de [4].

Desta forma, os sensores químicos são constituídos de duas partes fundamentais: parte receptora e parte transdutora. Na parte receptora, a informação química é transformada na forma de energia. Já a parte transdutora é capaz de transformar esta forma de energia em um sinal analiticamente útil [5]. A parte receptora dos sensores químicos pode ser baseada em vários princípios de detecção:

- Físico: consiste na medida de, por exemplo, absorbância, condutividade, dentre outros;
- Químico: baseado na reação química com o analito de interesse;
- Bioquímico: em que um processo bioquímico é a origem do sinal analítico. Sensores com esta característica constituem um subgrupo conhecido como biossensores.

O uso dos sensores tem se expandido enormemente nos últimos anos, e de particular interesse os biossensores.

1.2 Biossensores

O termo biossensor foi introduzido por *Leland C. Clark Jr.* em 1956 [8] com a invenção do eletrodo amperométrico de oxigênio. *Clark* realizou intensos estudos na detecção de diferentes analitos pela modificação deste eletrodo com enzimas. Assim, em 1962, *Clark* e *Lyons* [8] construíram um sensor de glicose em que este eletrodo era envolto por uma membrana de diálise com a enzima glicose oxidase (GOx) imobilizada [6, 7]. Este biossensor, conforme **Figura 1.2**, é baseado no fato de que a GOx catalisa a oxidação da glicose em ácido glicônico [8]. O oxigênio dissolvido na solução entre os eletrodos é reduzido, e a corrente resultante é proporcional à concentração de oxigênio, que é diretamente proporcional à concentração de glicose.

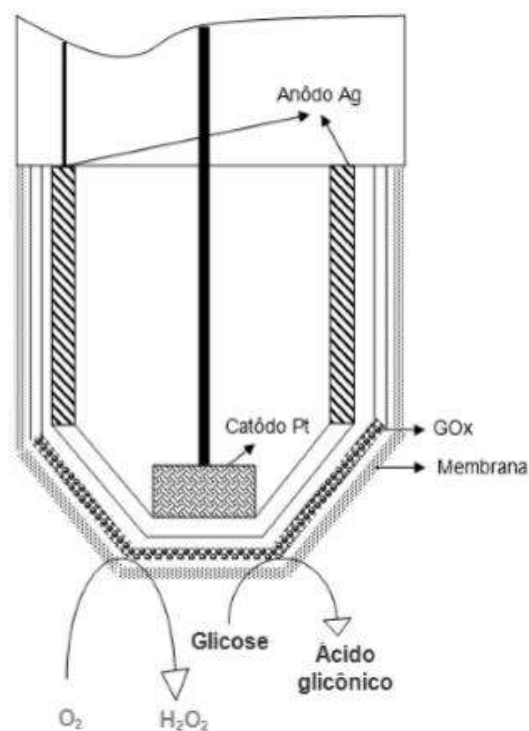


Figura 1.2: Biossensor de glicose baseado no eletrodo de oxigênio de Clark
Adaptado de [8].

Mais tarde, *Updike* e *Hicks* [6] adaptaram ao biossensor de *Clark* e *Lyon* [8] um segundo eletrodo de O_2 para corrigir variações de oxigênio na amostra.

Assim, o eletrodo de *Clark* foi um considerável ponto de partida para o estudo destes dispositivos, e desde então, a busca pelo desenvolvimento de novos biossensores para um crescente número de aplicações nas áreas de saúde, meio ambiente e alimentação torna este mercado promissor [7, 9].

1.2.1 Características dos Biossensores

O biossensor é formado basicamente por dois elementos intimamente associados: componente biológico ou bioreceptor e o transdutor, conforme **Figura 1.3**. O componente biológico tem a finalidade de detectar a substância de interesse (analito) por meio de uma reação bioquímica gerando um sinal, que pode ser uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, variação de massa, mudança de estado de oxidação, entre outros. O transdutor converte este sinal em uma resposta quantificável proporcional à concentração do analito, do tipo corrente, potencial, variação de temperatura, entre outras [11].

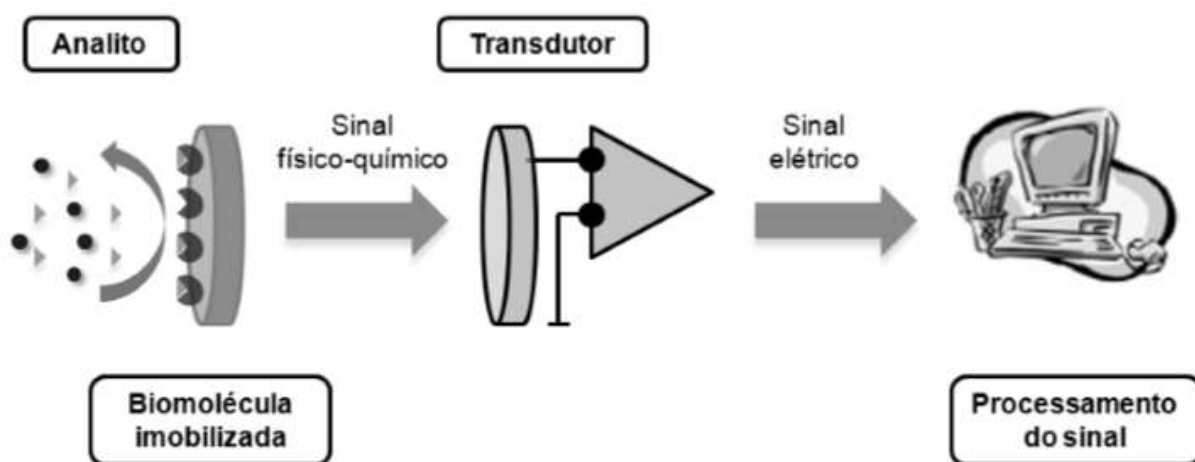


Figura 1.3: Elementos de um biossensor.

Dentre as características esperadas de um biossensor, as mais importantes são: seletividade, baixo custo e facilidade na construção, potencial para miniaturização, resposta rápida, potencial de automação e construção de equipamentos simples e portáteis [12], como mostrado na **Figura 1.4** abaixo.

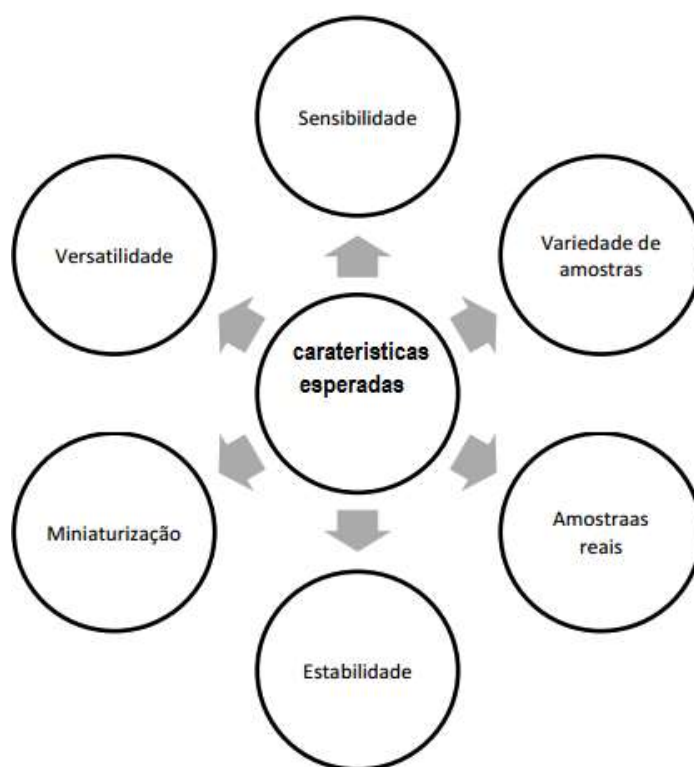


Figura 1.4: Esquemática das características esperadas de um biossensor [12].

O que diferencia os biossensores dos demais sensores químicos e métodos analíticos convencionais é a especificidade ou seletividade da análise. Isso se deve ao componente biológico, onde sua interação com o substrato é altamente específica, evitando interferências de outras substâncias, como acontece em outros métodos analíticos. A seletividade do biossensor é a habilidade para discriminar um entre diferentes substratos [13].

A necessidade de produtos químicos e reagentes pode ser drasticamente reduzida quando são empregados biossensores. Isso faz destes uma alternativa promissora, de baixo custo de operação e manutenção [14]. Outra característica é a portabilidade dos biossensores, com possibilidade de determinar os analitos diretamente em amostras complexas, não necessitando de longos e custosos pré-tratamentos. Isso se deve em especial à tendência de miniaturização, principalmente na área biomédica, pois as amostras biológicas estão disponíveis em pequenas quantidades, e danos ao tecido devem ser minimizados em caso de monitoramento “*in vivo*” [10]. A seguir, na **Tabela 1.1** é apresentada uma comparação das características dos biossensores em relação aos métodos analíticos convencionais.

Tabela 1.1: Comparação das características dos biossensores com os métodos analíticos convencionais. Adaptado de [17].

Biossensores	
Vantagens	Desvantagens
• Preparação mínima de amostras; • Análise direta; • Facilidade de utilização; • Portabilidade; • Uso de pequena quantidade da amostra; • Baixo custo; • Resultados rápidos.	• Baixa estabilidade do material biológico; • Determinação de um único analito; • Pouca disponibilidade comercial.
Métodos analíticos convencionais	
Vantagens	Desvantagens
• Estabilidade biológica sem restrição; • Determinação de analitos variados; • Disponibilidade comercial.	• Preparo e concentração prévia da amostra; • Necessidade de pessoal capacitado; • Metodologia laboratorial; • Uso de grande quantidade de amostra; • Alto custo; • Maior tempo de análise.

1.2.2 Classificação dos Biossensores

Nos biossensores, diferentes elementos biológicos podem ser combinados com vários tipos de transdutores. Um resumo de elementos biológicos e transdutores usados na fabricação de biossensores são apresentados na **Tabela 1.2**.

A maneira como o transdutor enxerga o sinal, depende de como a imobilização do elemento de biorreconhecimento é feita, para que ele continue ativo por certo período em determinadas condições ambientais, como pH e temperatura. Logo, é de grande importância a escolha adequada do elemento de biorreconhecimento, do método de imobilização e do método de transdução.

Tabela 1.2: Elementos biológicos e transdutores utilizados para fabricação de biossensores. Adaptado de [5].

Elementos biológicos	Transdutores
• Enzimas • Antibióticos • Receptores • Células • Membranas • Tecidos • Organismos • Organelas • Ácidos Nucléicos • Moléculas orgânicas	Eletroquímicos • Amperométrico • Potenciométrico: ✓ Íon seletivo ✓ Transistor de efeito de campo (FET) • Condutimétrico Óptico • Fibra óptica • Ressonância de superfície de plasma (SPR) • Fibra óptica SPR Calorimétrico • Condução de calor • Isotérmico Acústico • Onda acústica de superfície • Microbalança piezocristal

1.2.2.1 Elemento biológico

Os elementos de reconhecimento biológico podem ser agrupados de acordo o tipo de interação com o analito alvo. É esta interação que assegura a seletividade dos biossensores [10].

- Biocatalisadores: enzimas, microorganismos e tecidos. Este grupo catalisa reações bioquímicas, atuando na redução ou no aumento da energia de ativação de uma reação química;
- Bioligantes ou bioafinidade: anticorpos, ácidos nucleicos e lectinas. Estas moléculas têm sua atividade associada a algum tipo de interação com uma biomacromolécula.

Na escolha do elemento de biorreconhecimento, algumas observações devem ser feitas acerca deste, como a disponibilidade de sítios reativos para reagir ou interagir com o analito ou substrato, a estabilidade no meio em que a detecção será

realizada, além das condições de medição e possibilidade de modificação/imobilização nos transdutores ou suportes sem afetar o seu desempenho [18].

Uma das características essenciais para um biossensor é a sua habilidade em discriminar um entre diferentes substratos. Desta forma, as enzimas foram e continuam sendo o elemento de reconhecimento biológico mais empregado na construção de biossensores, formando o biossensor enzimático.

1.2.2.2. Elemento transdutor

Na escolha do transdutor deve-se verificar sua adequação para adaptação do material biológico, sendo capaz de detectar qualquer variação que ocorra durante a reação biológica. De acordo com o tipo de transdutor utilizado, o biossensor é classificado como piezoelétrico/gravimétrico, eletroquímico, impedantiométrico, óptico e térmico [5].

