



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Desenvolvimento de um Biossensor para Detecção de Glicose

Autor: Vinícius da Costa Ávila

Orientador: Prof. Dr. Nilo Sérgio Medeiros Cardozo

Co-orientadora: Dra. Viviane Dalmoro

Porto Alegre, julho de 14

Sumário

Sumário	ii
Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1 Introdução	1
2 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica	3
2.1 Técnicas eletroanalíticas	3
2.2 Detecção de H ₂ O ₂ com eletrodos de platina	3
2.3 Glicose oxidase	4
2.4 Imobilização enzimática	5
2.5 Eletrodos modificados com GOx	6
2.5.1 Sensores de 1ª geração	6
2.5.2 Sensores de 2ª e 3ª geração	7
2.6 Polipirrol	9
2.6.1 Mecanismo de polimerização	9
2.7 Eletrodos modificados com GOx imobilizada em PPy	10
3 Materiais e Métodos	14
3.1 Materiais	14
3.1.1 Soluções empregadas	14
3.1.2 Eletrodos e Sistema Eletroquímico	14
3.2 Preparação do eletrodo	14
3.3 Detecção do peróxido de hidrogênio	14
3.4 Modificação do eletrodo	15
3.5 Caracterização do filme polimérico (MEV e FT-IV)	15
3.6 Testes de difusão do peróxido de hidrogênio	15
3.7 Testes de difusão da glicose	15
3.8 Detecção de glicose	15
3.9 Análise cinética	16
4 Resultados e Discussão	17
4.1 Eletrodos não modificados na detecção de peróxido	17
4.2 Pré-tratamento para o eletrodo modificado	18
4.3 Preparação do eletrodo modificado	20
4.4 Caracterização do filme polimérico	21

4.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	21
4.4.2	Espectroscopia no Infravermelho (FT-IV)	22
4.5	Eletrodos modificados na detecção de peróxido	23
4.6	Testes de difusão do peróxido de hidrogênio	24
4.7	Testes de difusão da glicose	25
4.8	Deteção de glicose: curva de calibração e análise cinética	26
4.9	Reprodutibilidade e Estabilidade do Sensor	29
5	Conclusões e Trabalhos Futuros	31
6	Referências	33

Agradecimentos

Aos meus orientadores Nilo e Viviane, por fornecerem apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

À professora Isabel, por compartilhar seus conhecimentos que ajudaram na conclusão deste projeto.

Ao professor João Henrique, por me acolher no IQ durante esta etapa.

Aos demais professores do DEQUI, por me fornecerem ferramentas que auxiliaram na minha formação.

Aos colegas dos laboratórios do IQ, pela ajuda durante os experimentos.

À minha avó Amail, que desde sempre me instigou a perseguir e adquirir novos conhecimentos.

Aos meus pais, Lisete e Marco, pelo apoio incondicional em todos os momentos e à minha irmã, Flávia, pela amizade e carinho.

Aos meus amigos, da UFRGS e de fora dela, por me acompanharem durante essa jornada.

A todos que cruzaram o meu caminho, compartilhando sabedoria e momentos de alegria e de amor.

Resumo

Áreas médicas, farmacêuticas e alimentares têm investido cada vez mais no desenvolvimento de sensores para detecção de glicose, visando distintas aplicações como medição de glicose no sangue humano e monitoramento de cultivos celulares. No desenvolvimento destes sensores, o método de detecção mais empregado e que possui inúmeras vantagens é através do uso da enzima glicose oxidase, que reage especificamente com a glicose. O polipirrol é uma ótima escolha para matriz polimérica onde a enzima pode ser imobilizada por encapsulamento durante a eletropolimerização, técnica simples e de fácil controle. Neste trabalho, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para detecção de glicose a partir da enzima glicose oxidase que, ao reagir com a glicose, gera peróxido de hidrogênio que é oxidado na superfície de um eletrodo de platina. O eletrodo de platina foi modificado com a enzima e o polipirrol por eletropolimerização. Verificou-se que eletrodos de carbono vítreo não possuem superfície catalítica para oxidar/detectar o peróxido de hidrogênio e que a presença de filme polimérico sobre o eletrodo de platina desloca a região de potencial ótima para detecção do peróxido de hidrogênio (a partir de 700 mV) quando comparado com o eletrodo de platina não modificado (a partir de 350 mV). A região de potencial de eletropolimerização do pirrol ocorre a partir de 650 mV. A detecção de glicose só foi possível com um pré-tratamento adequado do eletrodo e com a sobre-oxidação do filme de polipirrol. Observou-se que diversos resultados obtidos se devem à pequena espessura do filme polimérico que permite a detecção das espécies sem impor barreira difusiva significativa. Foram realizadas análises de imagens MEV, testes de difusão de peróxido e testes de difusão de glicose. Além disso, a análise cinética por Michaelis-Menten permitiu obter os parâmetros K_m e $I_{máx}$ (13,65 mM e 0,70 μA , respectivamente). As análises dos espectros de infra-vermelho, apesar de não permitirem inferir a presença de enzima no filme de polipirrol, serviram para caracterizar os compostos através da verificação da presença dos grupos funcionais. Durante a detecção de glicose, obteve-se desvio padrão baixo entre as medições (2,9 %) e um tempo de resposta máximo de 80 segundos. Obteve-se um biossensor estável (92 % de atividade após 12 dias) e reprodutível (desvio padrão de 4,95 %) através do uso de uma metodologia simples onde polimerização e imobilização enzimática ocorrem em uma única etapa. Os intervalos lineares de detecção foram de 0 a 3 mM ($R^2 = 0,996$) e de 0 a 7 mM ($R^2 = 0,982$). A sensibilidade do sensor foi calculada para os dois intervalos: 0,490 e 0,384 $\mu A.mM^{-1}.cm^{-2}$; o mesmo foi feito para o limite de detecção: 0,23 e 0,29 mM.

Palavras-chave: biossensor, detecção de glicose, glicose oxidase, polipirrol.

Lista de Figuras

Figura 2.1: Esquema da GOx. (Adaptado de Wong <i>et al.</i> , 2008).....	4
Figura 2.2: Semi-reações entre glicose e glicose oxidase. (Adaptado de Bankar <i>et al.</i> , 2009) ..	5
Figura 2.3: 3 gerações de biossensores para glicose (Adaptado de Wang, J.; 2008).....	6
Figura 2.4: Mecanismo Diaz de eletropolimerização do pirrol (Adaptado de Sadki <i>et al.</i> , 2000)10	
Figura 4.1: (a) Voltamogramas de pulso diferencial na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino com eletrodos de trabalho de Pt e de GC. Varredura de 0 a 1000 mV. Amplitude do pulso: 0,5 mV. Tempo de pulso: 0,05 s. (b) Voltamogramas cíclicos na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino. Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. A varredura iniciou em 0 mV.....	17
Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos na detecção de glicose através da eletroxidação do peróxido em solução tampão de fosfato salino. Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . Intervalo de varredura: -800 a 800 mV. A varredura iniciou em -800 mV. Branco: GOx em solução PBS.	18
Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos durante pré-tratamento eletroquímico em ácido sulfúrico (0,10 M). Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . Intervalo de varredura: -100 a 1000 mV. A varredura iniciou em -100 mV.	19
Figura 4.4: (a) Voltamograma linear do eletrodo de Pt na solução de eletropolimerização. Velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. (b) Amperograma da eletropolimerização do pirrol sobre eletrodo de platina. Carga total: 5,3 mC. Potencial aplicado: 650 mV.	20
Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos antes e depois da sobre-oxidação do filme de polipirrol em solução tampão de fosfato salino. Velocidade de varredura: 100 mV.s ⁻¹ . Intervalo de varredura: -800 a 800 mV. A varredura iniciou em -800 mV.	21
Figura 4.6: MEV da superfície do filme PPy/GOx sobre eletrodo de platina. Carga de eletropolimerização de 75 mC cm ⁻²	22
Figura 4.7: MEVs da superfície do filme PPy/GOx sobre eletrodo de platina (a) Carga de eletropolimerização de 1860 mC.cm ⁻² . (Wang, J. <i>et al.</i> , 2005) (b) Carga de eletropolimerização de 100 mC.cm ⁻² . (Uang e Chou, 2003)	22
Figura 4.8: Espectro infra-vermelho da GOx livre e dos filmes de PPy com e sem GOx.	22
Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino. Velocidade de varredura: 100 mV s ⁻¹ . Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. A varredura iniciou em 0 mV. Branco (Pt): sem peróxido. Pt: detecção de 2 mM de peróxido. Pt modificado (Pt/PPy): detecção de 4 mM de peróxido.....	24
Figura 4.10: Influência da velocidade angular do eletrodo na intensidade da corrente de resposta no estado estacionário durante detecção de 4 mM de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino.....	25
Figura 4.11: Curva relacionando intensidade da corrente e concentração de glicose com os desvios padrões absolutos exibidos a cada ponto.....	27
Figura 4.12: Curvas de calibração para detecção de glicose	28
Figura 4.13: Gráficos de Lineweaver-Burk.....	28

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Resultados obtidos por diversos sensores com GOx	8
Tabela 2.2: Potencial e carga de eletropolimerização e potencial de detecção do analito utilizados em diversos sensores com a GOx imobilizada em PPy	13
Tabela 2.3: Resultados obtidos por diversos sensores com GOx imobilizada em PPy	13
Tabela 4.1: Intensidade de corrente no estado estacionário para diferentes velocidades angular do eletrodo em uma solução PBS com 5 mM de glicose.	26
Tabela 4.2: Parâmetros obtidos das curvas de calibração	28
Tabela 4.3: Valores dos parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho e em demais referências.....	29

Lista de Símbolos

d	diâmetro
I_s	valor da intensidade de corrente elétrica no estado estacionário
$I_{m\acute{a}x}$	valor da intensidade de corrente elétrica máxima
$[S]$	concentração de substrato
K_m	constante de Michaelis-Menten
i	intensidade de corrente elétrica
E	potencial elétrico
ω	velocidade angular
$[glicose]$	concentração de glicose
Δi branco	diferença do valor da intensidade de corrente elétrica em relação ao branco

Lista de Abreviaturas e Siglas

APTES	aminopropiltriétoxisilano
AuNp	nanopartículas de ouro
CNT	nanotubos de carbono
CS	quitosana
DPA	desvio padrão absoluto
DPR	desvio padrão relativo
ECS	eletrodo de calomelano saturado
FAD	dinucleótido de flavina adenina
FT-IV	espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GC	carbono vítreo
GOx	glicose oxidase
HEMA	hidroxietil metacrilato
IU	unidades internacionais
i.e.	isto é
Med _{ox}	mediador oxidado
Med _{red}	mediador reduzido
MEV	microscopia eletrônica de varredura
P	produto
PBS	tampão de fosfato salino
pHEMA	polihidroxietil metacrilato
PMPD	polifenilenodiamina
PPy	polipirrol
PVA	álcool polivinílico
rpm	rotações por minuto
S	substrato
TEGDA	tetraetilenoglicol
t _{resposta}	tempo de resposta

U número de unidades de enzima

UV ultravioleta

1 Introdução

O mercado mundial de biossensores foi avaliado em 8 bilhões de dólares em 2005 por Newman e Turner. Desse total, 85 % se referiam a biossensores para glicose.

Um dos principais motivos para essa quantia elevada é a desordem na regulação de glicose no organismo humano. A diabetes afetava 171 milhões de pessoas em 2000 e prevê-se que em 2030 esse número seja de 366 milhões. Dessa forma, inúmeros e significativos investimentos têm sido feitos nas últimas décadas no tratamento e no diagnóstico dessa doença. No entanto, apesar do uso nesta área específica da saúde constituir a principal aplicação dos sensores de glicose, eles têm aplicação em muitas outras áreas. Por exemplo, em cultivos celulares, a concentração de glicose é uma das variáveis mais importantes a se monitorar. Nas áreas alimentícias e farmacêuticas, sensores para detecção de glicose também encontram aplicações em potencial. Na engenharia de tecidos, a glicose é o principal metabólito responsável pelo crescimento e pela viabilidade celular, de modo que a disponibilidade de sensores adequados torna-se uma ferramenta fundamental para a geração dos dados experimentais necessários para desenvolvimento e validação de modelos matemáticos para o processo.

Há vários métodos de detecção de glicose, conforme descrevem Steiner *et al.* (2011): através de enzimas específicas que ao interagir com a glicose tem seu espectro de absorção/fluorescência modificado; por medições do consumo ou formação de certos metabólitos causados por algumas enzimas, principalmente a glicose oxidase; pela modificação nas propriedades ópticas de ácidos borônicos em contato com glicose; pela afinidade do analito com a proteína concanavalina A; por proteínas e apoenzimas ligantes à glicose.

Dentre os diversos métodos, o que se utiliza da enzima glicose oxidase é um dos mais pesquisados nas últimas décadas (Wu *et al.*, 2011), sendo que todos os sensores comerciais atuais fazem uso da mesma (Steiner *et al.*, 2011). A glicose oxidase possui vantagens na sua aplicação em sensores: as reações com glicose são totalmente reversíveis, o processo é relativamente simples (não exige modificação da enzima), possui boa estabilidade e é específica para detecção de glicose.

A reação entre enzima e glicose gera peróxido de hidrogênio e consome oxigênio, os quais podem ser detectados por meio ópticos ou eletroquímicos. De acordo com Baraton (2007), os biossensores mais utilizados e de maior valor são os eletroquímicos.