O biossensor óptico é baseado na medição de luz absorvida ou emitida como consequência de uma reação bioquímica. As ondas de luz são guiadas por meio de fibras ópticas para detectores apropriados. Estes biossensores apresentam o inconveniente por não serem aplicáveis em meios turvos. O biossensor térmico ou biossensor calorimétrico detecta um analito em função do calor desenvolvido devido à reação bioquímica do analito com a enzima adequada. Biossensores térmicos não podem ser usados em sistemas com mudança de calor pequena, e não são fáceis de manusear. Os biossensores piezelétricos operam com o princípio de geração de dipolos elétricos ao submeter um cristal natural anisotrópico ao estresse mecânico. A absorção do analito aumenta a massa do cristal e altera a sua frequência básica de oscilação [19].

Os biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais empregados, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação permitindo sua aplicação em um grande número de amostras [20, 21]. Dependendo da propriedade eletroquímica a ser medida pelo sistema detector, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em amperométricos, condutimétricos ou potenciométricos [22].

- Biossensor amperométrico: A amperometria se baseia na medição da corrente resultante de uma reação redox de espécies eletroativas. É realizada através da manutenção de um potencial constante baseado em um eletrodo de trabalho em relação a um eletrodo de referência. A corrente resultante é diretamente correlacionada com a concentração em massa do analito [11].
O biossensor amperométrico é mais rápido, mais sensível, não precisa esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e apresenta baixo custo devido à simplicidade dos dispositivos e instrumentos.
- Biossensor condutimétrico: O transdutor condutimétrico mede a variação da condutividade do eletrólito em uma célula eletroquímica [3]. Desta forma, utilizam-se principalmente enzimas que produzem ou consomem espécies iônicas, em suas reações bioquímicas, alterando a condutividade global da solução. Por esses sinais serem de magnitude pouco estável, e de depender fortemente da temperatura, poucos biossensores condutimétricos tem sido desenvolvidos [20].
- Biossensor potenciométrico: A medição potenciométrica baseia-se na determinação da diferença de potencial entre um eletrodo indicador e um eletrodo de referência, ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva, quando não há corrente significativa fluindo entre eles [3]. Os biossensores potenciométricos baseados em íons-seletivos (ISE) desenvolvem um potencial no eletrodo de trabalho por acumulação de carga aumentando a densidade de carga na superfície do eletrólito. Assim, em biossensores baseados em enzimas, por exemplo, espécies químicas ou íons são produzidas ou consumidas pelas enzimas durante a reação catalítica. Consequentemente, uma diferença de potencial é criada entre o eletrodo de referência e o eletrodo de íon-seletivo ou de trabalho, sendo transformada em um sinal mensurável [22].

Desta forma, a escolha adequada do transdutor, também constitui uma etapa chave no desenvolvimento do biossensores, pois está em íntimo contato com o elemento biológico [23].

1.2.3 Biossensores eletroquímicos baseados em enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos com alta massa molar formadas por longas cadeias de aminoácidos, constituindo, portanto, um tipo de proteína natural. Elas aceleram as reações químicas promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Esta habilidade catalítica das enzimas é devido à sua estrutura proteica. As enzimas possuem o sítio ativo, que corresponde a uma pequena porção de sua superfície. O sítio ativo contém um grupo prostético, que frequentemente é constituído de um ou mais átomos de metal. Desta forma o sítio ativo é o responsável por catalisar reações químicas específicas [8, 24, 25].

Um aspecto muito importante em enzimas é sua atividade catalítica ou atividade enzimática. Uma unidade (U) de atividade é a quantidade de enzima que converte 1 μmol de substrato (S) em produto (P) em 1 minuto, sob condições específicas de temperatura e pH. A atividade específica é o número de unidade em 1 mg de proteína [26].

O mecanismo de ação de diversas enzimas tem sido estudado. Dentre eles, o mais comum é o de *Michaelis* e *Menten*, que envolve um único substrato se transformando em um único produto. Inicialmente, admite-se que a enzima e o substrato reagem reversivelmente, formando um complexo enzima-substrato, que por sua vez, ou se decompõe ou reage com outra substância, liberando a enzima livre, conforme **Equação 1.1**:



onde E é a enzima, $E \cdot S$ é o complexo enzima-substrato, P é o produto e K é a constante de velocidade.

Em 1984, *Emil Fisher* propôs o tipo de interação que ocorre entre a enzima e seu substrato, com o propósito de explicar a ação enzimática [27]. Este modelo estabelece que o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas

semelhantes, onde o substrato se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima. A **Figura 1.5** ilustra o processo.

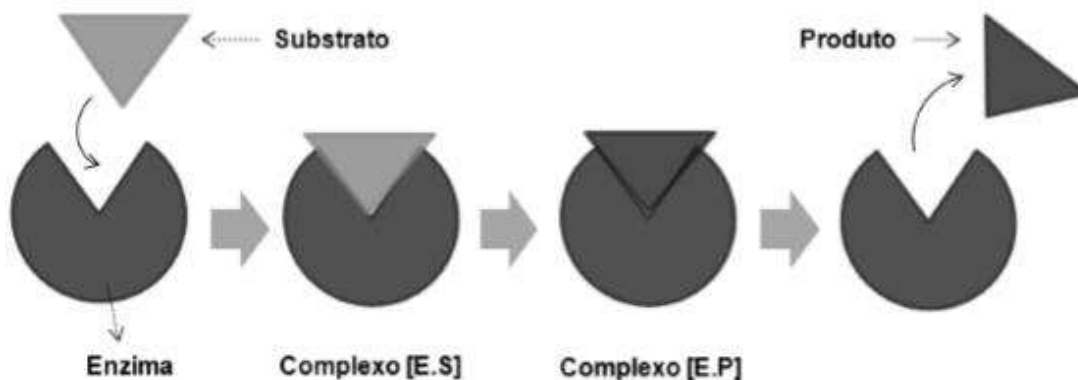


Figura 1.5: Modelo para a ação enzimática.

Dentre as vantagens do uso de enzimas em biossensores, incluem-se a sua natureza biorrenovável, a capacidade de modificar as propriedades catalíticas ou especificidade do substrato por meio da engenharia genética, e amplificação catalítica da resposta do biossensor pela modulação da atividade da enzima em relação ao analito alvo [28].

Na aplicação de biossensores enzimáticos, devem-se verificar alguns fatores que afetam a estabilidade das enzimas, no que diz respeito à variação das condições físico-químicas do meio reacional. Esta desvantagem pode ser contornada usando as condições adequadas de pH e temperatura, além da escolha adequada do método de imobilização em transdutores e, mais recentemente em estruturas biocompatíveis, que garantam a manutenção da atividade enzimática [20].

1.3 Imobilização do elemento biológico

Cada enzima é única em suas características e isto influencia na escolha do procedimento de imobilização. Entretanto, a obtenção de um biocatalisador com estabilidade operacional depende da estabilidade do suporte e do tipo de amostra, a qual pode conter diferentes ativadores e/ou inibidores. Como não existe um método ideal ou procedimento geral para a imobilização do componente biológico, a

diversidade de métodos existentes permite a escolha de um que promova uma melhor imobilização e menor perda de atividade enzimática [29, 30].

Scouten (1987) considera que todos os métodos possuem vantagens e desvantagens que precisam ser ponderadas e investigadas para todos os biocatalisadores e reação enzimática. Por este motivo, é necessário escolher o procedimento mais simples e barato, que resulte em uma imobilização com boa retenção da atividade e alta estabilidade operacional, para cada aplicação de enzima imobilizada. Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos.

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em relação à temperatura e a solventes orgânicos [32].

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar ou confinar as enzimas em suportes sólidos, estando baseadas em mecanismos físicos e químicos. Entre os métodos de imobilização estão: retenção física, que consiste no confinamento das moléculas da enzima em matriz polimérica, microcápsula ou membrana; a imobilização por ligação da enzima a um material insolúvel, e pelo uso de um reagente multifuncional por ligações cruzadas [33], conforme pode ser verificado na **Figura 1.6**.



Figura 1.6: Métodos para imobilização de enzimas. Adaptado de [34].

1.3.1 Imobilização por Adsorção Física

O método de adsorção física é considerado o método de imobilização mais simples e baseia-se na adsorção física da enzima na superfície de suportes insolúveis. A enzima fica retida na superfície do suporte insolúvel que se encontra em meio aquoso, por meio de interações de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações específicas. Este método promove pouca perturbação sobre a estrutura nativa da enzima, porém, apresenta como desvantagem a dessorção da enzima durante sua utilização [30, 35, 36].

O procedimento consiste em misturar a enzima e o material do suporte em condições apropriadas e após um tempo de contato, é feita a separação do suporte imobilizado da solução em que ele se encontra, por centrifugação ou filtração. A atividade da enzima imobilizada aumenta com a concentração da enzima, aproximando a um valor de saturação a altas concentrações de enzimas. A maior desvantagem desse método é a ligação fraca entre enzima-suporte e a preocupação com as condições de temperatura, pH, força iônica e tipo de solvente estar ou não em condições ótimas para não haver dessorção da enzima durante sua utilização [37].

1.3.2 Imobilização por Ligações Covalentes

Imobilização de enzimas por ligação covalente é o método mais interessante para a indústria [38]. Este método de imobilização consiste na retenção da enzima na superfície do suporte pela formação de ligações covalentes. As moléculas de enzima se ligam ao suporte através de certos grupos funcionais, tais como amino, carboxila, hidroxila, e grupos sulfidrilos.

A seleção das condições para imobilização por ligação covalente é mais difícil do que em outros métodos de ligação enzima-suporte. Para alcançar eficiente ligação à funcionalidade do suporte e da enzima, deve-se fazer a ativação do suporte antes da imobilização. Os grupos funcionais do suporte são geralmente ativados utilizando reagentes químicos, tais como, brometo de cianogênio, carbodiimida, e glutaraldeído [39].

As condições de reação requeridas para a formação dessas ligações geralmente não são brandas. Em alguns casos, a ligação altera a estrutura conformacional da enzima e o centro ativo da mesma, resultando em diminuição da atividade e mudança de especificidade de substrato. Por outro lado, como a ligação covalente é forte, a enzima imobilizada é estável e não ocorre perda da enzima para a solução, e assim pode influir na alta resistência a temperaturas, a agentes desnaturantes e a solventes orgânicos em geral [37].

A grande variedade de processos covalentes de imobilização e de matrizes com grupos químicos capazes de participarem diretamente ou serem ativados para formar as ligações, faz desse método uma aplicação quase geral. A maior dificuldade é o conhecimento da estrutura da enzima, o que dificulta o estabelecimento de uma regra geral para a imobilização. Dentre os 20 aminoácidos encontrados na estrutura proteica da enzima, os mais reativos para a formação da ligação covalente com o suporte são lisina, cisteína, tirosina e histidina [40].

1.3.2.1 Ligação covalente multipontual

A ligação covalente multipontual consiste na imobilização e estabilização da enzima através da formação de ligação covalente entre grupos amino da enzima ($-NH_2$), e grupos aldeído do suporte. Esses grupos aldeído que se encontram ligeiramente afastados da superfície do suporte, são introduzidos através de sua ativação prévia, e tornam o suporte fortemente eletrofílico para se ligar aos grupos doadores de elétrons dos aminoácidos da superfície da enzima. O ligeiro distanciamento dos grupos aldeído provocado pela ativação permite a formação de ligações multipontuais – bases de *Schiff* - entre enzima e suporte, ligações adicionais que são menos estáveis, porém que aumentam consideravelmente a estabilidade do derivado obtido, em relação à enzima livre [29, 41].

Guisán (1988) apontou as razões para escolher os grupos amino dos resíduos de lisina da enzima e o grupo amino terminal para a imobilização multipontual em suportes ativados. Primeiro, porque a maioria das enzimas apresentam muitos resíduos de lisina que não estão envolvidos no centro catalítico. Segundo, porque os grupos amino são polares e geralmente expostos ao meio na superfície da enzima. *Guisán* (1988) ainda afirma que a ligação unipontual enzima-

suporte é reversível, mas a imobilização torna-se irreversível quando ocorre através de dois ou mais pontos de ligação.

A ligação covalente multipontual promove o enrijecimento da estrutura da enzima imobilizada e reduz mudanças conformacionais envolvidas na sua inativação, conforme apresentado na **Figura 1.7** [42, 43]. A imobilização de enzimas com ligação covalente multipontual tem sido citada por diversos autores, como uma maneira de aumentar a estabilidade em relação à enzima livre [29, 44, 45], sendo também capaz de alterar a especificidade e seletividade.