A enzima deve ser imobilizada para que atue de forma estável, já que enzimas livres apresentam tempo de vida extremamente curto. O encapsulamento da enzima durante a eletropolimerização de uma matriz polimérica é uma das formas mais simples de imobilização e permite um ótimo controle do processo. O polipirrol é um ótimo candidato por suas propriedades condutoras e biocompatíveis (George *et al.*, 2005).

Dessa forma, os objetivos principais deste trabalho foram: i) estudar as diferentes técnicas propostas na literatura para a produção de biossensores eletroquímicos para quantificação de glicose através da imobilização da enzima glicose oxidase; ii) selecionar, dentre estas técnicas, uma que se utiliza da eletropolimerização do pirrol e produzir a

partir dela o referido sensor. Além disso, de modo a caracterizar e obter mais informações sobre o sensor desenvolvido, a difusão das espécies envolvidas foi avaliada qualitativamente e se analisou a cinética da reação enzimática. Parte dos mecanismos e processos existentes durante a detecção de glicose foram brevemente estudados.

2 Conceitos Fundamentais e Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura contemplando alguns conceitos e teorias importantes para o entendimento deste estudo: técnicas eletroanalíticas, a detecção de peróxido de hidrogênio e algumas peculiaridades da superfície catalítica da platina, a enzima glicose oxidase e sua imobilização e o polipirrol - substrato da imobilização enzimática. Além disso, são descritos trabalhos envolvendo detecção de glicose com a enzima glicose oxidase e, mais especificamente, os que se utilizam da glicose oxidase imobilizada em polipirrol.

2.1 Técnicas eletroanalíticas

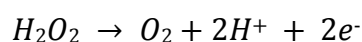
Foram utilizadas três diferentes técnicas durante esse estudo e o método galvanostático foi utilizado em estudos da literatura que se encontram nessa revisão. Abaixo seguem breves definições destas técnicas.

- Voltametria cíclica: controla-se o potencial em uma varredura cíclica realizada a velocidade constante. Obtém-se um voltamograma cíclico, onde a corrente é dada em função do potencial (Khudaish, 1999);
- Voltametria de pulso diferencial: impõe-se um pulso periódico de potencial em uma varredura linear e duas medições de correntes são feitas de modo alternado, uma antes e outra após o pulso. A diferença na corrente é registrada em função do potencial. A vantagem deste tipo de voltametria é sua maior sensibilidade (Skoog, 2013);
- Amperometria: aplica-se um potencial fixo e monitora-se a corrente em função do tempo (Skoog, 2013);
- Método galvanostático: aplica-se uma corrente fixa e monitora-se o potencial em função do tempo (Skoog, 2013).

2.2 Detecção de H₂O₂ com eletrodos de platina

O uso de eletrodos não modificados não é adequado para aplicações analíticas na detecção de espécies, principalmente devido a comportamentos não reprodutíveis e alta dependência do pré-tratamento. Ainda assim, é importante estudar os mecanismos de detecção envolvidos (Khudaish, 1999).

O peróxido de hidrogênio é oxidado na superfície do eletrodo de acordo com a seguinte reação irreversível:

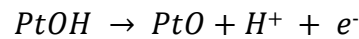
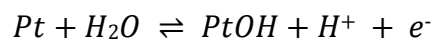


Segundo Khudaish (1999), essa reação engloba diversas etapas intermediárias e pode ocorrer em diferentes sítios ativos da platina, i.e., em diferentes planos da superfície cristalina. Bockris e Khan (1993) discutem o efeito destas superfícies que podem, por exemplo, dar formatos diferentes às curvas de voltamogramas, deslocar o potencial de

detecção e influenciar a taxa de reação eletrocatalítica. Dessa forma, a oxidação do peróxido pode se desenvolver em um amplo intervalo de potenciais.

A eletroxidação de certas espécies na superfície de eletrodos de platina tem uma menor barreira cinética quando o filme de óxido está presente e a maior parte das reações de transferência de elétrons ocorre sobre esse filme. Além disso, essas espécies podem utilizar o oxigênio proveniente do filme formado. Portanto, normalmente, prefere-se a utilização de potenciais próximos aos de formação desses óxidos para a detecção de certas reações de oxidação (Khudaish, 1999).

De acordo com Conway e Gottesfeld (1972), a formação de óxidos na superfície do eletrodo de platina inicia em 750 mV (ECS) através da deposição de hidroxila, conforme as seguintes reações:



A partir de 800 mV inicia a adsorção de oxigênio molecular. Após 900 mV essa camada de óxidos se torna muito estável e reduz a atividade eletrocatalítica do eletrodo; Sitta *et al.* (2013) relatam que quando a superfície é oxidada até 1200 mV, estruturas de óxidos mais irreversíveis são formadas e ocorre desordem superficial. Quando a direção de polarização se inverte, em potenciais mais catódicos (em torno de 700 mV), a superfície de óxidos se reduz gradualmente (Conway e Gottesfeld, 1972).

Existem, na literatura, diversas metodologias para a formação dessa camada de óxido, sendo a mais comum a realização de voltametrias cíclicas em solução ácida (Bockris e Khan, 1993 e Khudaish, 1999).

2.3 Glicose oxidase

A enzima glicose oxidase (GOx) é uma proteína composta por duas subunidades idênticas (homodímero) e por dois dinucleótidos de flavina adenina (FAD). Uma representação esquemática da enzima pode ser vista na Figura 2.1.

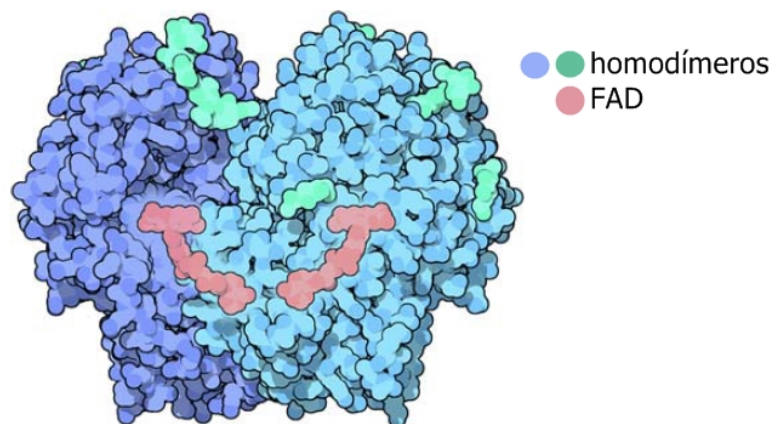
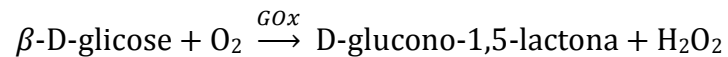


Figura 2.1: Esquema da GOx. (Adaptado de Wong *et al.*, 2008)

A GOx é extremamente específica para β -D-glicose e, portanto, tem sido utilizada prioritariamente na sua medição. A reação que ocorre pode ser vista abaixo. Percebe-se

que há o consumo de oxigênio e a formação de peróxido de hidrogênio, os quais podem ser quantificados por meio ópticos ou eletroquímicos, por exemplo.



Esta reação inclui as etapas oxidativa e redutora representadas na Figura 2.2. A GOx catalisa a reação, oxidando a glicose e sendo, portanto, reduzida. De modo a retornar ao seu estado original, a enzima necessita se oxidar reagindo com oxigênio.

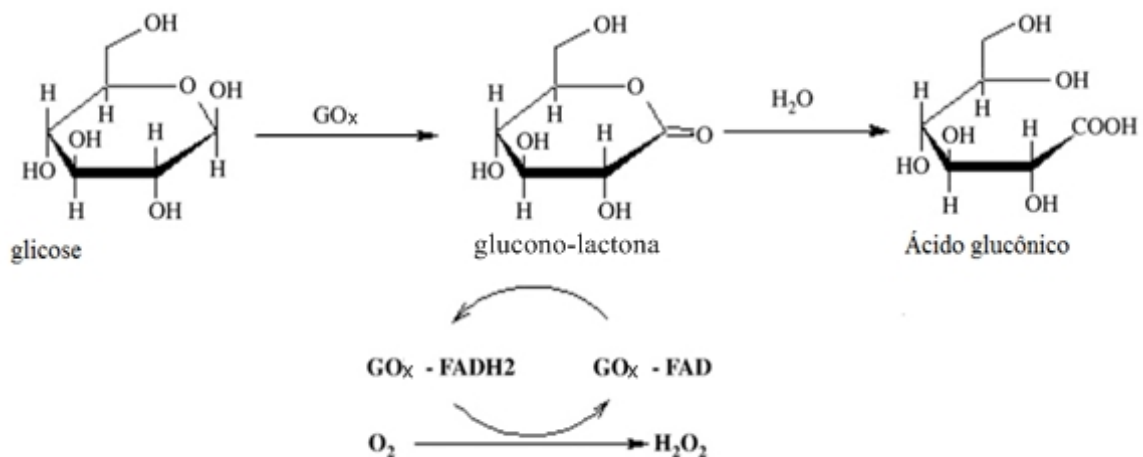


Figura 2.2: Semi-reações entre glicose e glicose oxidase. (Adaptado de Bankar *et al.*, 2009)

A atividade enzimática depende de inúmeros fatores, sendo que os principais são pH e temperatura. As regiões ótimas de pH e temperatura da GOx dependem da proveniência da enzima. A maioria da GOx proveniente de fungos possui pH e temperatura ótimos entre 5 e 7 e 25 e 60°C, respectivamente (Bankar *et al.*, 2009).

2.4 Imobilização enzimática

A imobilização de enzimas fornece uma maior durabilidade da atividade enzimática, já que fornece um ambiente estável e controlado. De acordo com Sheldon (2007), a imobilização é a chave para otimizar o desempenho industrial da enzima. O pesquisador ainda descreve os principais motivos para se realizar a imobilização enzimática como, por exemplo: melhor manuseio, fácil separação do meio na qual se encontra inserida e maior estabilidade.

Existem diversos tipos de imobilização: reticulação, adsorção, imobilização covalente, imobilização por afinidade e encapsulamento. O encapsulamento pode ser realizado em diferentes substratos: sol-gel, pasta de carbono, filmes poliméricos, entre outros. A imobilização da enzima por encapsulamento em filmes poliméricos normalmente ocorre durante a reação de polimerização do monômero (Sassolas *et al.*, 2012).

Conforme Sassolas *et al.*, a eletropolimerização é uma técnica bastante simples e atrativa para uma imobilização controlada. Essa técnica consiste na aplicação de um potencial ou corrente apropriado ao transdutor mergulhado em uma solução aquosa com a enzima e o monômero. Além disso, ocorre em uma única etapa, não envolve reação

química entre enzima e monômero e permite um ótimo controle da espessura do filme e da quantidade de enzima imobilizada.

2.5 Eletrodos modificados com GOx

A maioria dos sensores de glicose existentes comercialmente e que estão sendo pesquisados atualmente se baseiam no uso da GOx (Wu *et al.* e Steiner *et al.*, 2011). Existem ao menos três gerações destes sensores, conforme esquematizado na Figura 2.3.

A primeira geração, de acordo com Wong *et al.* e Wang (2008), consiste na medição do peróxido de hidrogênio que é gerado ou de oxigênio que é consumido na reação enzimática. Esses analitos podem sofrer reações redox na superfície do eletrodo, gerando um sinal que é quantificado e sua intensidade relacionada com a concentração de glicose presente em solução. Essa geração de sensores comumente sofre pela presença de interferentes que possuem potencial de detecção similar aos destes analitos e pela limitação de oxigênio dissolvido.

Nos sensores de segunda geração, são utilizados mediadores - como compostos de ferroceno, nanotubos de carbono, entre outros - que realizam o transporte de elétrons. Estes sensores apresentam menor intensidade dos problemas causados por interferentes. Contudo, podem não ter uma boa acuracidade, pois o oxigênio normalmente participa da reação, juntamente com o mediador (no caso do ferroceno) na oxidação da enzima. No caso do uso de nanotubos de carbono, existe ainda a dependência e limitação de oxigênio dissolvido.

A terceira geração possibilita a transferência de elétrons diretamente dos sítios ativos da enzima para a superfície do eletrodo, com o uso de técnicas de imobilização enzimática através das quais o centro redox da enzima se torna mais facilmente acessível. Segundo Wang (2008), poucos dos estudos que dizem desenvolver sensores de terceira geração mostram evidências suficientes que suportem esse fato. Por outro lado, alguns autores consideram sensores nos quais há um composto que facilita a transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para o eletrodo como sendo sensores de terceira geração, apesar de utilizarem mediadores.

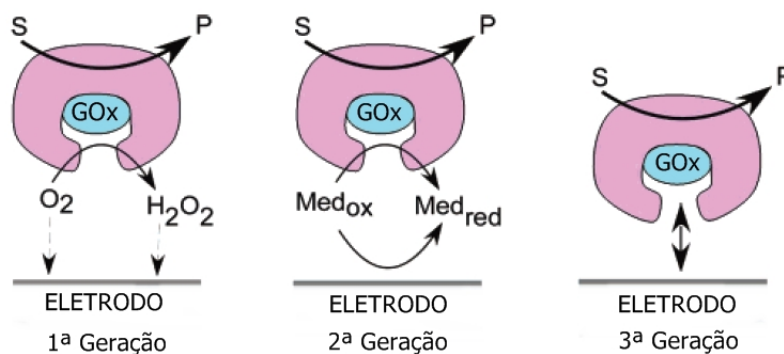


Figura 2.3: 3 gerações de biossensores para glicose (Adaptado de Wang, J.; 2008)

2.5.1 Sensores de 1ª geração

Em um estudo realizado por Yang *et al.* (2002), desenvolveu-se um sensor eletroquímico miniaturizado de platina. Em 2003, Chung *et al.* fabricaram um sensor similar, com eletrodo de Pt-Ir modificado. Nestes trabalhos, a camada sensível do sensor foi depositada sobre o eletrodo por eletropolimerização e é composta de duas partes,

sendo que a GOx encontra-se entre elas. A parte interna seria responsável por evitar *fouling* e diminuir o efeito de interferentes e contaminantes. Já a parte externa tem como função diminuir a velocidade de difusão da glicose até a enzima, limitando a corrente através da espessura deste filme, de modo a tornar o processo de difusão governante e, conseqüentemente, deixar o sensor menos dependente da atividade enzimática.