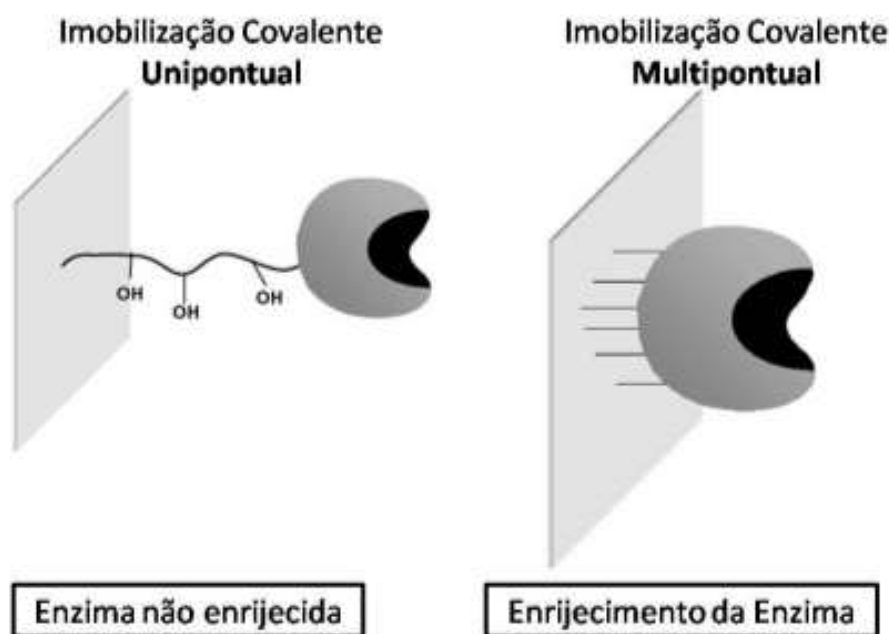


Figura 1.7: Efeito da imobilização na estabilidade da enzima [29].

1.3.3 Ligação Cruzada

Além de enzimas imobilizadas em diversos suportes, estudos têm sido realizados objetivando a obtenção de enzimas livres de suporte. Tais biocatalisadores são obtidos utilizando o método de imobilização por ligação cruzada direta em diferentes preparações como enzima dissolvida, enzima cristalizada, enzima liofilizada e enzimas fisicamente agregadas [46].

A ligação cruzada é um método livre de suporte e as enzimas estão ligadas umas às outras ou a proteínas inativas (gelatina, albumina), formando uma estrutura

tridimensional complexa. Pode ser obtida via métodos físicos ou químicos. Quando obtidas por métodos químicos são resultantes das ligações covalentes entre as enzimas e são favorecidas pelo uso de agentes bi ou multifuncionais, obtendo-se uma enzima quase pura [47].

Entre os agentes de ligação cruzada mais usados está o glutaraldeído, que induz a autoreticulação das enzimas, resultando assim, na formação de uma rede tridimensional de moléculas de enzima como pode ser observado pelo mecanismo de reação apresentado na **Figura 1.8** [37].

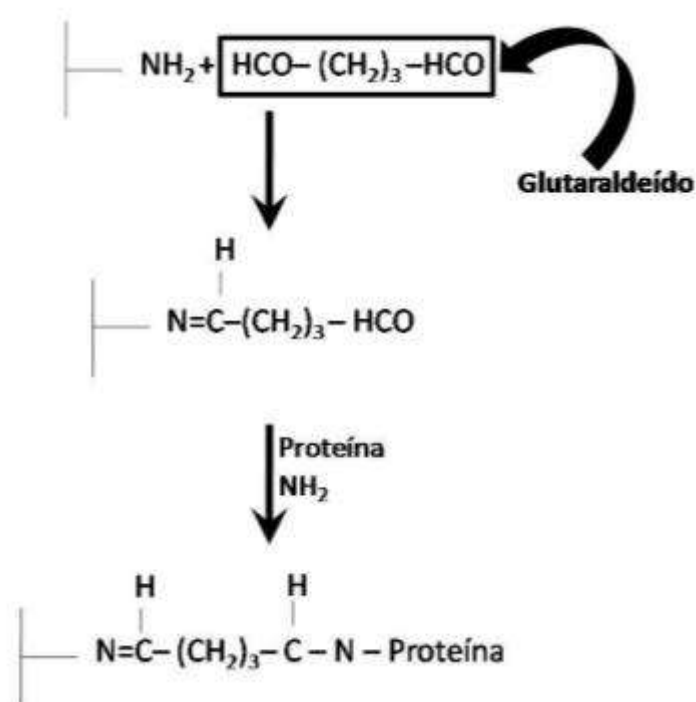


Figura 1.8: Mecanismo de reação de *cross-linking* com glutaraldeído [48].

Como desvantagem do método está à necessidade de grande quantidade de enzima, resultando em baixas retenções da atividade e baixa estabilidade mecânica, o que dificulta sua aplicação industrial, além de pouca reprodutibilidade. Como alternativas ao método convencional foram desenvolvidos os métodos por ligação cruzada utilizando-se de enzimas cristalinas (CLEC - cross-linked enzymes crystals) e o método de formação de agregados físicos, por precipitação, e subsequente entrecruzamento (CLEAs - cross-linked enzyme aggregates) das enzimas do agregado [47]. O uso dos CLEAs tem atraído a atenção, por sua simplicidade, extensa aplicação, alta estabilidade e preservação da atividade [49, 50].

Alguns fatores influenciam na retenção de atividade e de estabilidade das enzimas imobilizadas por ligação cruzada, tais como o meio de imobilização, a natureza e a quantidade dos agentes ligantes e precipitantes utilizados, temperatura, pH e força iônica. Como não há presença de suportes, as enzimas se suportam em seus aglomerados, o que tornam aquelas que ficam no centro do aglomerado inativas. Essa perda de atividade para formar aglomerados faz com que esta técnica tenha baixa atividade recuperada. Apesar de terem elevada estabilidade a altas temperaturas e a solventes orgânicos, os aglomerados possuem baixa estabilidade mecânica, além de baixa reprodutibilidade, visto que as interações ocorrem ao acaso [39, 46].

Algumas aplicações industriais tem se restringido ao uso de ligações cruzadas combinado com outros métodos de imobilização, como por exemplo, a ligação iônica seguida de ligação cruzada entre as moléculas da enzima com glutaraldeído, é realizada para melhorar a estabilidade da proteína imobilizada e para obter enzimas imobilizadas com maior atividade [29, 39].

1.4 Urease

As ureases (ureia amidohidrolases; EC 3.5.1.5) são enzimas dependentes de níquel, que catalisam a reação de hidrólise da ureia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono, como mostrado na **Figura 1.9**. Apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias, mas não são sintetizadas por animais [51].

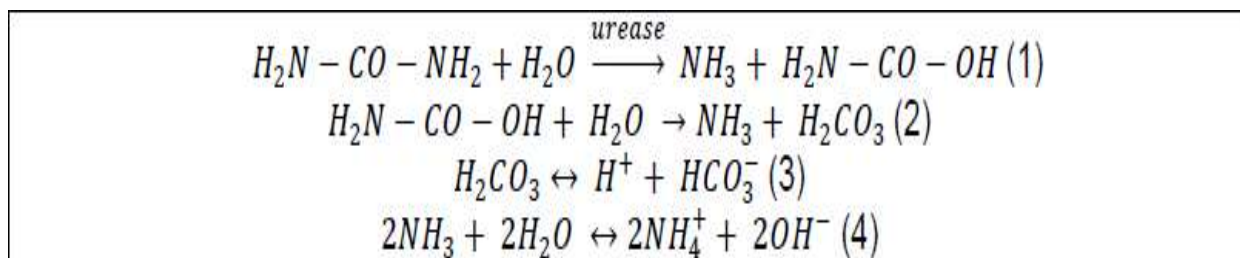


Figura 1.9: Esquema de hidrólise da ureia catalisada pela enzima urease (1), reação à clivagem da ureia, pela urease, produzindo uma molécula de amônia e uma de ácido carbâmico (2); a decomposição espontânea do ácido carbâmico em amônia e ácido carbônico (3); a hidrólise do ácido carbônico, que se tornam protonadas, gerando íons amônio e hidroxila (4) [52].

A **Figura 1.10** mostra a molécula da urease composta por histidinas e coordenada por dois átomos de Ni. A estrutura cristalina do centro ativo da urease contém duas moléculas de água e é coordenada a um grupo-OH. A especificidade da enzima está intimamente relacionada à forma do seu centro ativo.

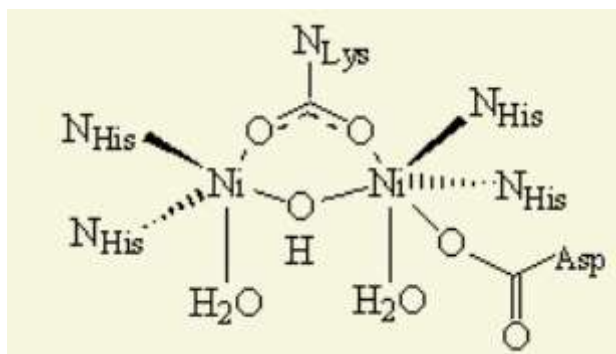


Figura 1.10: Molécula de urease.

De acordo com a molécula da urease, o primeiro centro metálico de Ni da urease é coordenado a dois átomos de nitrogênio histidínicos e a um átomo de oxigênio do aminoácido lisina. A ureia coordena-se durante a reação de catálise na posição, provavelmente ocupada por uma molécula de água. A esfera de coordenação do segundo átomo de Ni é composta por dois átomos de nitrogênio histidínicos e por três átomos de oxigênio, sendo dois deles provenientes de resíduos dos aminoácidos aspartato e lisina e um proveniente de uma molécula de água [54, 55].

Um dos mecanismos propostos para a catálise da ureia pela urease está mostrado na **Figura 1.11**, onde ocorre a eliminação de duas moléculas de H_2O pela urease. Em seguida, o átomo de Ni (1) polariza o grupo carbonila da ureia e ativa o carbono para um ataque nucleofílico. O átomo de Ni (2) liga-se um grupo-OH por meio do ataque do grupo-OH ao carbono parcialmente positivo da carbonila da molécula de ureia. O grupo amina, NH_2 , da ureia é protonado pela histidina e é eliminado, formando ácido carbâmico que, por sua vez, forma amônia e CO_2 [56], de acordo com a reação da **Figura 1.11**.

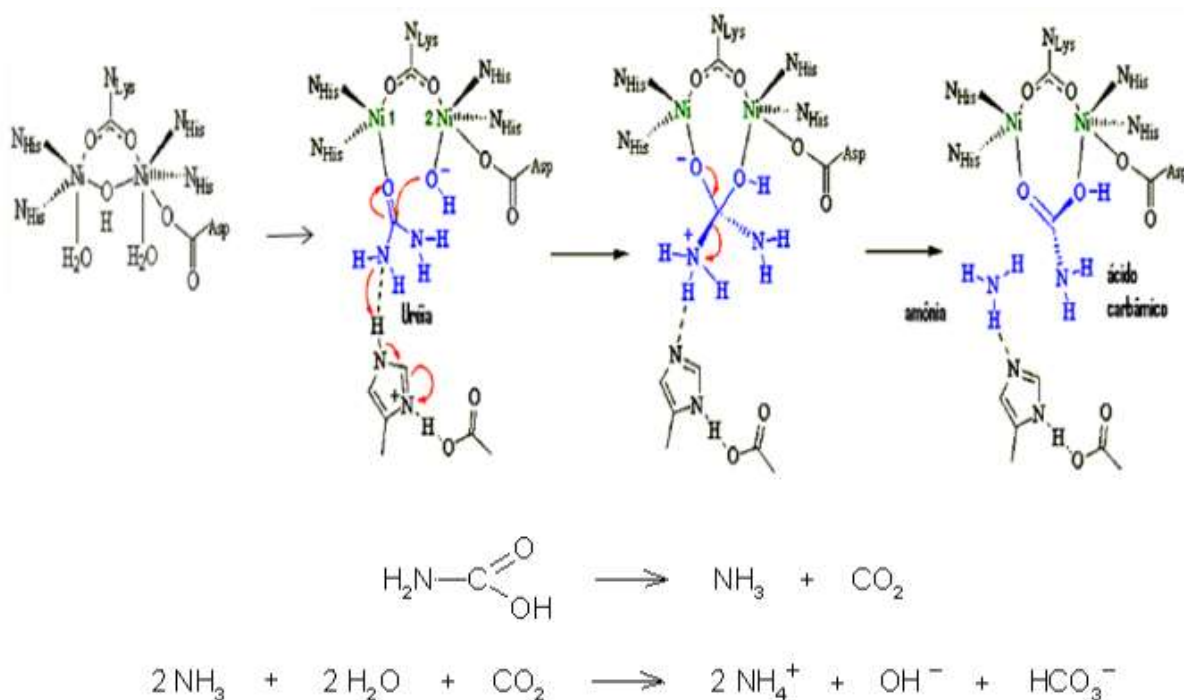


Figura 1.11: Mecanismo de catalise da ureia pela urease.