Yang *et al.* (2002) estudaram o efeito do pH de duas soluções tampão durante a eletropolimerização sobre a permeabilidade de interferentes específicos. As soluções tampão empregadas foram as seguintes: tampão de acetato (pH 5,6) e tampão de fosfato salino (pH 7,4). Seus resultados mostraram que a combinação de ambas soluções tampão testadas trouxeram melhor desempenho. Dessa forma, utilizaram polifenilenodiamina (PMPD) eletropolimerizada em duas etapas, com o uso de soluções tampão e pH diferentes em cada uma delas. Já, Chung *et al.* (2003) usaram poliaminonaftaleno e PMPD na camada seletiva e verificaram que seu sensor tinha interferência negligenciável frente aos contaminantes estudados.

Uma camada de revestimento externa foi elaborada com uso de Teflon e de poliuretano, os quais apresentaram boa adesão quando combinados e forneceram estabilidade às medições. Além disso, o Teflon confere biocompatibilidade, hidrofobicidade e estabilidade mecânica. Essa camada externa pode ainda auxiliar no aumento da sensibilidade do sensor ao evitar a difusão do peróxido de hidrogênio para o meio e sua presença parece não mitigar a seletividade da camada sensível. (Yang *et al.*, 2002 e Chung *et al.*, 2003)

Nanopartículas de platina e nanotubos de carbono foram utilizados por Hrapovic *et al.*, em 2004, para modificar um microeletrodo de fibra de carbono, com o objetivo de melhorar a afinidade pelo peróxido de hidrogênio e a transferência de elétrons. Para a preparação dos eletrodos, uma solução de Nafion com nanotubos de carbono e nanopartículas de platina foi dispersa sobre os mesmos, seguidas da solução enzimática. Glutaraldeído foi usado para imobilizar a enzima por reticulação. A presença de Nafion no sensor auxiliou na diminuição dos efeitos causados pela presença de interferentes.

Em 2009, um estudo publicado por Wang *et al.* também descreve um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e com enzimas imobilizadas da mesma maneira. Os autores utilizaram a técnica de camada por camada (*layer by layer*) de modo a recobrir o eletrodo com um filme composto de nanotubos de carbono (CNT), partículas de ouro (AuNp) e quitosana (CS). As partículas de ouro combinadas com os nanotubos de carbono melhoraram a atividade eletrocatalítica do sensor, aumentando a sensibilidade e diminuindo o tempo de resposta e a quitosana contribuiu com sua capacidade de adesão, resistência mecânica e biocompatibilidade. A utilização de diversas camadas CNT/CS/AuNp foi estudada e os melhores resultados de corrente foram obtidos com o uso de 8 camadas sobrepostas.

2.5.2 Sensores de 2ª e 3ª geração

Um eletrodo de carbono vítreo modificado foi fabricado por Zhang *et al.* (2011). Uma solução de álcool polivinílico (PVA), nanotubos de carbono e GOx foi depositada sobre a superfície do eletrodo. Após seco, o eletrodo foi mergulhado em uma solução de H₂AuCl₄

de modo que as partículas de ouro se depositassem no sensor. Essas nanopartículas combinadas com os nanotubos facilitaram o transporte de elétrons diretamente da GOx para o eletrodo e o PVA foi capaz de fornecer um ambiente biocompatível para as enzimas.

Em 2013, Unnikrishnan *et al.* desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado no qual a transferência de elétrons ocorre diretamente do sítio redox da enzima. O eletrodo foi modificado em uma única etapa imobilizando GOx em óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente. O sensor apresentou boa estabilidade atribuída à biocompatibilidade do grafeno.

Yang *et al.* (2014) desenvolveram um sensor de carbono vítreo modificado com quitosana e óxido de titânio tetragonal em forma de nanobastões. Ti e NH₄Cl em forma de pó foram misturados, moídos e aquecidos em uma mufla. A mistura resultante foi dispersa diretamente em uma solução de quitosana e GOx foi adicionada. A suspensão final foi espalhada sobre a superfície do eletrodo. O composto de titânio possibilitou a transferência direta de elétrons do sítio redox da enzima até a superfície do eletrodo; além disso, demonstrou-se que esse composto em conjunto com a quitosana fornecem um microambiente favorável para a GOx.

A Tabela 2.1 apresenta um resumo de alguns resultados de desempenho obtidos pelos autores da revisão realizada acima.

Tabela 2.1: Resultados obtidos por diversos sensores com GOx

	t_{resposta} (s)	Intervalo linear (mM)	Limite de Detecção (mM)	Sensibilidade ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	DPR* - medições	DPR* - sensores	Estabilidade**
Yang <i>et al.</i> (2002)	10	-	-	-	-	-	-
Chung <i>et al.</i> (2003)	1	0 a 30	-	0,39	-	-	-
Hrapovic <i>et al.</i> (2004)	3	0,0005 a 5	0,0005	29,87	3,5 % (8)	-	-
Wang <i>et al.</i> (2009)	6	0,006 a 5	0,003	-	-	4,95 % (6)	10 dias (81,3 %)
Zhang <i>et al.</i> (2011)	10	0,5 a 8	0,2	16,6	3,8 % (10)	5,4 % (5)	1 mês
Unnikrishnan <i>et al.</i> (2013)	5	0,1 a 27	-	1,85	4,9 % (4)	3,585 % (5)	20 dias (93,4 %) 50 dias (81 %)
Yang <i>et al.</i> (2014)	3	0,005 a 1,32	0,002	0,0232	3,8 % (5)	5,4 % (5)	3 semanas (96 %) 20 medições (95 %)

*DPR: desvio padrão relativo, entre parênteses o número de medições ou sensores reproduzidos.

** entre parênteses a percentagem da resposta após tempo de armazenamento ou número de medições em relação a resposta inicial do sensor.

Além dos trabalhos mencionados nesta seção, abordando diversas matrizes utilizadas na fabricação de eletrodos modificados com a GOx, também pode-se encontrar inúmeros trabalhos nos quais se utiliza o polipirrol para imobilização enzimática. Como este será o foco do trabalho, uma revisão específica sobre o tema é apresentada nas próximas seções.

2.6 Polipirrol

O polipirrol (PPy) tem sido bastante utilizado na imobilização de GOx para eletrodos de glicose por diversos motivos, dentre os quais se destacam (Singh *et al.*, 2009):

- Boa aderência do PPy ao material dos eletrodos;
- Possibilidade de inserção de grupos funcionais;
- Fácil controle das propriedades do filme polimérico alterando as condições da eletropolimerização;
- O procedimento de imobilização da enzima ocorre em uma única etapa e em condições brandas e soluções aquosas;
- Filmes de PPy são estáveis em condições ambientes.

2.6.1 Mecanismo de polimerização

Primeiramente, é importante ressaltar a necessidade de haver um ânion dopante na solução de polimerização, para que o mesmo garanta a neutralidade elétrica do polímero (Sadki *et al.*, 2000).

Existem diversos mecanismos propostos para a polimerização do pirrol; contudo, aqui será descrito somente o Mecanismo Diaz, apresentado esquematicamente na Figura 2.4, que é um dos mais bem aceitos na literatura (Waltman e Bargon, 1986; Sadki *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2009). Segundo este mecanismo, inicialmente, o pirrol em solução é oxidado, através da passagem de corrente pelo eletrodo de trabalho, doando elétrons (etapa 1). Em seguida, ao menos 3 rotas são possíveis: caso o cátion formado seja muito estável, se difundirá para a solução e reagirá para formar produtos solúveis de baixa massa molecular; caso seja muito instável, reagirá próximo do eletrodo, com o solvente ou o ânion, formando também produtos solúveis de baixa massa molar; entre estes dois extremos, o cátion pode dar continuidade à polimerização ao formar dímeros.

A segunda etapa na polimerização ocorre quando a forma ressonante mais estável do cátion formado anteriormente se dimeriza. Na etapa 3, ocorre a estabilização do dímero pela perda de dois prótons.

A etapa seguinte (etapa 4) consiste na oxidação do dímero estabilizado; dessa forma, o elétron fica distribuído entre dois anéis e, portanto, o potencial para oxidar o dímero é menor do que para oxidar o monômero, i.e., essa forma oxidada é mais estável e menos reativa. Assim, a forma ressonante mais estável desse cátion reage com a forma ressonante mais estável de um monômero catiônico, formando um trímero que desprotona, neutralizando sua carga (etapa 5).

Na etapa 6, ocorre a eletroxidação do trímero, formando um cátion ressonante com duas formas mais estáveis. A etapa 7 consiste na propagação da cadeia – durante a qual os ânions são incorporados – até a forma final do polímero.

A eletropolimerização não fornece PPy neutro, mas sim sua forma condutora oxidada (com uma carga positiva a cada 3 ou 4 monômeros, balanceada por um ânion dopante).

Segundo Singh *et al.* (2009), a formação do PPy envolve um passo de nucleação, propagação e precipitação. A deposição do polímero catiônico na superfície do eletrodo ocorre apenas quando o seu tamanho ultrapassa o limite de solubilidade específico do polímero.

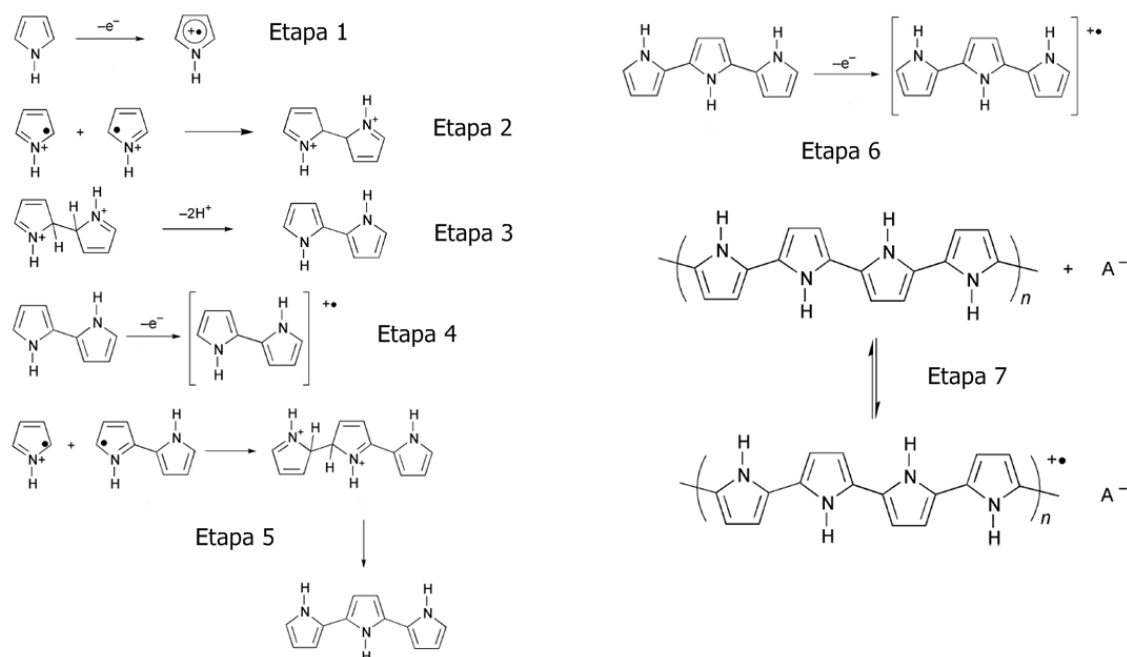


Figura 2.4: Mecanismo Diaz de eletropolimerização do pirrol (Adaptado de Sadki *et al.*, 2000)

2.7 Eletrodos modificados com GOx imobilizada em PPy

Fortier *et al.*, em 1990, publicaram um estudo no qual desenvolveram um sensor a partir de um eletrodo de platina com GOx imobilizada em polipirrol. A imobilização da enzima ocorreu durante a eletropolimerização (aplicação de potencial fixo em 650 mV vs ECS) do pirrol sobre o eletrodo. Os autores avaliaram a influência da concentração da enzima e do pirrol, espessura do filme formado, pH e temperatura na resposta do sensor, encontrando como melhores condições: concentrações de pirrol de 0,3 M e de GOx de $65 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 6 e temperatura de 40°C . Em relação à espessura do filme, os autores utilizaram uma relação na qual $45 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$ equivale a uma espessura de $0,1 \mu\text{m}$ (Holdcroft e Funt, 1988 apud Fortier *et al.*, 1990) e determinaram a melhor espessura como sendo $0,17 \mu\text{m}$ (correspondente a $75 \text{ mC}\cdot\text{cm}^{-2}$).