Tanto a ureia quanto a urease representam marcos importantes na história da Bioquímica. A ureia foi isolada da urina humana em 1773, por Hillaire Rouelle, e foi à primeira molécula orgânica a ser sintetizada a partir de compostos inorgânicos, por Wöhler, em 1828 [57]. Em 1926, James B. Sumner cristalizou a urease a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (*jackbean* ou feijão-de-porco) sendo este trabalho de importância fundamental ao demonstrar, pela primeira vez, que enzimas são proteínas e que podem ser cristalizadas. O trabalho pioneiro de *Sumner* foi reconhecido com o Prêmio Nobel em Química de 1946, pela “descoberta de que enzimas podem ser cristalizadas”. A urease do feijão-de-porco fez história novamente em 1975, quando o grupo de *Burt Zerner* demonstrou que a enzima possuía íons de níquel em seu sítio ativo, essenciais para catálise, tendo sido essa a primeira demonstração de um papel biológico para o níquel [57].

Atualmente a urease é utilizada em procedimentos de diagnósticos clínicos, na determinação de ureia em fluídos biológicos como urina e sangue. A hidrólise da ureia, empregando essa enzima como biocatalisador, na temperatura de 20°C, é até 1014 vezes mais rápida que a hidrólise realizada em meio ácido a uma temperatura de 60 °C [58]. A urina humana é constituída de 2 a 5% em ureia. Essa é a forma utilizada pelo metabolismo do organismo para eliminar os resíduos nitrogenados

indesejáveis produzidos a partir das proteínas. Atualmente, a ureia é utilizada como suplemento na alimentação de animais, na agricultura (como fertilizante), na fabricação de plásticos, na indústria farmacêutica, entre outros [59].

1.5 Síntese e preparação dos nanotubos de Dióxido de Titânio

Após as sínteses dos nanotubos de carbono, outros tipos de nanotubos começaram a ser sintetizados com sucesso, dentre eles os nanotubos de dióxido de titânio. No ano de 1996, *Hoyer* apresenta os primeiros registros de síntese de nanotubos de TiO_2 por meio de um processo denominado de método de replicação [60].

Neste processo um molde de polímero adequado para a formação de nanotubos de dióxido de titânio foi obtido, a partir da estrutura que ocorre naturalmente de óxido de alumínio poroso. A estrutura tubular foi formada pela deposição eletroquímica no molde. Após a dissolução do polímero, nanotubos de dióxido de titânio foram obtidos e caracterizados. Os nanotubos obtidos, segundo o autor, possuíam o diâmetro de 70 a 100 nm [60]. O método de replicação envolve várias etapas, o tornando difícil, de alto custo e gerando somente nanotubos de grande comprimento [61]. A **Figura 1.12** trata-se de uma microscopia dos nanotubos de dióxido de titânio sintetizados por *Hoyer*.

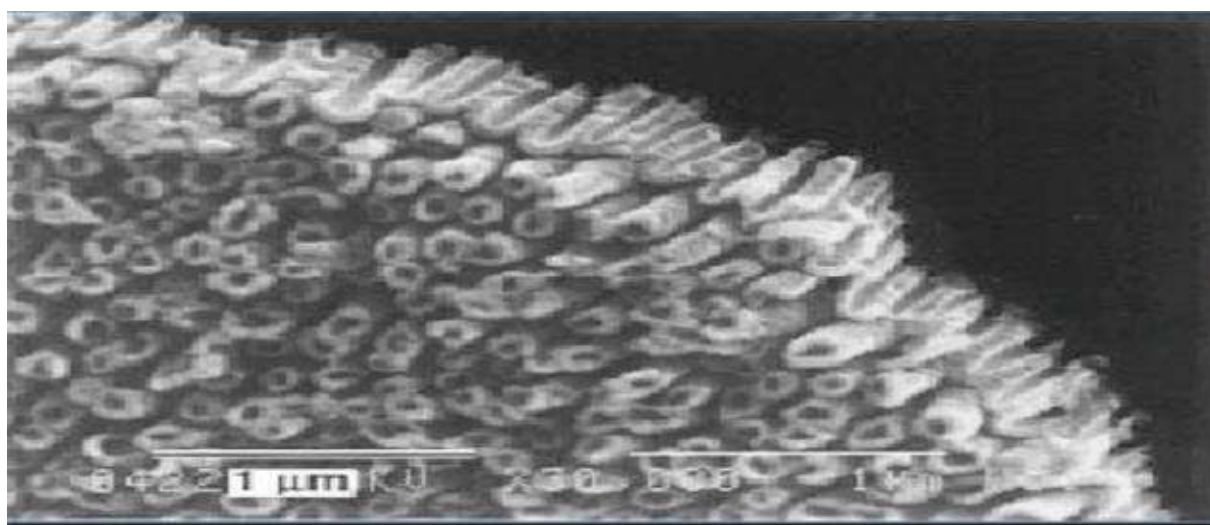


Figura 1.12: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos nanotubos de TiO_2 sintetizados [60].

Após dois anos a publicação de Hoyer, Kasuga e colaboradores no ano de 1998 conseguiram sintetizar nanotubos de TiO_2 a partir do rutilo. Utilizando uma solução de hidróxido de sódio a uma temperatura de 110°C seguido por uma lavagem com solução de ácido clorídrico [62]. Esta síntese realizada por Kasuga [62] é denominada de síntese hidrotérmica. O processo de síntese hidrotérmico, segundo Bavykin, passa pelos estágios de esfoliamento de multicamadas nanométricas, desbalanceamento na espessura de multicamadas causando a curvatura por tensão mecânica [63]. Este tipo de síntese tem sido bastante utilizado por vários pesquisadores. Yao e colaboradores no ano de 2002, a partir da anatase produziu nanotubos de TiO_2 com aproximadamente 10 nm de diâmetro [64]. Yuan e colaboradores em 2004 sintetizaram nanotubos de 8 a 10 nm de diâmetro e de 10 a 100 nm de comprimento [65]. Segundo Wu e colaboradores em 2005, por meio da síntese hidrotérmica perceberam a formação de nanotubos de multicamadas (multiwalls) de diâmetro de 8 a 12 nm e comprimentos de 200 a 1000 nm [66]. A **Figura 1.13**, mostra nanotubos de dióxido de titânio obtidos através da síntese hidrotérmica.

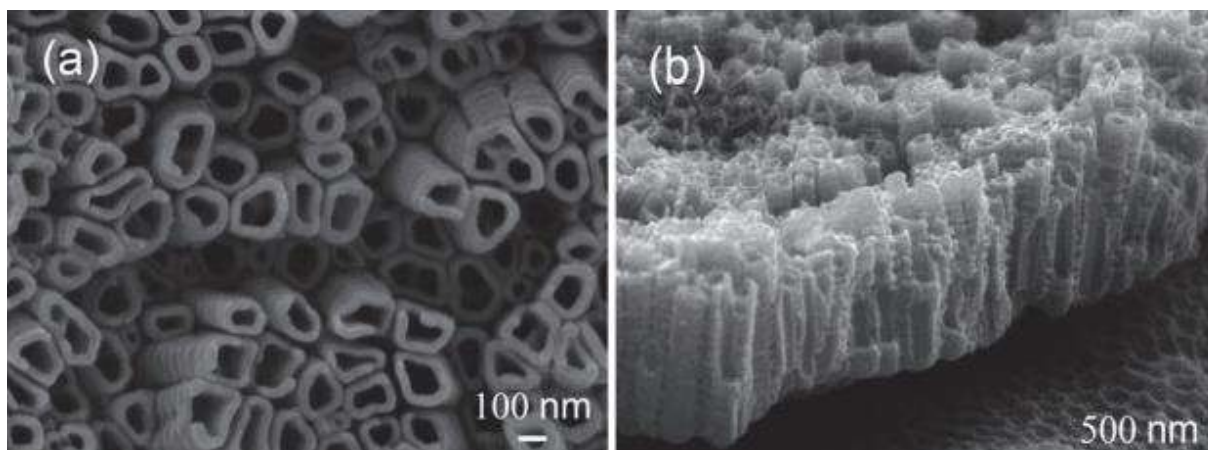


Figura 1.13: MEV de nanotubos de dióxido de titânio obtidos a partir da síntese hidrotérmica: (a) Vista superior (b) Vista lateral. Adaptada de [66].

Além do processo hidrotérmico, outras rotas de síntese são citadas em pesquisas com a finalidade de formar os nanotubos de TiO_2 , dentre elas o método *template* ou também chamado como método sol-gel [67, 68]. Kang consegue a síntese de nanotubos bem alinhados com 295 nm de diâmetro e 6000 nm de

comprimento. Outro método que é citado na área é o de oxidação anódica citado por Macak [69], utilizado também por Zhang que consegue promover a síntese de nanotubos de TiO_2 com aproximadamente 100 nm de diâmetro, segundo o autor utilizando eletrólitos de ácido fluorídrico e ácido fosfórico [70]. A **Figura 1.14**, mostra nanotubos formados a partir do método *template* (sol-gel).

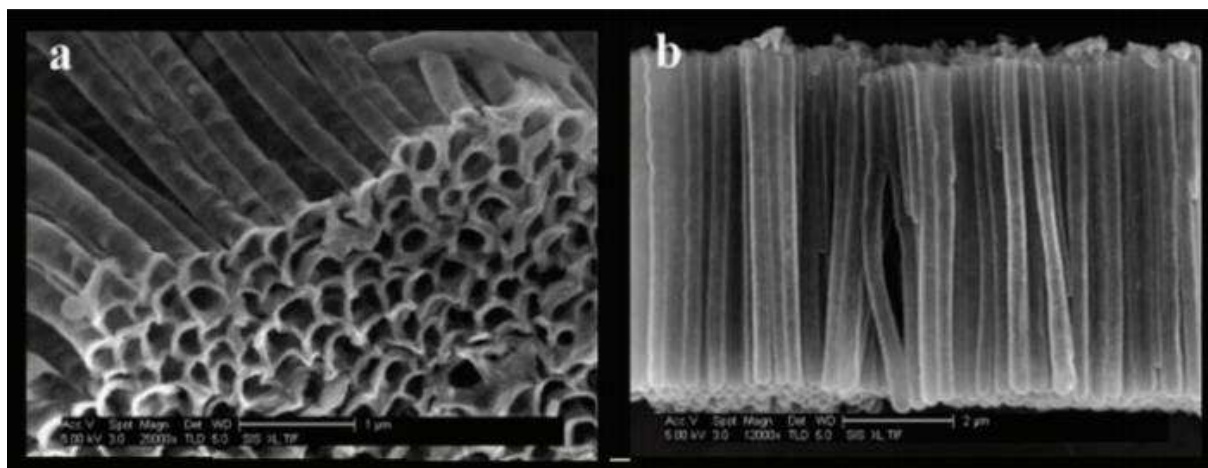


Figura 1.14: MEV de nanotubos de TiO_2 após a síntese pelo método *template* (sol-gel) (a) Imagem lateral, visualizando uma extremidade aberta dos nanotubos de TiO_2 (b) Imagem superior dos nanotubos de TiO_2 [67].

1.6 Uso de nanoestruturas em biossensores

Durantes anos os biossensores amperométricos baseados em enzimas tem passado por muitas transformações a procura de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Assim, muitas das pesquisas têm como foco a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo. Os biossensores de primeira geração apresentavam problemas de interferentes devidos à necessidade de potenciais muito altos. Com o intuito de diminuir estes potenciais, surgiram os biossensores de segunda geração, empregando mediadores. No entanto, esta configuração, muitas vezes, apresenta problemas de interferentes, podendo facilitar a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato [71]. Para superar estes problemas, estudos apontam um desafio importante no desenvolvimento de biossensores amperométricos enzimáticos, que é estabelecer uma comunicação elétrica direta entre o centro redox da enzima e o eletrodo, sendo esta caracterizada

como a terceira geração de biossensores [72]. Desta forma, foi proposta uma nova configuração de biossensores amperométricos nanoestruturados, em que a enzima é imobilizada em materiais nanoestruturados. Menores limites de detecção podem ser conseguidos por melhorar a estabilidade da enzima, além de operar em um potencial mais próximo do potencial redox da enzima, dando assim, uma menor exposição a reações com interferentes [72, 73].

Materiais nanomateriais, como nanopartículas nanofibras e nanotubos podem servir com um excelente material suporte para imobilização de enzimas, pois oferecem características ideais para manter a estabilidade da enzima, mantendo-a ativa, além de aumentar o desempenho dos dispositivos de detecção. Dentre estas características, citam-se a alta área específica, baixa resistência à transferência de massa, biocompatibilidade, propriedades elétricas, mecânicas e térmicas [29].

As nanoestruturas elevam a reatividade eletroquímica das biomoléculas e promovem aumento na transferência direta de elétrons entre o centro redox de proteínas e a superfície do eletrodo [72]. Ressalta-se, também, que as nanoestruturas são fundamentais para a função e integração de alta densidade em dispositivos em nanoescala. Consequentemente, eles são o foco de intensas pesquisas em sensoriamento, optoeletrônica e outras aplicações devidas às suas propriedades únicas. Por causa de sua alta relação superfície-volume e facilidade no transporte de elétrons, suas propriedades elétricas são fortemente influenciadas por perturbações mínimas no sistema. Esta propriedade fornece aos biossensores rapidez na detecção eletrônica direta, além de sensibilidade na detecção [72].