O uso de óxido de titânio mesoporoso como matriz para a deposição do polipirrol foi estudado por Cosnier *et al.*, em 1999. O interesse pelo TiO_2 se deve ao fato de que o mesmo exibe afinidade electrocatalítica pelo peróxido de hidrogênio. Eletrodos cobertos com óxido de estanho foram utilizados para modificação, isopropóxido de titânio foi hidrolisado sobre esses eletrodos, seguido de sinterização. A imobilização da enzima foi feita misturando-a em pirrol anfílico e essa solução foi espalhada sobre os eletrodos modificados. A polimerização do pirrol ocorreu por eletrólise através de potencial controlado. Como a glicose oxidase reage aerobiamente, as medições de glicose foram realizadas em uma solução de LiClO_4 , saturada com oxigênio. Estudou-se o efeito da quantidade de enzima imobilizada, concluindo-se que com altas concentrações da GOx

parte do peróxido de hidrogênio gerado perto da superfície externa do polímero difunde diretamente para o meio, sem chegar ao eletrodo; além disso, a concentração de oxigênio dissolvido em solução pode vir a ser um fator limitante quando há alta concentração da enzima. A espessura do filme de TiO_2 foi outro parâmetro estudado. Comparações entre filmes com 4 e 8 μm foram realizadas e os resultados mostraram que o filme mais espesso apresentou maior sensibilidade, o que foi atribuído à afinidade do óxido de titânio pelo peróxido de hidrogênio.

Brahim *et al.* (2002) imobilizaram polipirrol e GOx em polihidroxietil metacrilato (PHEMA) – um polímero biocompatível que tem atraído grande interesse em áreas médicas – modificando um eletrodo de platina. Após aplicação da mistura GOx/HEMA/pirrol sobre o eletrodo, a polimerização do HEMA ocorreu pela irradiação de UV. Em seguida, mergulhou-se o sensor em uma solução contendo pirrol para a eletropolimerização. Um agente reticulador, tetraetilenoglicol (TEGDA), também foi utilizado na fabricação do sensor. No estudo, foram encontrados os melhores valores para a composição do monômero, a massa da enzima, a espessura do filme, o pH e a temperatura. Maiores cargas da enzima encapsulada resultaram em menores tempos de resposta, com um ótimo em torno de $1064 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-2}$. A espessura do filme polimérico escolhida foi a menor testada, 120 μm . A temperatura e o pH encontrados foram os mesmos relatados em alguns estudos para a enzima livre, em torno de 37°C e 6,0, respectivamente; contudo, em valores de pH fisiológicos (7,3), 90% da resposta é mantida.

O efeito do pH na eletropolimerização galvanostática do pirrol foi estudado por Uang e Chou (2003). GOx foi imobilizada em filmes de polipirrol formados durante a polimerização em um eletrodo de platina. Demonstrou-se que o pH afeta a espessura do filme durante a deposição do pirrol e que em baixos valores de pH filmes mais espessos eram formados, dificultando a difusão das espécies de interesse; além disso, a quantidade de enzima imobilizada também é afetada pelo pH: em valores muito altos, uma pequena quantidade de enzima foi encapsulada efetivamente. Dessa forma, notou-se que a sensibilidade do sensor foi melhor em condições neutras.

Em 2006, Chen *et al.* propuseram o uso de dois eletrodos de trabalho com o propósito de eliminar o efeito de interferentes. Assim, montaram uma célula eletroquímica com 4 eletrodos em sua configuração (dois eletrodos de trabalho de platina, eletrodo de referência e contra-eletrodo). O filme de polipirrol foi formado sobre os eletrodos de trabalho ao serem postos em solução contendo o monômero e conectados a um galvanostato para fornecer o potencial necessário. A imobilização da enzima sobre um dos eletrodos de trabalho ocorreu em duas etapas: o valor do potencial aplicado foi estabelecido de forma a reduzir o filme de polipirrol continuamente por um dado período de tempo para que, então, esse eletrodo fosse posto em uma solução contendo a GOx, na qual o valor de potencial usado serviu para oxidar o filme e imobilizar a enzima. Segundo o estudo, esse eletrodo extra – composto pelo filme de polipirrol sem a enzima – eliminou a interferência causada por outros compostos na solução, sendo que os autores afirmam que interferências provenientes de compostos do plasma sanguíneo também podem ser eliminadas. A corrente catalítica proveniente apenas da GOx foi obtida pela diferença entre as correntes de resposta desse eletrodo e do eletrodo de trabalho

contendo a GOx. A corrente de resposta aumenta com o aumento do pH até o valor de 5,5, quando começa a decrescer, demonstrando que a imobilização da enzima não alterou seu valor de pH ótimo quando comparada com a enzima livre.

Njagi e Andreescu (2007) desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo com GOx e nanopartículas de ouro (AuNp) imobilizadas em polipirrol. A presença de AuNp melhora a atividade eletroquímica ao facilitar a transferência de elétrons. O encapsulamento da enzima foi feito ao se colocar soluções de H₂AuCl₄ e GOx sobre a superfície do eletrodo e, em seguida, depositar pirrol; a polimerização ocorre facilmente na presença de H₂AuCl₄, não havendo necessidade do uso de técnica eletroquímica nesta etapa. Os autores estudaram a concentração dos reagentes e o tempo de polimerização e verificaram que a baixas concentrações o recobrimento do eletrodo e o encapsulamento da enzima foram ineficientes, enquanto que em concentrações muito elevadas a resistividade do polímero era alta a ponto de reduzir a sensibilidade do sensor; observaram também que tempos baixos para a polimerização resultavam em um filme muito instável e tempos elevados causavam uma diminuição da resposta. Estudou-se também a quantidade de GOx e percebeu-se que acima de um dado valor (1,2 IU) a sensibilidade diminuía, o que pode ter sido causado pela saturação do polipirrol ou pela formação de um filme mais compacto e menos permeável ao substrato. Os autores comentam que essa quantidade de enzima é muito menor do que a de outros estudos que utilizam a aplicação de potencial ou de corrente para imobilização da mesma e sugerem que nestes estudos grande parte das enzimas poderia estar sofrendo inativação devido ao uso de técnica eletroquímica na sua imobilização. Obtiveram alta estabilidade e, de acordo com os autores, essa estabilidade obtida se deve à matriz de Au-PPy que evita a perda de enzimas e permite rápida difusão do substrato e do produto.

Fang *et al.* (2012) estudaram a biocompatibilidade do composto quitosana-polipirrol (CS-PPy) em um eletrodo de carbono vítreo. CS-PPy foi preparado dissolvendo CS em uma solução aquosa de ácido acético e FeCl₃ com a adição posterior de pirrol. Essa amostra passou por um equipamento de diálise para remoção dos íons de ferro e, após soluções de aminopropiltriétoxissilano (APTES) e glutaraldeído serem depositadas sobre a superfície do eletrodo, gotas do CS-PPy foram colocadas sobre o mesmo. A imobilização da enzima ocorreu misturando-a com glutaraldeído aquoso e depositando-os sobre o eletrodo modificado. Segundo os autores, a combinação CS-PPy melhora a transferência de elétrons. Quantidades muito altas de PPy acabam diminuindo o desempenho do sensor, provavelmente devido à falta de compatibilidade com as enzimas. No sistema em questão, a biocompatibilidade é fornecida pela CS e o PPy contribui com a condutividade do eletrodo. O estudo menciona também o fato de que a nanoestrutura fornecida pela combinação CS-PPy proporciona um bom ambiente físico para as enzimas. A resposta do sensor frente a interferentes foi testada e verificou-se que nenhuma atividade foi obtida para ácido ascórbico e ácido úrico.

A partir dos estudos revisados nesta seção, duas tabelas foram elaboradas. Valores de potencial e de carga utilizados na eletropolimerização do pirrol, além dos valores de potencial de detecção do analito encontram-se na Tabela 2.2. Na Tabela 2.3, foram resumidos os principais dados de desempenho reportados pelos diferentes autores.

Tabela 2.2: Potencial e carga de eletropolimerização e potencial de detecção do analito utilizados em diversos sensores com a GOx imobilizada em PPy

	Potencial de eletropolimerização (mV) vs ECS*	Carga total na eletropolimerização (mC.cm ⁻²)	Potencial de detecção do analito (mV) vs ECS*
Fortier <i>et al.</i> (1990)	650	75	700
Cosnier <i>et al.</i> (1999)	845	-	-110
Brahim <i>et al.</i> (2002)	745	-	745
Uang e Chou (2003)	-	100	745
Chen <i>et al.</i> (2006)	700	-	550
Njagi e Andreescu (2007)	-	-	745
Fang <i>et al.</i> (2012)	-	-	135

*ECS: eletrodo de calomelano saturado

Percebe-se, através da tabela acima, que o potencial para eletropolimerização do pirrol usado pelos autores variam de 650 a 845 mV. Além disso, o potencial de detecção do analito, peróxido de hidrogênio, normalmente se encontra próximo de 700 mV; alguns potenciais mais baixos se devem a modificações realizadas nos eletrodos que possibilitam a detecção do analito em diferentes potenciais.

Tabela 2.3: Resultados obtidos por diversos sensores com GOx imobilizada em PPy

	t _{resposta} (s)	Intervalo linear (mM)	Limite de Detecção (mM)	Sensibilidade (μA.mM ⁻¹ .cm ⁻²)	DPR* - medições	DPR* - sensores	Estabilidade**
Fortier <i>et al.</i> (1990)	-	1,0 a 7,5	-	-	3,50 %	-	175 medições durante 80 dias
Cosnier <i>et al.</i> (1999)	-	0,5 a 1,0	-	0,018	-	-	7 dias (70 %)
Brahim <i>et al.</i> (2002)	40	0,05 a 20	0,025	1,900	-	-	8 meses (70 %)
Uang e Chou (2003)	15	0 a 10	-	0,223	-	92 %*** (2)	medições periódicas por 14 dias (50 %)
Chen <i>et al.</i> (2006)	-	0,005 a 20	-	-	2,0 % (3)	-	-
Njagi e Andreescu (2007)	4	0,0025 a 5	0,002	15,33	-	1,36 % (3)	medições periódicas por 14 dias (60 %)
Fang <i>et al.</i> (2012)	5	0,5 a 147	0,0155	-	4,3 % (3)	5,8 % (5)	7 dias

*DPR: desvio padrão relativo, entre parênteses o número de medições ou sensores reproduzidos.

** entre parênteses a percentagem da resposta após tempo de armazenamento ou número de medições em relação a resposta inicial do sensor.

*** valor de reprodutibilidade.

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo são descritos os materiais utilizados e a metodologia adotada no presente trabalho. Todos os experimentos foram feitos à temperatura e à pressão ambiente e na presença de ar.

3.1 Materiais

Glicose oxidase, do *Aspergillus niger*, foi comprada da Sigma-Aldrich (tipo X-S, referência G7141). Pirrol (99 %, Acros Organics) foi destilado previamente ao uso. Foram adquiridos também: cloreto de potássio (99,5 %, Ecibra), peróxido de hidrogênio (35 %, Neon), pasta de alumina (AP-Paste, Struers), ácido sulfúrico (95-98 %, Synth), cloreto de sódio (99,5 %, Merck), fosfato dissódico (P.A., Reagen), fosfato monopotássico (99 %, Pro Analysi).

3.1.1 Soluções empregadas

Soluções de glicose (0,10 M) foram preparadas com água deionizada e antes do uso foram deixadas por pelo menos 24 h à temperatura ambiente para garantir a presença da β -D-glicose. Soluções de peróxido de hidrogênio (0,10 M) e soluções de ácido sulfúrico (0,10 M) foram preparadas com água deionizada. Solução tampão de fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) foi preparada dissolvendo 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 0,24 g de KH_2PO_4 em 1 L de água deionizada resultando em pH 7.

3.1.2 Eletrodos e Sistema Eletroquímico

Exceto quando indicado, foi utilizado como eletrodo de trabalho disco rotatório de platina (d=3 mm). Eletrodo de platina e eletrodo de calomelano saturado (ECS) serviram como eletrodo auxiliar e eletrodo de referência, respectivamente. Todos os potenciais no presente trabalho são em relação ao ECS.

Para os testes de difusão, um rotor (da AUTOLAB) foi acoplado ao eletrodo de trabalho. A aplicação de potenciais e a leitura de correntes foram realizadas por um potenciostato AUTOLAB PGSTAT 30/FRA 2 e registradas pelo software GPES (Eco Ehenre B. V., versão 4.9).

3.2 Preparação do eletrodo

Antes de cada teste, o eletrodo foi polido com pasta de alumina, seguido de lavagem com água deionizada sob ultrassom para remover partículas de alumina. Para os eletrodos modificados; realizou-se, após o polimento e antes da eletropolimerização, um pré-tratamento eletroquímico por voltametria cíclica de -100 a 1200 mV, com velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, em uma solução de ácido sulfúrico 0,10 M por 25 ciclos (tempo total de aproximadamente 20 minutos).

3.3 Detecção do peróxido de hidrogênio

Eletrodo de trabalho de platina foi usado para detectar peróxido de hidrogênio. Alíquotas de H_2O_2 foram adicionadas a uma solução de 25 mL de PBS e voltametrias cíclicas e de pulso diferencial foram realizadas. O resultado foi comparado com a resposta obtida por um eletrodo de carbono vítreo (d = 2 mm). Procedimento similar na detecção de H_2O_2 foi feito para os eletrodos modificados.

Detectou-se também o peróxido gerado pela reação da glicose com a enzima livre em solução através de voltametrias cíclicas com o eletrodo de platina não-modificado. GOx (5 mg) foi dissolvida em 25 mL de PBS e adicionaram-se alíquotas de glicose.

3.4 Modificação do eletrodo

Eletropolimerizaram-se filmes com e sem GOx (solução aquosa contendo 10,0 mM de KCl, 0,3 M de pirrol e 0,2 mg.mL⁻¹ de enzima) sobre a superfície do eletrodo de platina mantendo o potencial fixo em 650 mV até uma carga total de 5,3 mC (75 mC.cm⁻²). Os eletrodos modificados contendo a enzima foram lavados em PBS após a polimerização para eliminar enzimas que estivessem fracamente ligadas ao filme polimérico.

Em uma solução de PBS, aplicou-se potencial de 700 mV por 100 min de modo a sobre-oxidar o filme polimérico. Voltametrias cíclicas foram realizadas antes e depois da sobre-oxidação. O sensor foi armazenado em PBS a -4°C quando não utilizado.

3.5 Caracterização do filme polimérico (MEV e FT-IV)

Para o filme de polipirrol com a enzima imobilizada, as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Microscópio Eletrônico JEOL JSM 5800 com uma voltagem de aceleração de 10 kV no Centro de Microscopia da UFRGS.

Os espectros de infravermelho de refletância dos filmes de polipirrol com e sem a enzima encapsulada foram realizados no IQ-UFRGS, empregando um espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR-Prestige-21. Aproximadamente 512 espectros foram acumulados no intervalo de 4000 - 500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Para a enzima pura, 24 espectros foram acumulados.

3.6 Testes de difusão do peróxido de hidrogênio

Realizaram-se amperometrias com potencial fixo em 700 mV em uma solução tampão de fosfato salino com 4,0 mM de peróxido de hidrogênio utilizando eletrodos de platina modificados e não modificado. Variou-se a rotação do eletrodo de trabalho de 0 a 5000 rpm.

3.7 Testes de difusão da glicose

O procedimento foi o mesmo que o realizado para os testes de difusão do peróxido. Mediu-se glicose a uma concentração de 5 mM com detecção através do eletrodo Pt/PPy/GOx. Variou-se a rotação do eletrodo de trabalho de 0 a 2000 rpm.

3.8 Detecção de glicose

Adicionaram-se alíquotas de glicose em uma solução de PBS e o sinal de corrente foi medido, em triplicatas, por amperometrias no potencial de 700 mV com o eletrodo Pt/PPy/GOx. As médias dos valores de corrente no estado estacionário foram utilizadas para o cálculo da média e do desvio padrão das triplicatas para a construção da curva de calibração.

De modo a avaliar a reprodutibilidade, 2 sensores foram preparados usando a mesma metodologia e 3 concentrações de glicose foram medidas amperometricamente com cada sensor. As médias e os desvios padrão das respostas dos sensores para cada concentração foram calculados.

O sinal de intensidade de corrente para uma concentração arbitrada (20 mM) foi medido por amperometrias durante determinado período de tempo para verificar a estabilidade do sensor desenvolvido neste trabalho. Calculou-se a fração da resposta obtida nos tempos medidos em relação à resposta gerada logo após a preparação do sensor (tempo zero).

3.9 Análise cinética

Para a descrição cinética do processo utilizou-se a equação de Michaelis-Menten:

$$I_s = I_{m\acute{a}x} [S]/(K_m + [S]) \quad \text{Eq. (3.1)}$$

onde I_s é a corrente observada, no estado estacionário, $I_{m\acute{a}x}$ é a corrente máxima, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis-Menten.

A utilização deste modelo possui inúmeras vantagens. Dentre elas, a determinação da K_m possibilita verificar a adequabilidade relativa de determinado substrato para a enzima e a atividade enzimática (Segel, 1976). Dessa forma, torna-se possível comparar diferentes sensores em relação ao desempenho cinético.

Para a estimação dos parâmetros cinéticos, K_m e $I_{m\acute{a}x}$, utilizou-se os chamados gráficos de Lineweaver-Burk, que são comumente utilizados na análise cinética durante o desenvolvimento de sensores similares. Esses gráficos se baseiam na forma linearizada da equação de Michaelis-Menten (Fortier *et al.*, 1990; Uang e Chou, 2003; Njagi e Andreescu, 2007):

$$\frac{1}{I_s} = \frac{K_m}{I_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{I_{m\acute{a}x}} \quad \text{Eq. (3.2)}$$

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo, são descritos os resultados obtidos durante o trabalho. Testes eletroquímicos caracterizando os eletrodos e identificando potenciais de detecção do analito, imagens de MEV e espectros de IV, detecção de glicose e parâmetros de performance, entre outros, são discutidos abaixo.

4.1 Eletrodos não modificados na detecção de peróxido

A resposta de eletrodos de carbono vítreo e de platina na detecção do peróxido de hidrogênio foi verificada. A Figura 4.1 (a) mostra voltamogramas de pulso diferencial, com potencial variando de 0 a 1000 mV, e demonstra inatividade catalítica do eletrodo de carbono vítreo para a reação de oxidação do peróxido ao se comparar com a resposta dada pelo eletrodo de platina para uma mesma concentração do analito (20 mM). Devido à atividade eletrocatalítica demonstrada, o eletrodo de platina foi escolhido para o seguimento do trabalho. Os picos de oxidação exibidos nos voltamogramas do eletrodo de Pt aumentam com a concentração do analito e se referem a etapas elementares das reações envolvidas no mecanismo de oxidação do peróxido, como discutido na Seção 2.2.

De modo a verificar a região de oxidação do peróxido, fez-se voltametrias cíclicas com o eletrodo de platina em uma solução de PBS com 2 mM do analito. Os gráficos são exibidos na Figura 4.1 (b). Percebe-se que se atinge uma corrente máxima de oxidação a partir de 350 mV.

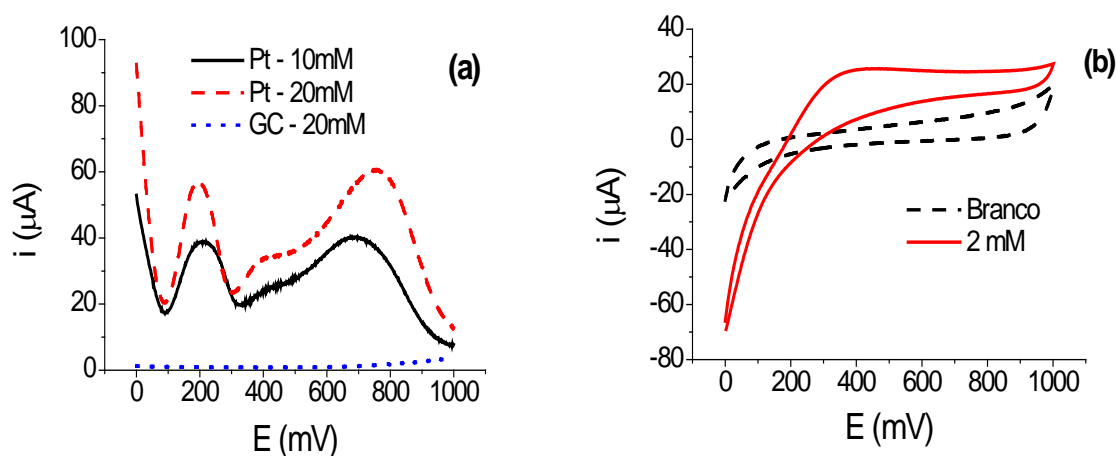


Figura 4.1: (a) Voltamogramas de pulso diferencial na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino com eletrodos de trabalho de Pt e de GC. Varredura de 0 a 1000 mV. Amplitude do pulso: 0,5 mV. Tempo de pulso: 0,05 s. (b) Voltamogramas cíclicos na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino. Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: 100 mV.s⁻¹. Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. A varredura iniciou em 0 mV.

Outra abordagem utilizada foi a detecção do peróxido de hidrogênio produzido pela reação entre glicose e glicose oxidase livre na solução (PBS). Para isto, voltametrias cíclicas (Figura 4.2) foram realizadas com o eletrodo de platina imerso em solução contendo glicose oxidase livre e diferentes concentrações de glicose. Percebe-se um aumento na intensidade de corrente dos picos com o aumento da concentração de

glicose em solução. Nota-se a região de oxidação a partir de 350 mV, atribuída à reação do peróxido na superfície do eletrodo. Além disso, percebe-se outros picos de oxidação/redução ao longo do voltamograma referentes a reações redox da enzima; estes picos têm maior intensidade para maiores concentrações de glicose já que a mesma reduz a enzima e, portanto, há mais enzima em solução para ser eletrooxidada.

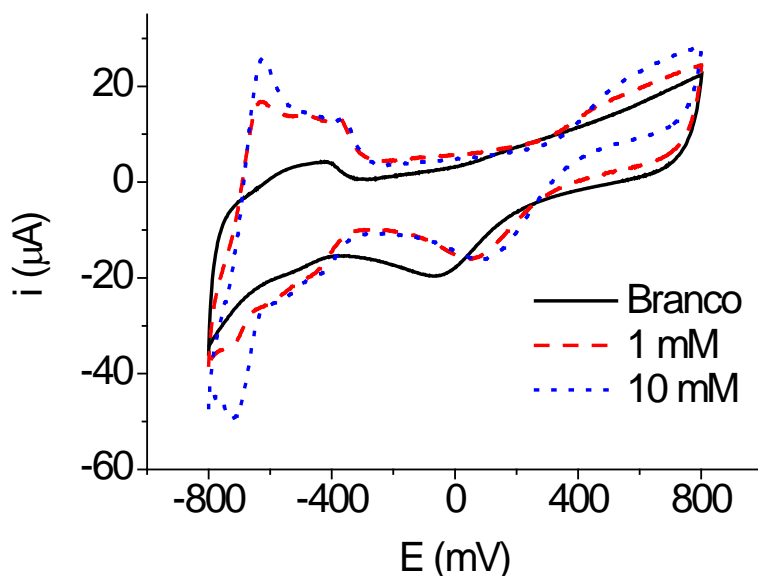


Figura 4.2: Voltamogramas cíclicos na detecção de glicose através da eletrooxidação do peróxido em solução tampão de fosfato salino. Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Intervalo de varredura: -800 a 800 mV. A varredura iniciou em -800 mV. Branco: GOx em solução PBS.

4.2 Pré-tratamento para o eletrodo modificado

Conforme descrito na Seção 2.4, o desenvolvimento de biossensores requer a imobilização enzimática. Nesta seção são discutidos os resultados obtidos durante preparação e modificação do eletrodo.

Previamente a eletropolimerização do pirrol, polimento mecânico e pré-tratamento eletroquímico em ácido sulfúrico foram realizados. Visualiza-se, no voltamograma (Figura 4.3), a redução do íon hidrogênio e a dessorção de oxigênio de 300 a 500 mV sobre as diferentes faces da platina e os processos de adsorção destas espécies ocorrendo em intensidades de corrente positivas. A formação de camadas de óxidos na superfície ocorre principalmente em torno de 900 mV. Essas observações estão de acordo com diversos autores, como Bockris e Khan (1993). Esse pré-tratamento eletroquímico auxilia na formação de filmes de óxidos na superfície da platina, através da adsorção de oxigênio. A formação destes filmes foi inferida a partir do gráfico pela diminuição da corrente com o aumento do número de ciclos, na região de potencial a partir de 950 mV.

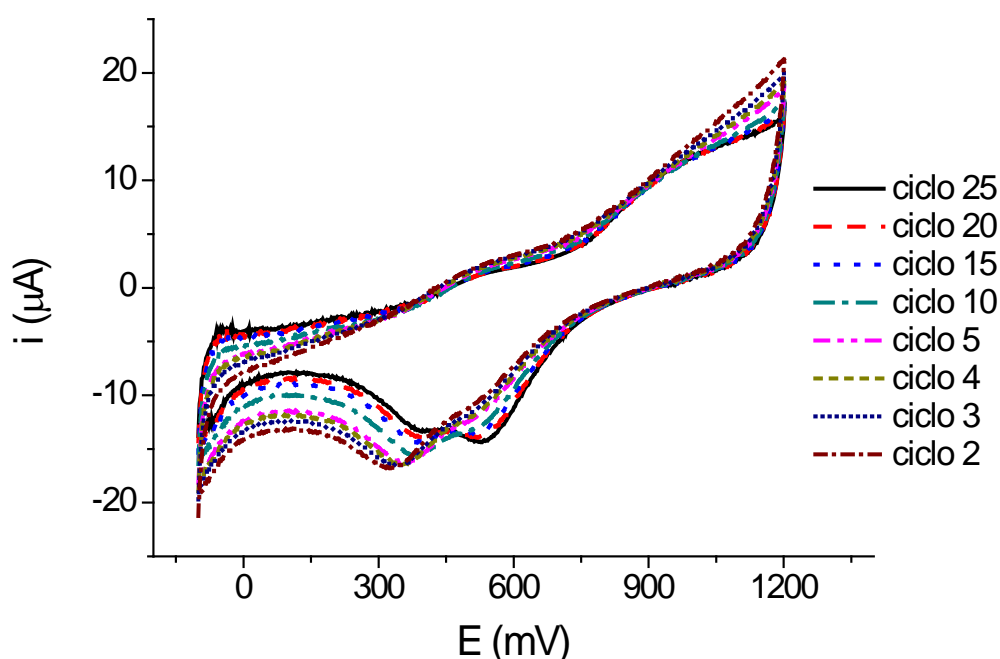


Figura 4.3: Voltamogramas cíclicos durante pré-tratamento eletroquímico em ácido sulfúrico (0,10 M). Eletrodo de trabalho de platina. Velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Intervalo de varredura: -100 a 1000 mV. A varredura iniciou em -100 mV.