1.6.1 Nanotubos de titânio

O titânio é o nono elemento mais abundante na Terra e o TiO_2 (dióxido de titânio) é o composto mais comum do titânio [73]. Este material tem atraído muita atenção nos últimos tempos devido as suas interessantes propriedades ópticas, elétricas, eletroquímicas e de catálise. Exemplos da utilização do TiO_2 para a catálise vão desde tratamento de esgotos e desinfecção (eliminação de bactérias) até recobrimentos inteligentes que sejam auto-limpantes. Também pode ser utilizado como eletrodos em células solares, assim como material anticorrosivo [74]. Além

disso, sua não toxicidade e sua compatibilidade com o sangue humano permite seu uso como biomaterial [75].

O TiO_2 pode ser encontrado na natureza em três fases estruturais: anatase (tetragonal), rutilo (tetragonal) e bruquita (ortorrômbica). Elas diferem no modo como as unidades octaédricas se arranjam como pode ser observado na **Figura 1.15** [76]. Uma unidade octaédrica é o bloco básico da estrutura do TiO_2 , formado por um átomo de titânio envolvido por 6 átomos de oxigênio.

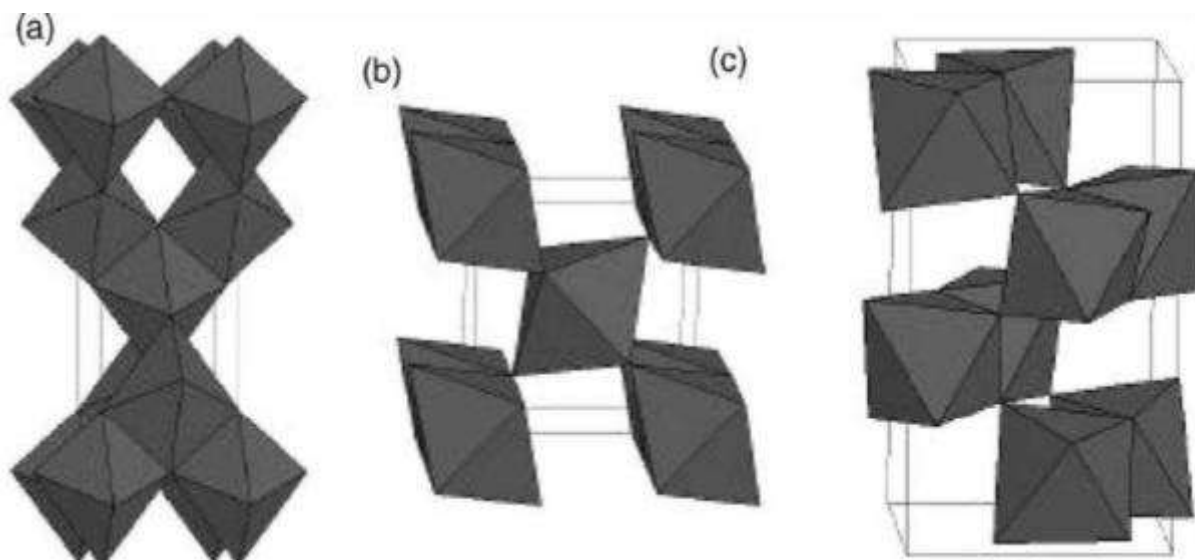


Figura 1.15: Estrutura cristalina do TiO_2 nas fases a) anatase, b) rutilo, c) bruquita [76].

1.6.1.1 Nanoestruturas

Como resultado de grandes esforços ao longo dos anos vários tipos de nanomateriais e nanoestruturas artificiais têm sido produzidos com um grau de controle cada vez maior. O aprimoramento e aumento da acessibilidade de técnicas de caracterização como, por exemplo, os microscópios eletrônicos, têm permitido um maior entendimento destas propriedades da matéria na escala nanométrica e proporcionado um grande auxílio no processo de síntese desses materiais.

As nanoestruturas podem apresentar diversas morfologias incluindo estruturas aproximadamente esféricas (nanopartículas), estruturas filamentosas (nanofios, nanofitas, etc), e lamelares (nanofolhas). Em particular, as nanoestruturas (quase-) unidimensionais (1D) como fios, bastões, fitas e tubos, podem ser

consideradas como sistemas ideais para o estudo dos efeitos da redução de dimensionalidade e confinamento quântico em propriedades de transporte eletrônico e térmico. Além disso, devido a tendência de redução contínua do tamanho dos dispositivos eletrônicos visando o aumento de seu desempenho e redução de custos, nanoestruturas 1D surgem como candidatas a unidades básicas para a fabricação dos mesmos [77, 78]. A combinação de uma alta área superficial com um transporte elétrico (ou iônico) eficiente em uma direção, permite que as nanoestruturas 1D sejam utilizadas como sensores químicos e biológicos [80]. Dentre as nanoestruturas 1D, sem dúvida, as mais conhecidas e estudadas são os nanotubos de carbono [81]. Além destes, nanofios e nanotubos de óxidos semicondutores como ZnO, SnO₂ e TiO₂ também têm sido extensivamente estudados [74].

1.6.1.2 Nanoestruturas de Titânio

Nanoestruturas de TiO₂ podem ser sintetizadas por vários métodos [82], tais como o método sol-gel, síntese por combustão [83], deposição eletroquímica [88], deposição química de vapor (CVD), deposição física de vapor (PVD), anodização e tratamento hidrotérmico. Alguns destes métodos de síntese geralmente conduzem a formação de nanocristais esféricos ou similares.

Depois da descoberta dos nanotubos de carbono em 1990 [85], as nanoestruturas unidimensionais passaram a ter maior relevância por representarem uma nova classe de materiais com propriedades diferenciadas. Logo, vários grupos de pesquisa empenharam-se em preparar não apenas nanotubos a base de carbono, mas também baseados em outros materiais como os óxidos de titânio.

Em 1996, foi demonstrada uma técnica de síntese de nanoestruturas de TiO₂ utilizando nanoporos de alumina para formação de moldes que serviriam como guias na deposição eletroquímica de TiO₂, resultando em nanotubos de 70-100 nm de diâmetro interno [86]. Porém, o método de síntese por moldes é muito complexo e dispendioso, pois estes moldes necessitam ser destruídos ao final do processo de formação dos nanotubos, tornando-se inviável economicamente. Já em 1998, *Kasuga* e colaboradores [87], demonstraram uma alternativa simples e eficiente para a produção de nanoestruturas 1D baseadas em TiO₂. O método proposto baseia-se

no tratamento hidrotérmico do dióxido de titânio em uma solução altamente alcalina (NaOH), assim são submetidos a um aquecimento sob pressão por um longo período de tempo [87]. O material resultante possuía morfologia bastante regular, consistindo de tubos com diâmetro de 7 a 10 nm e comprimentos da ordem de 100 nm. Tal trabalho pioneiro abriu as portas para muitos outros que têm investigado tanto a caracterização das nanoestruturas produzidas e os mecanismos envolvidos na síntese bem como a aplicação das mesmas.

Diversos trabalhos investigaram o papel dos parâmetros relevantes do processo de síntese tais como temperatura, duração do tratamento, concentração da solução alcalina, fase do TiO_2 utilizada como matéria prima, processos de lavagem e neutralização do material produzido, etc [87, 91]. Descobriu-se que tanto o rendimento do processo bem como a morfologia e a estrutura cristalina dos materiais resultantes são extremamente sensíveis aos parâmetros do processo. Por exemplo, a grande maioria dos autores reportaram que os melhores rendimentos na formação de nanotubos de TiO_2 são obtidos com concentrações de solução alcalina (NaOH) em torno de 10-15 M e com temperaturas entre 110 e 180 °C. Alguns autores relatam que temperaturas mais altas podem levar a formação de outras estruturas como nanofitas e nanofios [91, 92].

Em todo caso, as condições experimentais são extremamente importantes na definição do produto final em qualquer tipo de síntese. Sabemos que, para reproduzir algo experimentalmente, deve-se recriar as mesmas condições as quais foram submetidas ao experimento escolhido para reprodução. Devido a isso, alguns resultados na literatura aparecem em relativo confronto.

Kasuga [87] originalmente propuseram que, após a reação de síntese pelo método hidrotérmico, o produto obtido era amorfo e somente após a lavagem ácida de 0.1 M de HCl em água destilada é que os nanotubos seriam formados. Mais tarde esta proposta foi largamente questionada, por exemplo, *Sun* e *Li* [88] não usaram neutralização com ácido na lavagem, mas sim com etanol, alegando que esta mudança poderia influenciar a morfologia final do material, porém constataram que o estado final obtido era de nanotubos. Além de outros autores que constataram que a lavagem apenas com água também resultava na formação de nanotubos de TiO_2 .

Apesar de todos os trabalhos já publicados, os mecanismos de formação dos nanotubos de titânio ainda não foram totalmente elucidados. Sabe-se que a combinação de alta pressão e temperatura potencializam o caráter corrosivo dos íons OH^- em solução, propiciando a dissolução do TiO_2 que é transformado de algum modo nas nanoestruturas. Alguns trabalhos sugerem que inicialmente pequenas camadas em forma de folhas se desprendem dos grãos de TiO_2 e depois se enrolam formando os tubos. Já outros autores acreditam que os tubos são formados diretamente a partir de íons de TiO_3 em solução. Independente dos mais variados tipos de nanoestruturas sintetizados, sempre se procura uma aplicabilidade posterior, sendo que neste trabalho procura-se a aplicação em biossensores de ureia.

2. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e preparar nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2), para confecção de biossensores para detecção de ureia.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese e preparo de nanotubos de dióxido de titânio (TiO_2) através do tratamento hidrotérmico;
- Explorar as propriedades estruturais dos nanotubos de TiO_2 ;
- Imobilização da enzima urease para confecção dos biossensores.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Síntese

3.1.1 Síntese para obtenção dos nanotubos de dióxido de titânio (NTiO_2)

A síntese ocorreu nos laboratórios de Química Geral, Química Orgânica e no laboratório do prédio do Mestrado da Universidade Federal de São João Del Rei, *campus* Alto Paraopeba (UFSJ/CAP). Os nanotubos de dióxido de titânio foram sintetizados a partir de uma solução de hidróxido de sódio 10 mol/L. A solução contendo o hidróxido de sódio e o óxido de titânio foi colocada numa autoclave por 54 horas a aproximadamente 190°C. Após as 54 horas dentro da autoclave a solução de cor branca foi retirada e levada até uma estufa por 72 horas (3 dias), sendo que a temperatura em cada um dos dias foi de 80°C, 80°C e 60°C, respectivamente. Após três dias na estufa, a solução foi retirada, resfriada, lavada com água destilada e colocada sob agitação em uma solução de HCl (38 mL) pH 2,08 por 4 horas. Após a neutralização, a solução foi filtrada novamente e por fim levada a uma estufa a 50°C até sua completa secagem. O resultado final foi um pó bem fino de coloração branca. A **Figura 3.1** mostra o sistema montado para o uso da autoclave: base indutora para aquecimento, termômetro para o controle da temperatura, recipiente externo contendo glicerina e a autoclave devidamente vedada.



Figura 3.1: Esquema montado para o uso da autoclave.

O material foi caracterizado utilizando a microscopia eletrônica de varredura e a técnica de difração de raios-X e voltametria cíclica como será demonstrado no tópico Resultados e Discussão.

3.2 Confeção dos Filmes

A confecção dos filmes ocorreu nos laboratórios de Química Geral, Química Orgânica e no laboratório do prédio do Mestrado da Universidade Federal de São João Del Rei, *campus* Alto Paraopeba (UFSJ/CAP). Utilizou-se para o estudo eletroquímico o material ITO/PET para confecção dos filmes a serem imobilizados. O ITO (óxido de índio dopado com estanho) é um substrato amplamente utilizado devido às suas duas principais características: condutividade elétrica e transparência óptica. Os filmes foram cortados com dimensões iguais de aproximadamente 1 cm x 3 cm, sendo que a cobertura com o material de trabalho foi feita em uma área de 1 cm x 1 cm.