Na ausência deste pré-tratamento, verificou-se que a intensidade de corrente durante a eletropolimerização é maior, mas é necessário maior tempo e, conseqüentemente, maior carga para que ocorra a deposição do polipirrol na superfície do eletrodo, gerando filmes mais espessos. Supõe-se que o filme de óxido contribua de forma a aumentar a resistência na passagem de corrente e melhorar a aderência do polipirrol na superfície de platina, modificando o filme formado. De acordo com a revisão realizada no Capítulo 2, a eletropolimerização do pirrol ocorre na solução e, a partir de uma determinada massa molar, começa sua eletrodeposição na superfície do eletrodo. A suposta melhor aderência fornecida pelos óxidos na superfície da platina possivelmente auxilia o início da deposição do polipirrol a partir de cadeias poliméricas de menores massas molares.

A glicose foi detectada somente quando o eletrodo de platina foi submetido a um pré-tratamento eletroquímico adequado. Esse fenômeno possivelmente se deve ao fato de que, sem pré-tratamento, filmes mais espessos de polipirrol são formados, dificultando a difusão de glicose e favorecendo sua adsorção no filme polimérico, causando bloqueio parcial dos poros.

Além disso, o oxigênio adsorvido na platina quando esse condicionamento é realizado pode servir de co-substrato na reação enzimática e a maior parte dos processos eletroxidativos sobre a platina ocorre quando uma superfície de óxido a recobre (Khudaish, 1999).

Normalmente, utilizam-se potenciais próximos aos de formação deste filme para detecções que envolvam oxidação do analito, já que potenciais mais baixos podem

contribuir para a remoção/redução dos óxidos adsorvidos. Encontram-se, na literatura, diversos sensores com potenciais de detecção do peróxido próximos de 700 mV, conforme Tabela 2.2 apresentada na Seção 2.7.

4.3 Preparação do eletrodo modificado

O voltamograma do eletrodo de Pt na solução de eletropolimerização pode ser visto na Figura 4.4 (a). Percebe-se, pela inclinação da curva, que a polimerização do pirrol sobre a superfície da platina é mais favorável a partir de 650 mV. A partir desse gráfico e de valores utilizados por outros autores (Tabela 2.2), escolheu-se o potencial de 650 mV para realizar a eletropolimerização.

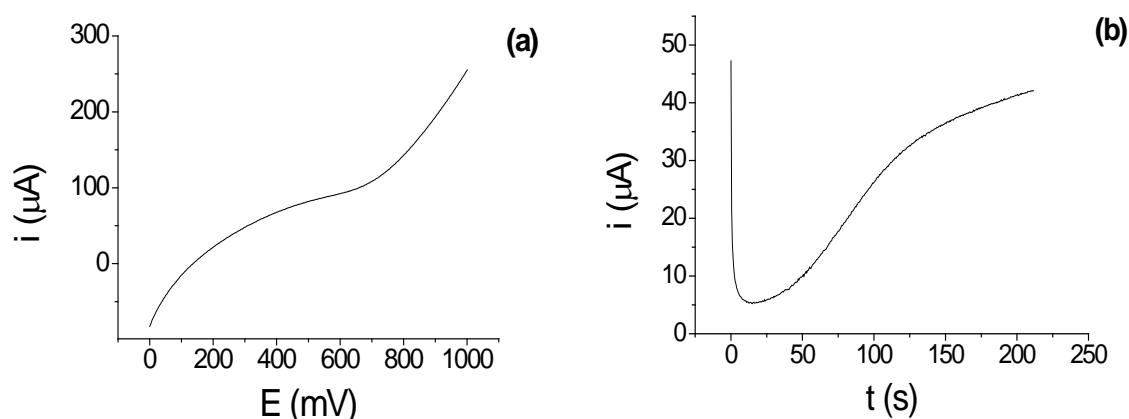


Figura 4.4: (a) Voltamograma linear do eletrodo de Pt na solução de eletropolimerização. Velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. (b) Amperograma da eletropolimerização do pirrol sobre eletrodo de platina. Carga total: 5,3 mC. Potencial aplicado: 650 mV.

O amperograma gerado durante a eletropolimerização do pirrol é exibido na Figura 4.4 (b). Inicialmente, a corrente diminui pela formação de uma dupla camada elétrica (etapa denominada de período de indução), seguido de um aumento da corrente durante a formação do polipirrol, devido ao aumento da superfície ativa do eletrodo, comportamento tipicamente observado na eletropolimerização de filmes condutores.

Para que o eletrodo modificado fosse capaz de identificar o peróxido de hidrogênio necessitou ser submetido a um processo oxidativo. Para isso aplicou-se um potencial de 700 mV por 100 minutos no eletrodo de Pt modificado com PPy imerso em uma solução tampão de fosfato salino. Verificou-se uma rápida diminuição inicial da corrente, seguida de uma lenta estabilização em menores valores de corrente.

Segundo Bélanger *et al* (1989), Fortier *et al* (1990) e Schuhmann (1995), quando o filme de polipirrol está ativo para reações redox, o peróxido o oxida antes de difundir até a superfície do eletrodo e, portanto, uma prévia sobre-oxidação do polímero se faz necessária.

Voltamogramas cíclicos (Figura 4.5) foram realizados antes e depois deste tratamento, de modo a verificar a diminuição da atividade redox do polímero. No voltamograma realizado previamente à sobre-oxidação, nota-se a curva característica do polipirrol contendo picos redox do polímero. Quando o polipirrol está no estado oxidado, possui cargas positivas residuais que são eletroneutralizadas pela presença de dopantes, conforme descrito na Seção 2.6.1. Durante a redução do filme, o PPy encontra-se no

estado neutro e, caso o dopante seja um ânion suficientemente pequeno para se liberar da rede polimérica, ocorre sua saída. Assim, no pico de redução em torno de -200 mV, por exemplo, ocorre a exclusão do cloreto, dopante utilizado neste trabalho.

Neste mesmo gráfico, no voltamograma obtido após a sobre-oxidação do polímero, percebe-se que, de fato, houve a diminuição na atividade redox do polipirrol. A intensidade de corrente medida neste intervalo de potencial é notavelmente menor quando comparada com o filme recém preparado, i.e., o polipirrol perdeu boa parte de sua capacidade de transferir elétrons.

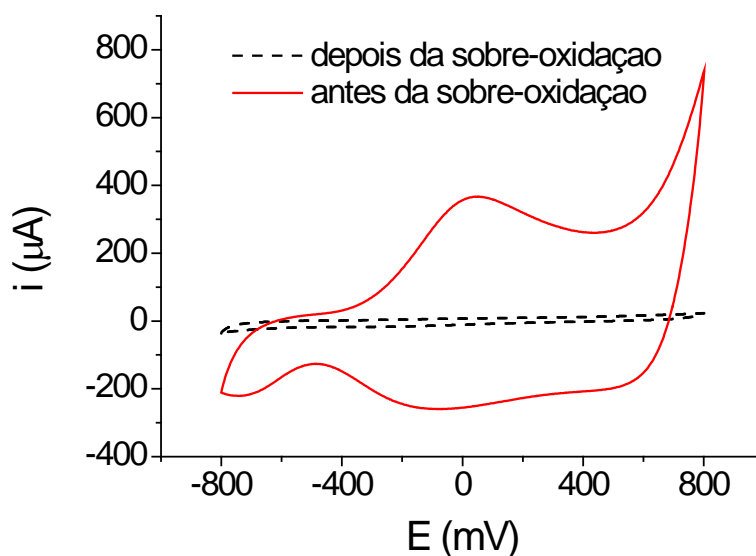


Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos antes e depois da sobre-oxidação do filme de polipirrol em solução tampão de fosfato salino. Velocidade de varredura: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Intervalo de varredura: -800 a 800 mV. A varredura iniciou em -800 mV.

4.4 Caracterização do filme polimérico

4.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Realizou-se microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme de polipirrol com a enzima encapsulada (Figura 4.6). Percebe-se uma superfície relativamente lisa do polímero com pequenas formações globulares do PPy. De acordo com a literatura, filmes espessos de polipirrol normalmente apresentam uma estrutura globular bastante desenvolvida com morfologia denominada de “couve-flor” (como pode ser visto na Figura 4.7 (a)), enquanto que filmes mais finos, preparados em condições semelhantes, apresentam morfologias similares a obtida neste trabalho, conforme pode ser visto na Figura 4.7 (b).

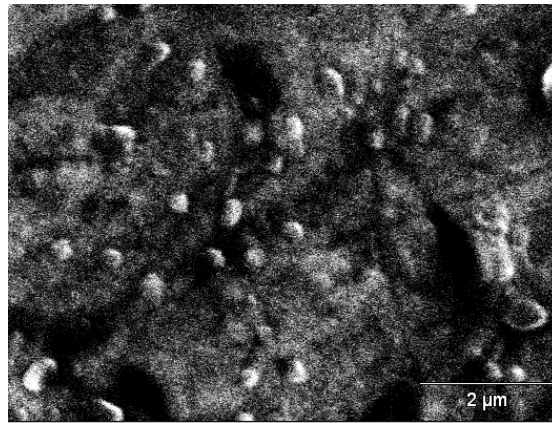


Figura 4.6: MEV da superfície do filme PPy/GOx sobre eletrodo de platina. Carga de eletropolimerização de 75 mC cm^{-2} .

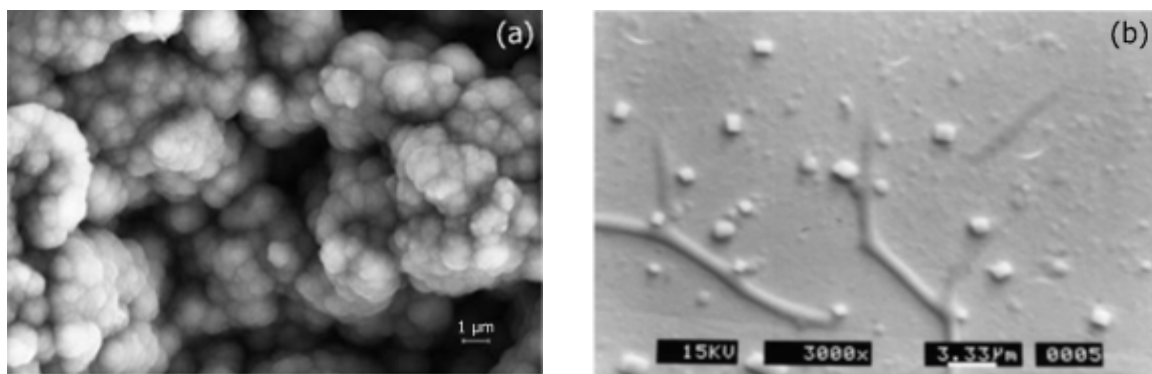


Figura 4.7: MEVs da superfície do filme PPy/GOx sobre eletrodo de platina
(a) Carga de eletropolimerização de 1860 mC.cm^{-2} . (Wang, J. *et al.*, 2005)
(b) Carga de eletropolimerização de 100 mC.cm^{-2} . (Uang e Chou, 2003)

4.4.2 Espectroscopia no Infravermelho (FT-IV)

Os espectros de infravermelho de refletância para a GOx livre e para os filmes de PPy com e sem GOx podem ser vistos na Figura 4.8.

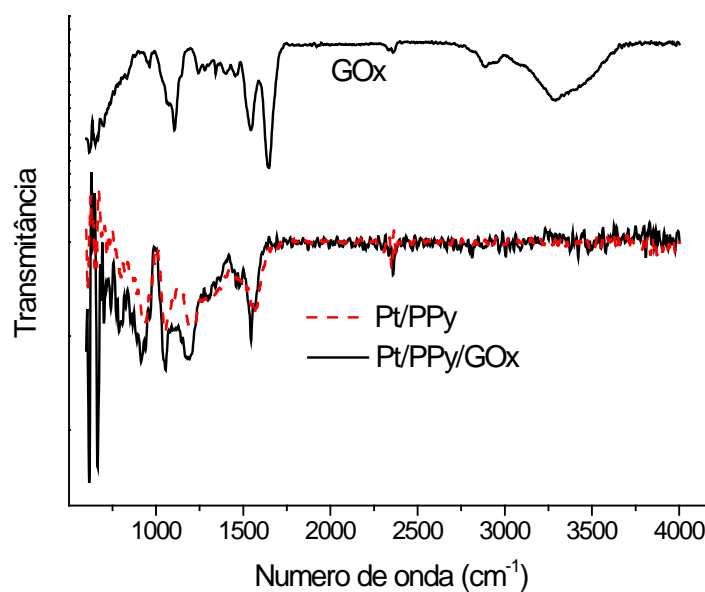


Figura 4.8: Espectro infra-vermelho da GOx livre e dos filmes de PPy com e sem GOx.

O espectro para a GOx livre apresenta suas bandas características de amida (Liang e Zhuobin, 2003): 1650 cm^{-1} (estiramento C=O de amida das ligações peptídicas), 1500 cm^{-1} (flexão N-H e estiramento C-N de amida dos grupos peptídicos). Além destas bandas, é possível identificar os seguintes grupos: 3250 cm^{-1} (estiramento N-H e O-H), 2900 cm^{-1} (estiramento C-H aromático), 1100 cm^{-1} (vibração C-H).