3.2.1 Rota de Imobilização

Neste trabalho utilizou-se a seguinte rota de imobilização da urease via ligação covalente cruzada com o óxido condutor, segundo procedimento abaixo:

- Os filmes ITO/PET previamente cortados foram pesados para que fosse feito o desconto da massa ao final. Com o auxílio de uma balança analítica foram pesados por volta de 0,02 g de NTiO_2 e, em seguida, foi feito o depósito deste sob uma área de aproximadamente 1 cm x 1 cm. Devido ao fato de o NTiO_2 ser um material em pó foi necessário adicionar 1 gota de Nafion® e misturar bem até se formar uma pasta homogênea e que recobrisse toda a área utilizada do ITO/PET. Os filmes foram secos em temperatura ambiente.
- Para a imobilização da enzima foram preparadas primeiramente três diferentes concentrações de solução contendo a enzima urease. Para o preparo no eletrólito foram utilizados ureia (A: 0,5 mg; B: 1,0 mg e C: 1,5 mg), PBS (1 mL) e, no eletrodo de trabalho, sobre o NTiO_2 , foi imobilizada a urease

(A: 0,5 mg; B: 1,0 mg e C: 1,5 mg). Em seguida, com o auxílio de um gotejador, foi feito o depósito das soluções contendo a enzima urease com suas respectivas concentrações A, B e C sob os ITO/PET. Por fim, após as soluções serem gotejadas nos filmes ITO/PET/NTiO₂, os mesmos foram secos em temperatura ambiente – o tempo de secagem dos filmes foram de 15 a 20 minutos. Devido a essa rapidez não houve a necessidade de levá-lo ao refrigerador para a secagem e a preservação da atividade enzimática da urease.

Inicialmente foi preparado uma solução de fosfato de sódio (PBS) pH=7,0 usando como referência o procedimento descrito por Cold Spring Harbor Laboratory Press [97]. Para o preparo da solução tampão foram adicionados fosfato monossódico (NaH₂PO₄) e fosfato dissódico (Na₂HPO₄) ambos em concentração 1,0 mol/L em água destilada seguida de agitação até total diluição. Porém, dentro de alguns dias chegou uma nova solução tampão, pH 7,0 (Fluka) e, então todos os trabalhos passaram a ser feitos usando o novo PBS.

Para controle dos filmes confeccionados, as massas de cada solução adicionada foram anotadas, feito no final o desconto da massa do ITO/PET como é mostrado na Tabela 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 - Massa (g) dos filmes ITO/PET/TiO₂ montados.

Filmes	ITO/PET (g)	ITO/PET/ TiO₂ (g)	Massa descontada (g)
1	0,0904	0,1111	0,0207
2	0,0936	0,1139	0,0203
3	0,0923	0,1150	0,0227

Tabela 3.2 - Massa (g) dos filmes imobilizados Urease/PBS.

Filmes	Urease/PBS	ITO/PET/ TiO₂	Imobilização Urease/PBS	Massa descontada (g)
1	1 gota	0,1111	0,1112	0,0001
2	2 gotas	0,1139	0,1147	0,0008
3	3 gotas	0,1150	0,1164	0,0014

Foram confeccionados três filmes ITO/PET/TiO₂ contendo diferentes proporções da enzima urease. No primeiro momento foi preparada a solução contendo a enzima, na qual foram usados 10 mg de urease em 1 mL de PBS (tampão fosfato). No filme 1 da Tabela 3.2 foi colocada uma gota da solução contendo a enzima, o que corresponde a 0,5 mg de urease/0,5 mg de ureia. No filme 2 da Tabela 3.2 foram colocadas duas gotas da solução correspondendo a 1,0 mg de urease/1,0 mg de ureia e, por fim, no filme 3 da Tabela 3.2, foram adicionadas três gotas da solução correspondendo a 1,5 mg de urease/1,5 mg de ureia. O intuito em variar a concentração da enzima sob o filme era de observar da melhor forma o comportamento da enzima imobilizada sob o filme.

3.3 Métodos de Caracterização

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é uma técnica de caracterização morfológica que é capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície da amostra. Devido à maneira com que as imagens são criadas se tornam úteis para avaliar a estrutura superficial da amostra.

Devido ao fato de a universidade (UFSJ – Campus Alto Paraopeba) não possuir o equipamento de alta resolução, foi necessário realizar a caracterização em parceria com o DF/FFCLRP-USP.

3.3.2 Difração de Raios-X

Para as análises da amostra de NTiO₂ foi utilizado o Difratorômetro de Raios-X de bancada da marca Rigaku, modelo MiniFlex. Para tal procedimento foi usado uma tensão de 30 kV, corrente de 10 mA, velocidade de 1 grau por minuto e intervalo de 2 a 70 graus, sendo que os difratogramas obtidos são posteriormente analisados pelo software PDXL (*Integrated X-ray powder diffraction*) [98].

3.3.3 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica é uma das técnicas mais convencionais de caracterização eletroquímica, sendo uma das mais versáteis técnicas eletroanalíticas para estudo de espécies eletroativas. Utilizada na eletroquímica de estado sólido, a voltametria cíclica permite a observação dos processos de oxidação e redução que ocorrem nos sítios localizados na estrutura do material eletroquimicamente ativo do eletrodo.

Os experimentos de voltametria cíclica foram feitos num Potenciostato/Galvonostato AutoLab III interfaciado a um computador. Foram usados três eletrodos, sendo, um eletrodo de trabalho (carbono vítreo), um eletrodo auxiliar de fio de platina e o eletrodo de referência de calomelano saturado (SCE). O eletrólito suporte utilizado foi preparado através de uma solução de ureia em solução de 0,10 mol/L, tampão de fosfato de sódio (PBS).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura

Na **Figura 4.1** são observadas as imagens de MEV em quatro diferentes magnitudes.

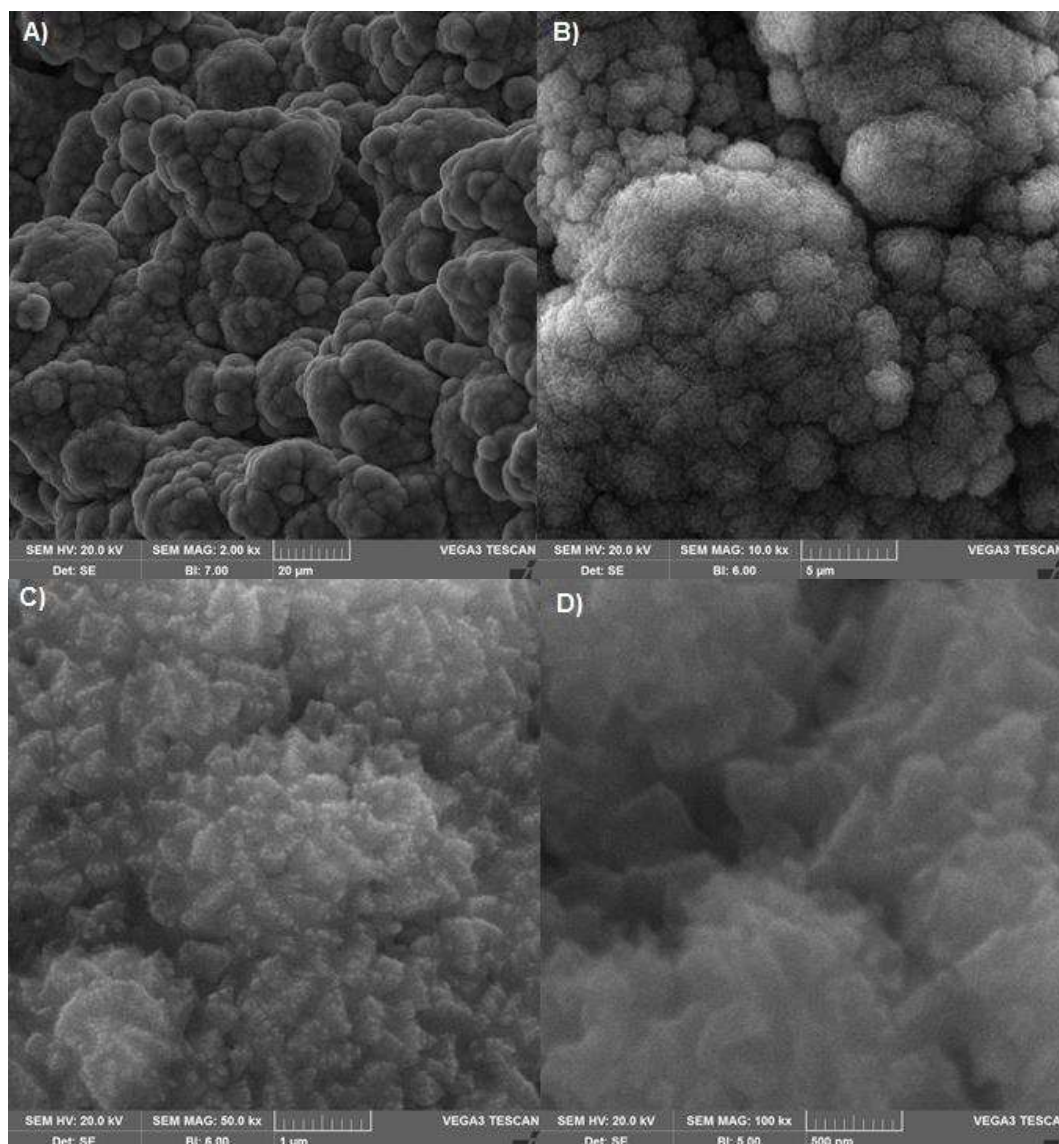


Figura 4.1: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de nanotubos de titânio em diferentes magnitudes.

Por meio das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada, é possível observar apenas a formação de aglomerados de diversas formas irregulares, não sendo possível detectar a formação de nanotubos. Diversos fatores podem ter contribuído para que isso acontecesse, como, por exemplo, o fato de que durante a síntese para a confecção dos nanotubos não foi possível atingir e nem manter constante a temperatura ótima do processo. Além disso, não foi possível chegar a altas pressões dentro da autoclave, pois a mesma apresentava alguns pontos de vazamento que muitas vezes eram imperceptíveis. Foram usados produtos como silicone, colas de motores que suportavam altas pressões e altas

temperaturas para tentar contornar os vazamentos, mas mesmo assim a pressão no interior do equipamento não atingia altos níveis. Dessa forma, a síntese para a confecção dos nanotubos de titânio foi, sem dúvida, a etapa mais desafiadora de todo o projeto.

A síntese foi realizada cerca de três vezes com o intuito de sanar cada vez mais os problemas e obstáculos encontrados nas sínteses anteriores. A dificuldade para se chegar a temperatura exigida na literatura (190 °C) e mantê-la por 54 horas foi o maior obstáculo encontrado. Depois de muitos testes foi possível chegar à temperatura exigida, porém por muitas vezes não se conseguiu manter essa temperatura por todo o período de tempo necessário, o que pode ser considerada uma das causas para não ter conseguido confeccionar os nanotubos, já que uma das principais características apresentadas em literatura para a produção desses materiais são as altas temperaturas durante a síntese.

Como a temperatura e a pressão estavam sendo os fatores limitantes na síntese realizada, foram feitas novas pesquisas com o intuito de encontrar uma rota alternativa a aquela que estava sendo executada. Sendo assim, foi encontrada a rota de anodização em soluções fluoradas que demonstrava ser uma das melhores técnicas para a obtenção de estruturas altamente ordenadas [28]. Pelo fato de não ter os materiais e reagentes disponíveis nos laboratórios da universidade que nos habilitasse a executar a nova síntese, foi necessário fazer a compra dos mesmos que, infelizmente, não chegaram a tempo para os novos testes.

4.2 Análises dos resultados da Difração de Raios-X

Na **Figura 4.2** está apresentado o difratograma do NTiO₂.

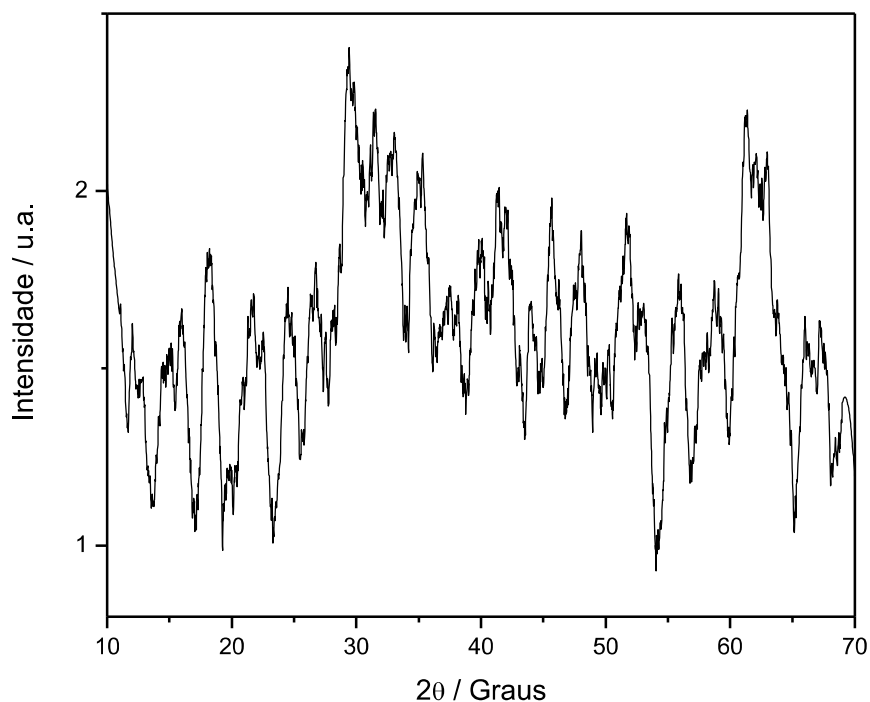


Figura 4.2: Difratoograma do NTiO₂.