As bandas características do polipirrol estão localizadas em: 1545 cm^{-1} (estiramento C-H do anel), 1460 cm^{-1} (estiramento C-H do anel), 1200 cm^{-1} (deformação C-N), 1037 cm^{-1} (vibração C-H) e 900 cm^{-1} (deformação C-H no plano).

O filme de PPy com GOx imobilizada apresenta as mesmas bandas do filme de PPy sem enzima e não foram detectadas as bandas características da GOx em $2700\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$. Isso provavelmente se deve ao fato de haver uma concentração muito baixa de GOx imobilizada no filme, o que dificulta a detecção de suas bandas.

Além disso, as bandas detectadas em 1100 , 1500 e 1650 cm^{-1} para a GOx livre podem estar sobrepostas com os modos vibracionais atribuídos ao polipirrol no espectro Pt/PPy/GOx. Portanto, não foi possível determinar a presença de GOx no filme polimérico por essa técnica.

4.5 Eletrodos modificados na detecção de peróxido

Voltametrias cíclicas para os eletrodos modificados foram realizadas para identificar a região de oxidação do peróxido de hidrogênio (Figura 4.9). Os eletrodos modificados possuem uma região de oxidação, atribuída ao peróxido, que atinge maiores intensidades de corrente a partir de 700 mV .

De modo a facilitar a visualização das regiões de oxidação, os voltamogramas foram realizados da seguinte forma: a curva do eletrodo de Pt modificado foi realizada com o eletrodo modificado Pt/PPy em uma solução PBS com 4 mM de peróxido; curva similar foi obtida para o eletrodo modificado Pt/PPy/GOx e não é exibida. A curva do eletrodo de Pt não modificado foi realizada com o eletrodo de platina imerso em uma solução PBS com 2 mM de peróxido. A curva do branco foi realizada com eletrodo de platina não modificado em uma solução de PBS sem peróxido; curva similar foi obtida para o branco realizado com eletrodos de platina modificados e não é exibida.

A presença do filme de polipirrol deslocou a região de corrente máxima de oxidação do peróxido (a partir de 700 mV) em relação ao eletrodo de platina sem modificação (a partir de 350 mV , visto anteriormente na Figura 4.1 (b) e exibido novamente no gráfico abaixo). O potencial de detecção do peróxido de hidrogênio relatado em diversos estudos que se utilizam de eletrodos modificados similares está de acordo com o observado neste trabalho, conforme revisado no Capítulo 2.

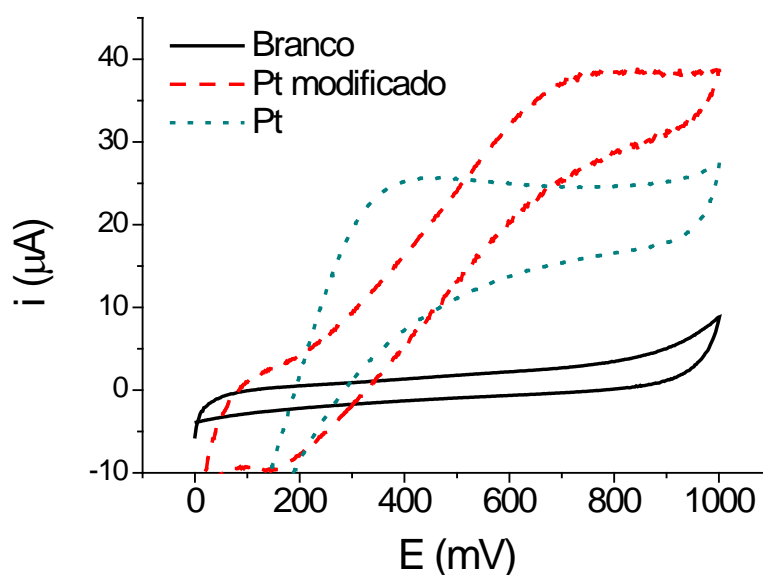


Figura 4.9: Voltamogramas cíclicos na detecção de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino. Velocidade de varredura: 100 mV s^{-1} . Intervalo de varredura: 0 a 1000 mV. A varredura iniciou em 0 mV. Branco (Pt): sem peróxido. Pt: detecção de 2 mM de peróxido. Pt modificado (Pt/PPy): detecção de 4 mM de peróxido.

4.6 Testes de difusão do peróxido de hidrogênio

Considerações sobre o transporte de massa são de extrema importância para um melhor entendimento do complexo mecanismo que rege a detecção de um analito. Nesta seção, a difusão do peróxido de hidrogênio foi analisada de forma qualitativa através de amperometrias (potencial fixo em 700 mV) para diversos valores de velocidade angular dos eletrodos (Pt, Pt/PPy e Pt/PPy/GOx). Os testes foram realizados com 4 mM do analito em solução PBS.

Os resultados obtidos pelos amperograma encontram-se na Figura 4.10. Os dados para construção do gráfico foram calculados como a média das duplicatas realizadas nos valores de intensidade de corrente no estado estacionário. Observa-se que o sinal para os 3 eletrodos, na ausência de agitação, é praticamente o mesmo, indicando que o filme é fino o suficiente de modo a não impor barreira de difusão significativa para o peróxido, o que está de acordo com o que foi inferido da imagem MEV apresentada anteriormente (Figura 4.6).

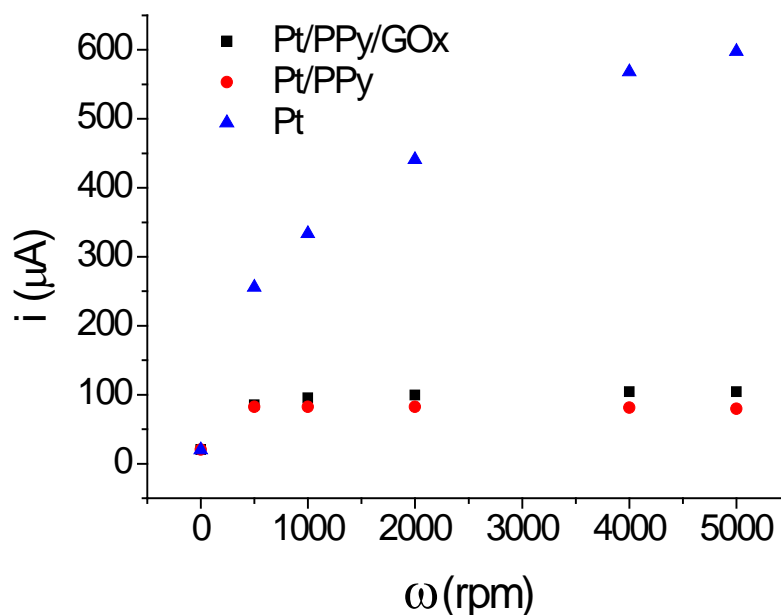


Figura 4.10: Influência da velocidade angular do eletrodo na intensidade da corrente de resposta no estado estacionário durante detecção de 4 mM de peróxido de hidrogênio em solução tampão de fosfato salino.

Além disso, percebe-se que, para o eletrodo de platina não modificado, o aumento da velocidade angular do eletrodo aumenta o sinal medido. Nos estudos de Khudaish (1999), a difusão do peróxido foi analisada e também verificou-se que a intensidade de corrente aumentava com a velocidade angular do eletrodo (de 630 a 10000 rpm). O aumento na corrente é esperado, uma vez que o transporte de massa de peróxido do meio aumenta.

Contudo, na presença do filme polimérico, a partir de 500 rpm, não se nota mudança significativa na corrente medida com aumento da velocidade de rotação do eletrodo, ou seja, a resposta do sensor é controlada pela cinética das reações de oxidação de peróxido na platina. Esse fenômeno provavelmente se deve à menor área superficial disponível no eletrodo quando há filme presente, i.e., há uma menor superfície catalítica.

4.7 Testes de difusão da glicose

A difusão de glicose foi analisada de forma qualitativa através de amperometrias (potencial fixo em 700 mV) para diversos valores de velocidade angular do eletrodo modificado (Pt/PPy/GOx) em uma solução de PBS com 5 mM de glicose.

Os resultados obtidos pelos amperogramas encontram-se na Tabela 4.1. Os dados para construção da tabela foram calculados como a média das duplicatas realizadas nos valores de intensidade de corrente no estado estacionário.

Tabela 4.1: Intensidade de corrente no estado estacionário para diferentes velocidades angular do eletrodo em uma solução PBS com 5 mM de glicose.

ω (rpm)	i (μA)	DPA*
0	0,282	0,005
200	0,232	0,005
500	0,217	0,004
1000	0,194	0,006
2000	0,204	0,005

*DPA: desvio padrão absoluto

De acordo com a tabela acima, a presença de rotação no eletrodo diminui a resposta do sensor (em torno de 18 %), quando comparado com o eletrodo estático; este resultado é similar ao obtido por Fortier *et al.* (1990). A partir de 500 rpm, todavia, a intensidade de corrente parece se estabilizar, denotando limitação e controle pela cinética da reação enzimática no processo.

A diminuição inicial da corrente possivelmente se deve à redução do tempo de contato entre glicose e enzima, causada pelo fluxo advectivo. Dessa forma, uma menor quantidade de glicose reage com a GOx, gerando menos peróxido de hidrogênio para ser oxidado na superfície da platina.

4.8 Detecção de glicose: curva de calibração e análise cinética

O eletrodo modificado Pt/PPy/GOx foi submetido à detecção de alíquotas de glicose adicionadas em solução PBS. As medições foram feitas por amperometrias com potencial fixo em 700 mV por 2 minutos. Os valores utilizados na Figura 4.11 foram calculados como a média das triplicatas após o tempo necessário para a corrente estabilizar, i.e., atingir o estado estacionário.

O gráfico exibe um desvio maior da linearidade para maiores valores de concentração de glicose. Os desvios padrões absolutos entre as medidas foram calculados e são exibidos na curva, o maior desvio padrão relativo foi de 2,9 %. O tempo de resposta do sensor - tempo para atingir 95 % do valor de intensidade de corrente no estado estacionário - variou com a concentração de glicose detectada (maior para menores concentrações) e a resposta mais lenta foi de 80 segundos.

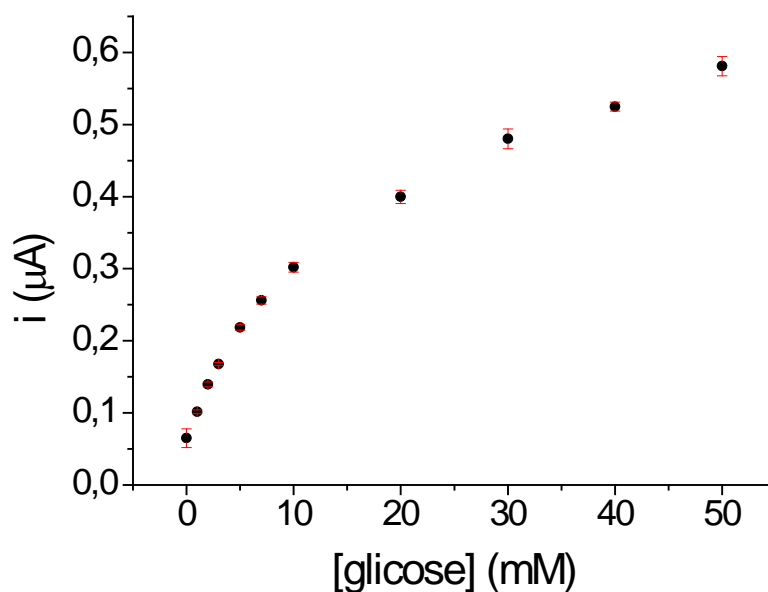


Figura 4.11: Curva relacionando intensidade da corrente e concentração de glicose com os desvios padrões absolutos exibidos a cada ponto.

Linhas de tendência foram feitas para porções lineares do gráfico anterior, de modo a gerar curvas de calibração (Figura 4.12). Obteve-se um coeficiente de determinação, R^2 , de 0,996 para os 4 primeiros pontos da curva (0 a 3 mM) e de 0,982 para os 6 primeiros pontos (0 a 7 mM).

A partir destas curvas, a sensibilidade e o limite mínimo de detecção foram calculados. A sensibilidade é dada pelo coeficiente angular e foi normalizada pela área superficial do eletrodo. O limite mínimo de detecção, em estudos que desenvolvem este tipo de sensor, normalmente é calculado por $3 \times \left(\frac{\text{desvio padrão absoluto}}{\text{coeficiente angular}} \right)$, considerando a relação $\frac{\text{sinhal}}{\text{ruído}} = 3$ (Brahim *et al.*, 2002; Njagi e Andreescu, 2007). Estes parâmetros estão sumarizados na Tabela 4.2.

Na literatura, encontram-se diversos valores para estes parâmetros, conforme Tabela 2.3, exibida anteriormente. Os valores de sensibilidade, por exemplo, diferem bastante entre si – inclusive na ordem de grandeza – e alguns autores não o fornecem; portanto, é difícil realizar uma comparação.