A **Figura 4.2** mostra o difratograma do NTiO₂ obtido através da rota hidrotérmica. É possível observar, baseado na Figura 6, que a síntese não foi bem sucedida corroborando com o que foi observado nas imagens de MEV. Nota-se no difratograma da Figura 6, que a estrutura TiO₂ nas formas anatase e rutila não foi identificadas. Dessa forma, comparando a **Figura 4.3**, da literatura [99] com a **Figura 4.2** é possível afirmar que não houve a formação de uma estrutura que remete o objetivo proposto neste trabalho.

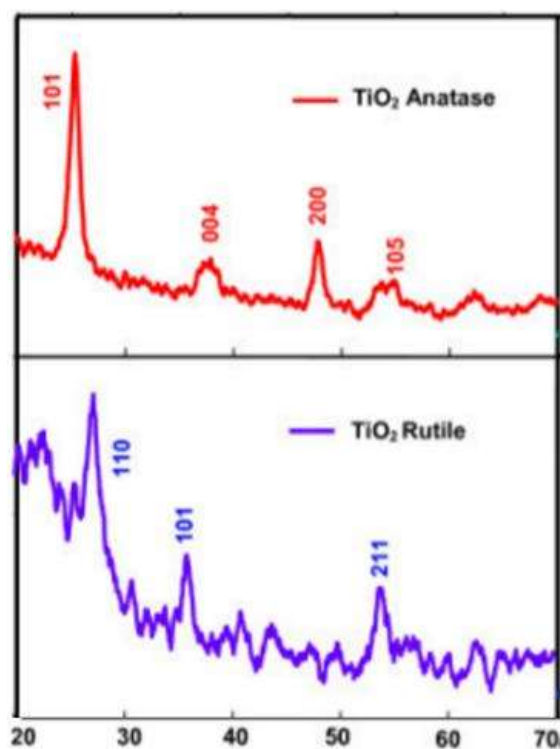


Figura 4.3: Difratoograma do TiO₂ nas estruturas anatase e rutila [99].

4.3 Estudo eletroquímico avaliado em voltametria cíclica (VC) para análise do NTiO₂.

Na **Figura 4.4** é demonstrado o voltamograma cíclico dos nanotubos de óxido de titânio.

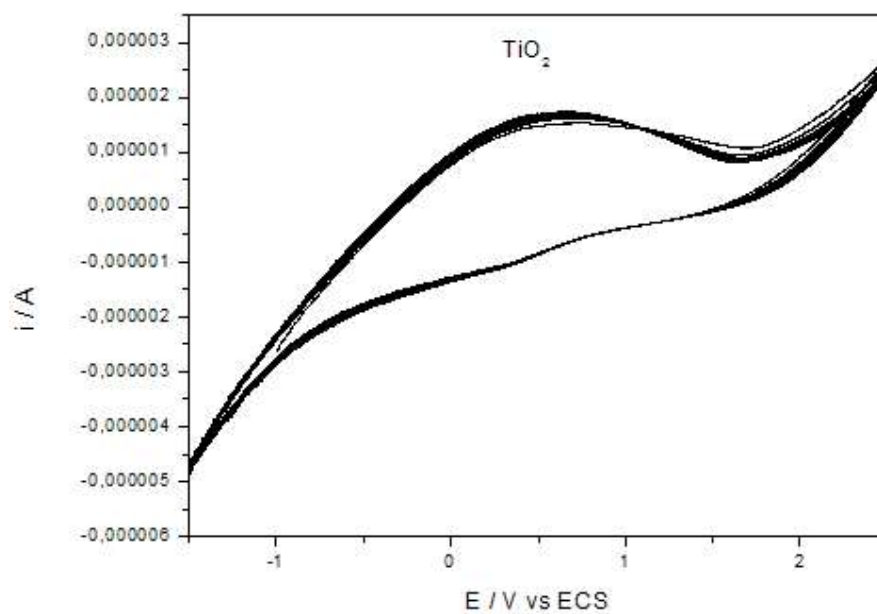


Figura 4.4: Voltamograma cíclico do NTiO₂.

Na **Figura 4.4** é possível verificar que houve transferência de carga pela presença de um pico anódico em 0,5 V e dois picos catódicos em 1,6 V e 0,4 V. Além disso, foi detectado que a voltametria cíclica do NTiO_2 é um processo irreversível.

4.3.1 Voltametria cíclica (VC) para análise do PET/ITO/ TiO_2 com a enzima urease imobilizada

Foram realizados estudos eletroquímicos utilizando a voltametria cíclica. Esses testes foram repetidos cinco vezes e em todos eles foram observados um perfil totalmente capacitivo nos filmes. Isto é, só houve o carregamento da dupla camada elétrica sem o envolvimento das transições eletrônicas do material. É possível que o Nafion[®] possa estar causando esse efeito por ser um material polimérico isolante. Outro motivo pode ser o método ou protocolo de síntese para realizar a imobilização.

De fato, será necessário ajustar diversos parâmetros que envolvem o processo de imobilização bem como de síntese de obtenção dos nanotubos de óxido de titânio. Para contornar esse desafio, um novo projeto já está sendo elaborado com a proposta de novas rotas de preparação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados demonstraram que, ainda, será necessário realizar uma nova adaptação na síntese para a preparação do NTiO_2 , pois não houve a sua formação, como observado nas imagens de MEV e no difratograma. Embora houvesse a tentativa de adaptação de uma nova síntese, os materiais para a preparação de NTiO_2 , via anodização eletroquímica, não chegaram em tempo hábil. Com o intuito de realizar a imobilização de urease no material inorgânico em questão, testes eletroquímicos de voltametria cíclica foram realizados e foi observado que o material contendo NTiO_2 /urease, em presença de ureia, apresentou um comportamento puramente capacitivo.

Diversos fatores influenciaram nesse resultado final, tais como, dificuldade em adaptar as rotas para a confecção de nanotubos encontradas em outros trabalhos,

demora na chegada de novos reagentes adquiridos, entre outros. Porém, os fatores limitantes para esse resultado foi a temperatura e a pressão.

A dificuldade para se chegar a temperatura exigida na literatura, aproximadamente 190°C, e mantê-la por 54 horas foi o maior obstáculo encontrado. Depois de muitos testes foi possível sim chegar à temperatura exigida, porém por muitas vezes não se conseguiu mantê-la por todo o período de tempo necessário, o que pode ser considerada uma das causas para não ter conseguido confeccionar os nanotubos, já que uma das principais características apresentadas em literatura para a produção desses materiais são as altas temperaturas durante a síntese. Além disso, não foi possível chegar a altas pressões dentro da autoclave, pois a mesma apresentava alguns pontos de vazamento que muitas vezes eram imperceptíveis.

Todavia, outros pontos podem ser tirados deste trabalho, como, por exemplo, a confecção de outro material condutor elétrico composto pelo dióxido de titânio e hidróxido de sódio e o grande aprendizado adquirido no decorrer dos estudos para encontrar rotas alternativas para a confecção dos nanotubos de titânio.

De modo geral foi possível mensurar o quão promissor é o desenvolvimento de materiais alinhado com os conhecimentos e estudos da biotecnologia e da eletroquímica. Esses novos materiais vêm a atingir diretamente a qualidade de vida da sociedade, e cada vez mais salienta que se devem ter investimentos a pesquisas. Conseguiu-se extrair também algumas limitações que alguns métodos de confecção podem vir a apresentar e suas aplicações em âmbito geral. O trabalho teve grande impacto no aspecto do desenvolvimento científico que nos inclina a nos dedicarmos a novos estudos e ao desenvolvimento de protótipos viáveis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FAM, D.W.H.; PALANIAPPAN, A., TOK, A.I.Y., et al., 2011, **“A review on Technological Aspects Influencing Commercialization of Carbon Nanotube Sensors”**, Sensors and Actuators B: Chemical, v. 157, n. 1, pp. 1-7.

[2] SINHA, N., MA, J., YOW, J.T.W., 2006, **“Carbon Nanotube-Based Sensors”**. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 6, n.3, pp. 573-590.

[3] FRADEN, J., 2004, **Handbook of Modern Sensors- Physics, Designs and Applications**. 3 ed. New York, Springer – Verlag.

[4] GRUNDLER, P., 2007, **Chemicals Sensors – An introduction for Scientists and Engineers**. 1 ed. Berlin, Springer – Verlag.

[5] HULANICKI, A., GLAB, S., INGMAN, F., 1991, “**Chemical Sensors Definitions and Classification**”, Pure and Applied Chemistry, v. 63, n. 9, pp. 1247-1250.

[6] LOWE, C.R., “**Overview of Biosensor and Bioarray Technologies**”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., Handbook of Biosensors and Biochips , chapter 1, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

[7] NEWMAN, J.D., TURNER, A.P. F., “Historical Perspective of Biosensor and Biochip Development”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., Handbook of Biosensors and Biochips , chapter 3, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

[8] EGGINS, B., 1997, **Biosensors, An Introduction**. 1^a ed. England, Jhon Wiley & Sons Ltd.

[9] KISSINGER, P.T., 2005, “**Biosensors- a Perspective**”, Biosensors and Bioelectronics, v. 20, n. 12, pp. 2512-2516.

[10] CASTILLO, J., GÁSPÁR, S., LETH, S., et al., 2004, **“Biosensors for Life Quality Design, Development and Applications”**, Sensors and Actuators B: Chemical, v. 102, n. 2, pp. 179-194.

[11] THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R. A., et al., 2001, **“Technical Report Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification”**, Biosensors and Bioelectronics, v. 16, n. 1-2, pp. 121-131.

[12] MATEU, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LORETE, R. **Improvement of enzyme activity, stability via immobilization techniques**. Enzyme and Microbial Technology. V. 40, p. 1451-1463, 2007.

[13] SILVA, J.S., 2010, **Biossensor Amperométrico à Base de Peroxidase em Matriz de Bastão de Grafite Comercial: Estudos Preliminares**. Dissertação M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[14] BRUCKNER-LEA, C.J., 2004, **“Biosensor Systems for Homeland Security”**, Interface, v. 13, pp. 36-41.

[15] LIMA, R.S., NUNES, G.S., NOGUER, T., et al., 2007, **“Biossensor Enzimático para Detecção de Fungicidas Ditiocarbamatos. Estudo Cinético da Enzima Aldeído Desidrogenase e Otimização do Biossensor”**, Química Nova, v. 30, n. 1, pp. 917.

[16] PADDLE, B.M., 1996, **“Review Article Biosensors for Chemical and Biological Agents of Defence Interest”**, Biosensors and Bioelectronics , v. 11, n. 11, pp. 1079-1113.

[17] MOZAZ, R.S., MARCO, M.P., ALDA, M.J.L., et al., 2004, **“Biosensors for Environmental Monitoring of Endocrine Disruptors: a Review Article”**. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 378, n. 3, pp. 588-598.

[18] SALGADO, A.M., 2001, **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. Tese de D.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[19] CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D., 2002, **“Mediated Biosensors”**, Biosensors and Bioelectronics, v.17, n. 6-7, pp. 441-456.

[20] MELO, A.F., 2008, **Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis**. Dissertação de M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[21] PEREZ, E.F., 2000, **Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para Oxalato**. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química/UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

[22] ARYA, S.K., SINGH, S.P., MALHOTRA, B.D., **“Electrochemical Techniques in Biosensors”**. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H.,

Handbook of Biosensors and Biochips , chaper 22, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

[23] KAOUTIT, M.E., RODRIGUEZ, I.N., TEMSAMANI, K.R., et al., 2007, **“The SonogelCarbon Materials as Basis for Development of Enzyme Biosensors for Phenols and Polyphenols Monitoring: a Detailed Comparative Study of three Immobilization Matrixes”**, Biosensors and Bioelectronics, v. 22, n.12, pp. 2958-2966.

[24] DUTTA, R., 2008, **Fundamentals of Biochemical Engineering**. 1^a ed. Índia, Springer.

[25] LEHNINGER, A. L., Lehninger: **Princípios de Bioquímica**. 3^a ed. São Paulo, Sarvier, 2006.

[26] CASS, T., “Enzymology”. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., **Handbook of Biosensors and Biochips** , chaper 5, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

[27] VIEIRA, N.C.S., 2006, **Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$** . Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, Brasil.

[28] ROGERS, K.R., 2006, **“Recent Advances in Biosensor Techniques for Environmental Monitoring”**, Analytica Chimica Acta, v. 568, n. 1-2, pp. 222-231.

[29] MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. **Increase in conformational stability of enzymes on epoxy-activated supports by favouring additional multipoint covalent attachment**, *Enzyme And Microbial Technology*, v.26, p. 509-515, 2000.

[30] PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. **Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries**. *Enzyme Research*, v.2010, 16 p., 2010.

[31] HAIDER, T.; HUSAIN, Q. **Hydrolysis of milk/whey lactose by β galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme**. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 48, p. 576-580, 2009.

[32] VIEIRA, C. D. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. p. 4, 8, 25.

[33] SCOUTEN, W. H. **Methods in Enzymology**. Mosbach: K. ed., 1987. vol. 135, p.30-65.

[34] WANEKAYA, A.K., CHEN, W., MYUNG, N.V., et al., **“Conducting Polymer NanowireBased Biosensors”**. In: Marks, R., Cullen, D. C., Karube, I., Lowe, C. R., Weetall, H. H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 51, New Delhi, Índia, Jhon Wiley & Sons, Ltd., 2007.

[35] CHIBATA I. **Immobilized Enzymes-Research and Development**. Tokyo. Kadansha Ltd. 1978.

[36] BICKERSTAFF, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Human Press., 1997. cap. 1, p. 1-11.

[37] KENNEDY, J.F., CABRAL, J.M.S. **Enzyme immobilization**. Enzyme Technology, 1987.

[38] ARROYO, M. **Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones**; Ars Pharmaceutica, v. 39, p. 23-29, 1998.

[39] CAO, L. **Immobilised enzymes: science or art**. Current Opinion in Chemical Biology. v. 9, p. 217-226, 2005.

[40] VICENTE A. A. **Preparação de açúcar invertido por meio de invertase imobilizada em sílica**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Araraquara, SP, 2000, 145p.

[41] GUISÁN, J.M. **Aldehyde gels as activated support for immobilization and stabilization of enzymes**. Enzyme and Microbial Technology. v. 10, p. 375-382, 1988.

[42] MARTINEK, K; KLIBANOVAM, GOLDMACHER, V. S.; BEREZIN, I.V. **The principles of enzyme stabilization. I. Increase in thermostability of enzymes covalently bound to a complementary surface of a polymer support in a multi-point fashion**. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 485, n. 1, p. 1-12, 1997.

[43] MOZHAEV, V.V.; MELIK-NUBAROV, N.S.; SERGEEVA, M.V. SIKRNIS, V.; MARTINEK, K. **Strategy for stabilizing enzymes I. Increasing stability of enzymes via their multipoint interaction with a support.** Biocatalysis and Biotransformation, v. 3, n. 3, p. 179- 187, 1990.

[44] OTERO, C.; BALLESTEROS, A.; GUISÁN, J.M. **Immobilization/stabilization of lipase from Candida rugosa.** Applied Biochemistry And Biotechnology, v. 19, p. 163-175, 1991.

[45] FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C.M.; RODRÍGUEZ, V.; SANTANA, M.C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISÁN, J.M. **Preparation of activated support containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method.** Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 546-550, 1993.

[46] BRÍGIDA, A.I.S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais.** 2010. 193f.Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

[47] SHELDON, R. A. **Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance.** Advanced Synthesis & Catalysis v. 349, p. 1289-1307, 2007.

[48] WANG, D.I.C. **Fermentation and Enzyme Technology.** New York : Wiley, 1976.

[49] JOSIC.D.; BUCHCHER, A.; JUNGBAUER, A. J.; CHROMATOG. B. Anal. **Technol. Biomed.** Life Sci., p. 191, 2001.

[50] HAGE, D. S. J. Chromatogr. B: Anal. **Technol. Biomed.** Life Sci. v. 3, p. 768, 2002.

[51] Dixon NE., Gazzola C, Blakeley RL, Zemer B (1975), Jack bean **urease (EC 3.5.1.5) a metalloenzyme. A simple biological** role for nickel J. Am. Chem. Soc. 97:4131-133.

[52] L.M.D.C. SILVA, **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e ureia com foco na aplicação ambiental.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Tecnológica de Processos Químicos e Biológicos da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

[53] Michigan State University: **Biochemistry and Molecular Biology** - <http://www.bmb.msu.edu> Acessado em 05 de Outubro de 2016.

[54] JABRI, E.; CARR, M. B.; HAUSINGER, R. P.; KARPLUS, P. A. **The crystal structure of urease from Klebsiella aerogenes.** Science, v. 268, n. 5213, p. 998-1004, 1995.

[55] LIPPARD, STEPHEN J. **At last - the crystal structure of urease.** Science. v. 268, n. 268, p. 996 - 997, 1995.

[56] **Catálise da ureia.** Disponível em: http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Urease-e.htm Acesso em 05 de Outubro de 2016.

[57] **Laboratório de proteínas tóxicas da UFRGS.** Disponível em <<http://www.ufrgs.br/laprotox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-aspectos-estruturais>>. Acessado em 10 de Maio de 2016.

[58] SOUZA, F.S. e FATIBELLO-FILHO, O. **Obtenção, caracterização e purificação da enzima urease de feijão guandu (*Cajanus cajan* L. Milsp).** Congresso de Iniciação Científica, 14, 2006, São Carlos. Anais de Eventos da UFSCar, v. 2, p.731, 2006.

[59] PERUZZO, T.M. e CANTO, E.L. **Coleção base: Química.** São Paulo: Moderna, 1999.

[60] HOYER, Patrick. **Formation of a titanium dioxide nanotube array.** Langmuir, v. 12, n. 6, p. 1411-1413, 1996.

[61] SOUZA, F. M. **Análise estrutural e síntese de nanotubos de dióxido de titânio.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Programa de pós-graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, Minas Gerais, 2011.

[62] T.Kasuga M.Hiramatsu A.Hoson K.Niihara, T.Sekino. **Formation of titanium oxide nanotube.** Langmuir, 14:3160–3163, 1998.

[63] BAVYKIN, D. V.; PARMON, V. N.; LAPKIN, A. A.; & WALSH, F. C. **The effect of hydrothermal conditions on the mesoporous structure of TiO₂ nanotubes.** Journal of Materials Chemistry, v. 14, n. 22, p. 3370-3377, 2004.

[64] YAO, B. D.; CHAN, Y. F.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, W. F.; YANG, Z. Y.; & WANG, N. **Formation mechanism of TiO₂ nanotubes.** Applied Physics Letters, v. 82, p. 281-283, 2002.

[65] YUAN, Z. Y.; SU, B. L. **Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires.** Colloids and Surfaces A, v. 241, p. 173-183, 2004.

[66] WU, X.; JIANG, Q. Z.; MA, Z. F.; FU, M.; & SHANGGUAN, W. **Synthesis of titania nanotubes by microwave irradiation.** Solid state communications, v. 136, n. 9, p. 513-517, 2005.

[67] KANG, T. S.; SMITH, A. P.; TAYLOR, B. E.; DURSTOCK, M. F. **Fabrication of highly-ordered TiO₂ nanotube arrays and their use in dyesensitized solar cells.** Nano Letters, v. 9(2), p. 601-606, 2009.

[68] MAIYALAGAN, T.; VISWANATHAN, B.; VARADARAJU, U. V. **Fabrication and characterization of uniform TiO₂ nanotube arrays by sol-gel template method.** Bulletin of Materials Science, v. 29, n. 7, p. 705, 2006.

[69] MACAK, J. M.; TSUCHIYA, H.; GHICOV, A.; YASUDA, K.; HAHN, R.; BAUER, S.; & SCHMUKI, P. **TiO₂ nanotubes: Self-organized electrochemical formation,**

properties and applications. Current Opinion in Solid State & Materials Science, v. 11, p. 3-18, 2007.

[70] ZHANG, Y.; FU, W.; YANG, H.; QI, Q.; ZENG, Y.; ZHANG, T.; & ZOU, G. **Synthesis and characterization of TiO₂ nanotubes for humidity sensing.** Applied Surface Science, v. 254, n. 17, p. 5545-5547, 2008.

[71] SOTOMAYOR, M.D.P.T., KUBOTA, L.T., 2002, **“Enzymeless Biosensors: Uma Nova Área para o Desenvolvimento de Sensores”**, Química Nova, v. 25, n.1, pp. 123128.

[72] WANG, J., 2005, **“Nanomaterial-based Electrochemical Biosensors”**, The Analyst, v. 130, n. 4, p. 421-426.

[73] D.V.Bavykin J.M.Friendrich, Frank C. Walsh. **Protonated titanates and TiO₂ nanostructured materials: Synthesis, properties and applications.** Advanced Materials, 18:2807–2824, 2006.

[74] A.P.Caricato S.Capone G.Ciccarella M.Martino R.Rella F.Romano J.Spadavecchia A.Taurino T.Tunno, D.Valerini. **TiO₂ nanoparticle thin film deposition by matrix assisted pulsed laser evaporation for sensing applications.** Applied Surface Science, 253:7937–7941, 2007.

[75] S.C.Roy M.Paulose, C.A.Grimes. **The effect of TiO₂ nanotubes in the enhancement of blood clotting for the control of hemorrhage.** Biomaterials, 28:4667–4672, 2007.

- [76] O.Carp A.Reller, C.L.Huisman. **Photoinduced reactivity of titanium dioxide.** Progress in Solid State Chemistry, 32:33–177, 2004.
- [77] M.Law J.Goldberger, P.Yang. **Semiconductor nanowires and nanotubes.** Annual Review of Materials Research, 34:83–122, 2004.
- [78] J.M.Baik M.H.Kim C.Larson X.Chen S.Guo A.M.Wodtke, M.Moskovits. **High-yield TiO₂ nanowire synthesis and single nanowire field-effect transistor fabrication.** Applied Physics Letters, 92(242111), 2008.
- [79] M.Yamada M.Wei I.Honama, H.Zhou. **One-dimentional proton conductor under high vapor pressure condition employing titanate nanotube.** Electrochemistry Communications, 8:1549–1552, 2006.
- [80] A.Kolmakov and M.Moskovits. **Chemical sensing and catalysis by one-dimensional metal-oxide nanostructures.** Annual Review of Materials Research, 34:151–180, 2004
- [81] O.K.Varghese D.Gong M.Paulose K.G.Ong, C.A.Grimes. **Hydrogen sensing using titania nanotubes.** Sensors and Actuators B, 93:338–344, 2003.
- [82] E.Morgado Jr. **Estudo de titanatos nanoestruturados obtidos por tratamento hidrotérmico de óxido de titânio em meio alcalino.** Tese de Doutorado, D.Q. Pós Grad. UFRN, 2007.

- [83] G.Sivalingam K.Nagaveni M.S.Hedge, G.Madras. **Photocatalytic degradation of various dyes combustion synthesized nano anatase TiO₂**. Applied Catalysis B: Environmental, 45:23–38, 2003.
- [84] I.Zhitomirsky. **Cathodic electrosynthesis of titanium and ruthenium oxides**. Materials Letters, 33:305–310, 1998.
- [85] S.Iijima. **Helical microtubes of graphitic carbon**. Nature, 354:56–59, 1991.
- [86] P.Hoyer. **Formation of a titanium dioxide nanotube array**. Langmuir, 12(6):1411– 1413, 1996.
- [87] T.Kasuga M.Hiramatsu A.Hoson K.Niihara, T.Sekino. **Formation of titanium oxide nanotube**. Langmuir, 14:3160–3163, 1998.
- [88] X.Sun Y.Li. **Synthesis and characterization of ion-exchangeable titanate nanotubes**. Chemistry:A European Journal, (10).
- [89] Y-F.Chen C-Y.Lee M-Y.Yeng, H-T.Chiu. **Preparing titanium oxide with various morphologies**. Materials Chemistry and Physics, 81:39–44, 2003.
- [90] Z.-Y.Yuan B.-L.Su. **Titanium oxide nanotubes, nanofibers and nanowires**. Colloids and Surfaces A, 241:173–183, 2004.

[91] L.Yu X.Zhang. **Hydrothermal synthesis and characterization of vanadium oxide/titanate composite nanorods**. Materials Chemistry and Physics, 87:168–172, 2004.

[92] P.Cevc-A.Jesih A.Gloter C.P.Ewels, D.A.P.Umek. **Impact of structure and morphology on gas adsorption of titanate-based nanotubes and nanoribbons**. Chemistry of Materials, 17:5945–5950, 2005.

[93] BREMER, M. In. **‘Using R at the Bench: Step-by-Step Data Analytics for Biologists’** (W. B. Wood ed.) *pp* 243-280. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

[94] **Rigaku Innovation**. Disponível em: <<http://www.rigaku.com/pt-br/products/xrd/minifle>>. Acesso em 10 de Maio de 2016.

[95] [99] **Powder XRD patterns of nanocrystalline semiconductors**. Disponível em: < https://www.researchgate.net/figure/51225005_fig1_Powder-XRD-patterns-of-nanocrystalline-semiconductors>. Acessado em 10 de Maio de 2016.