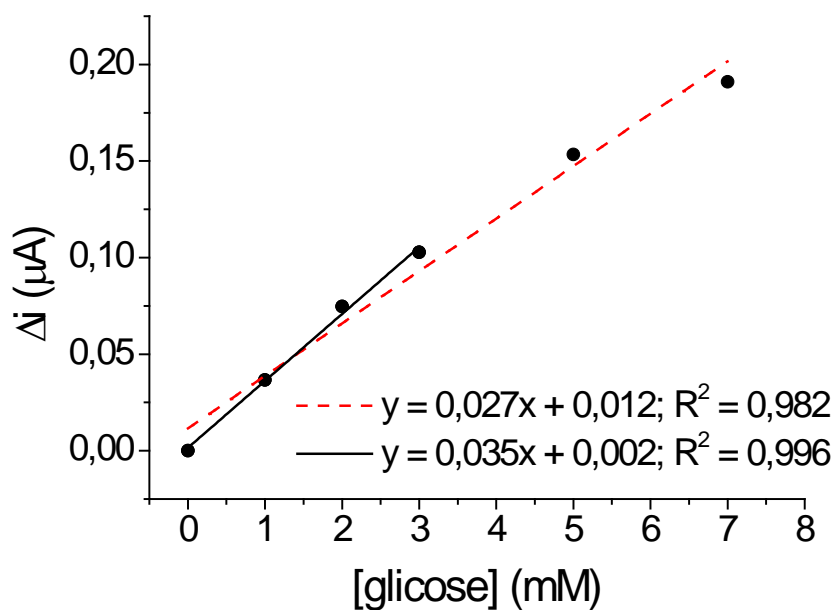


Figura 4.12: Curvas de calibração para detecção de glicose

Tabela 4.2: Parâmetros obtidos das curvas de calibração

Intervalo linear (mM):	0-3	0-7
R^2 :	0,996	0,982
Sensibilidade ($\mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$):	0,490	0,384
Limite de detecção (mM):	0,23	0,29

Os parâmetros cinéticos, $I_{\text{máx}}$ e K_m , foram calculados através de ajustes lineares da Equação 3.2. Os gráficos gerados podem ser vistos na Figura 4.13.

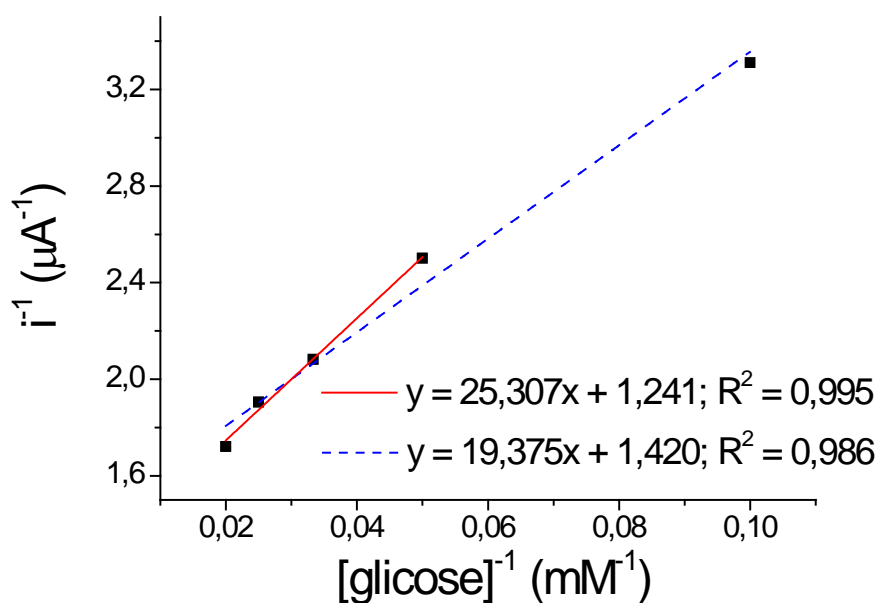


Figura 4.13: Gráficos de Lineweaver-Burk

Desvios da linearidade foram observados para baixas concentrações (abaixo de 10 mM), indicando limitações cinéticas (Fortier *et al.*, 1990). Análise mais profunda do intervalo de validade da equação pode ser requerida; mas, para fins comparativos com a literatura, consideraram-se aqui dois intervalos - a partir de 10 mM - para o ajuste linear. Os valores obtidos para as constantes cinéticas foram $I_{m\acute{a}x} = 0,81 \mu A$ e $K_m = 20,40$ mM para o intervalo mais curto e $I_{m\acute{a}x} = 0,70 \mu A$ e $K_m = 13,65$ mM para o outro. Estes últimos valores encontram-se na Tabela 4.3, juntamente com valores retirados da literatura para a enzima livre e para a enzima imobilizada em outros sensores com PPy revisados no Capítulo 2.

A constante de Michaelis-Menten serve para avaliar a atividade enzimática e é definida como a concentração de substrato para a qual a velocidade da reação enzimática é metade da máxima. Valores menores para a constante de Michaelis-Menten indicam maior afinidade entre enzima e substrato (Segel, 1976).

Dessa forma, percebe-se, através da Tabela 4.3, que a enzima foi apropriadamente encapsulada e apresenta boa atividade enzimática e alta afinidade pela glicose quando imobilizada no sensor desenvolvido neste trabalho ao se comparar com a maioria dos demais estudos que se utilizam do polipirrol para a imobilização, exceto Cosnier *et al.* (1999). Além disso, de acordo com Njagi e Andreescu (2007), altos valores para a constante de Michaelis-Menten podem indicar a existência de limitações difusionais dentro do filme polimérico; assim, o baixo valor obtido neste trabalho está de acordo com os resultados dos testes de difusão da glicose que indicaram a ausência de controle difusivo na sua detecção e reafirmam a pequena espessura do filme.

Tabela 4.3: Valores dos parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho e em demais referências

	Fortier <i>et al.</i> (1990)	Cosnier <i>et al.</i> (1999)	Brahim <i>et al.</i> (2002)	Uang e Chou (2003)	Chen <i>et al.</i> (2006)	Njagi e Andreescu (2007)	Este trabalho	GOx livre (Bao <i>et al.</i> , 2001 apud Wong <i>et al.</i> , 2008)
K_m (mM)	33,4	0,45	43,7	37,6	23,3	43,45	13,65	198-248
$I_{m\acute{a}x}$ (μA)	7,2	-	19,42	0,3	5,88	48,75	0,70	-

4.9 Reprodutibilidade e Estabilidade do Sensor

A reprodutibilidade do sensor foi avaliada desenvolvendo 2 sensores através da mesma metodologia. Calcularam-se os desvios padrão relativo entre os valores de intensidade de corrente no estado estacionário de cada sensor para 3 concentrações de glicose diferentes (5, 20 e 50 mM). A média destes desvios foi de 4,95 %. Esse valor pode ser comparado com valores da literatura, exibidos anteriormente na Tabela 2.1 e na Tabela 2.3, os quais variam de 1,36 a 5,8 %. Portanto, o sensor produzido neste trabalho é considerado reprodutível, provavelmente devido à simplicidade da metodologia empregada.

Mediu-se a intensidade de corrente gerada com a detecção de 20 mM de glicose logo após a elaboração do sensor e durante os 12 dias seguintes. Os resultados permitiram

avaliar a estabilidade do sensor: após 12 dias o sensor ainda mantinha 92 % de sua resposta inicial. Encontram-se resultados diversos para a estabilidade de sensores em outros estudos (Tabela 2.1 e Tabela 2.3), como, por exemplo: 70 % da resposta após 7 dias ou após 8 meses, 81 % da resposta após 10 ou 50 dias, entre outros. Dessa forma, pode-se dizer que o sensor elaborado aqui é estável. As condições brandas durante a eletropolimerização e o ambiente favorável para as enzimas fornecido pelo polipirrol podem ser fatores que explicam essa estabilidade.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

Um biossensor eletroquímico para detecção de glicose foi desenvolvido com sucesso. Durante o desenvolvimento, tentou-se entender e explicar os processos e mecanismos envolvidos e os relacionar com o que já existe na literatura.

Verificou-se que eletrodos de carbono vítreo não possuem superfície catalítica para oxidar o peróxido de hidrogênio, mas essa reação ocorre sobre eletrodos de platina. A presença de filme polimérico sobre o eletrodo de platina desloca a região de potencial ótima para detecção do peróxido de hidrogênio (a partir de 700 mV) quando comparado com o eletrodo de platina não modificado (a partir de 350 mV). A região de potencial de eletropolimerização do pirrol foi analisada, através de voltamograma, e ocorre a partir de 650 mV.

A detecção de glicose só foi possível com um pré-tratamento adequado do eletrodo e com a sobre-oxidação do filme de polipirrol. Isto demonstra a importância da formação de filmes de óxido na superfície da platina para a formação de filmes poliméricos finos e para o fornecimento de oxigênio para as reações de oxidação. Além disso, foi evidenciada a relevância da inativação redox do filme polimérico para que o peróxido de hidrogênio não o oxide e seja detectado na superfície do eletrodo.

Observou-se que diversos resultados obtidos se devem à pequena espessura do filme polimérico que permite a detecção das espécies sem impor barreira difusiva significativa. A limitação na detecção de glicose com o sensor desenvolvido nesse trabalho é puramente cinética. Essas observações foram feitas inicialmente a partir de análises de imagens de MEV, nas quais o indicativo de filmes finos foi inferido pela pequena presença de formações globulares na estrutura superficial. Em seguida, isso foi confirmado a partir de testes de difusão do peróxido, nos quais notou-se que a presença do filme polimérico não alterou a corrente medida na ausência de agitação e que na presença do polímero a etapa cinética é a limitante. Nos testes de difusão de glicose, foi verificado que o polímero também não impôs barreira difusiva para o transporte da mesma, havendo controle cinético pela reação enzimática no processo. Além disso, a análise cinética por Michaelis-Menten permitiu obter a constante K_m , cujo valor (13,65 mM) indica ótima atividade enzimática e ausência de limitação difusiva.

As análises dos espectros de infravermelho, apesar de não permitirem inferir a presença de enzima no filme de polipirrol, serviram para caracterizar os compostos através da verificação da presença dos grupos funcionais.

Por fim, obteve-se um biossensor estável (92 % de atividade após 12 dias) e reprodutível (desvio padrão de 4,95 %) através do uso de uma metodologia simples com a qual a polimerização e a imobilização enzimática ocorrem em uma única etapa.

Sugestões para trabalhos futuros consistem em testar a resposta que se obtém frente a interferentes e otimizar o biossensor em relação à concentração de enzima, de polímero, espessura do filme, entre outros. Além disso, o uso de mediadores no transporte de elétrons seria interessante de modo a aumentar a sensibilidade do sensor, diminuir a dependência do pré-tratamento da superfície do eletrodo de platina na

detecção do analito e, possivelmente, eliminar a necessidade de sobre-oxidação do filme de polipirrol. Um próximo passo seria a miniaturização do sensor para aplicações práticas em amostras de sangue e meios de cultivo celular, por exemplo.

6 Referências

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489-501, 2009/8// 2009. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000536> >.

BARATON, M.-I. **Sensors for Environment, Health and Security**. *Advanced Materials and Technologies*. Limoges, France: Springer 2009. ISBN 978-1-4020-9009 -7

BOCKRIS, J. O. M.; KHAN, S. U. M. **Surface Electrochemistry**. New York: Springer US, 1993. 1014. ISBN-13: 978-0306443398

BRAHIM, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1–2, p. 53-59, 2002. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566301002627> >.

BÉLANGER, D.; NADREAU, J.; FORTIER, G. Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 274, n. 1–2, p. 143-155, 1989. ISSN 0022-0728. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022072889870366> >.

CHEN, C.; JIANG, Y.; KAN, J. A noninterference polypyrrole glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 5, p. 639-643, 2006. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566306000467> >.

CHUNG, T. D. In vitro evaluation of the continuous monitoring glucose sensors with perfluorinated tetrafluoroethylene coatings. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 514-516, 2003. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0038013956&partnerID=40&md5=cac05c992f781c60abbee6094f8371d4> >.

CONWAY, B. E.; GOTTESFELD, S. Real condition of oxidized platinum electrodes. Part 2.- Resolution of reversible and irreversible processes by optical and impedance studies. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases**, v. 69, n. 0, p. 1090-1107, 1973. ISSN 0300-9599. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/F19736901090> >.

COSNIER, S. et al. A glucose biosensor based on enzyme entrapment within polypyrrole films electrodeposited on mesoporous titanium dioxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 469, n. 2, p. 176-181, 1999. ISSN 1572-6657. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072899002235> >.

DAS, I. et al. Fractal Growth Kinetics and Electric Potential Oscillations during Electropolymerization of Pyrrole. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 113, n. 18, p. 5296-5301, 2009/06/21 2009. ISSN 1089-5639. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jp8064147> >.

DEOROSAN, B.; NAUMAN, E. A. The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. n. 1687-9678 (Electronic), 2011.

DESCHEPPER, M. et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 7, p. 1505-1514, 2011. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01138.x> >.

FANG, Y. et al. Biocompatibility of CS-PPy nanocomposites and their application to glucose biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 88, n. 0, p. 1-7, 2012. ISSN 1567-5394. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539412000837> >.

FORTIER, G.; BRASSARD, E.; BÉLANGER, D. Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 5, n. 6, p. 473-490, 1990. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095656639080036D> >.

GEORGE, P. M. et al. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials*, v. 26, n. 17, p. 3511-3519, 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296120400866X> >.

GUSTAVSSON, J. **Sensors for in vitro Bone Tissue Engineering Applications** 2011. (Biomedical Engineering Doctoral Programme). Department of Materials Science and Metallurgy, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona (Spain).

HRAPOVIC, S. et al. Electrochemical Biosensing Platforms Using Platinum Nanoparticles and Carbon Nanotubes. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 4, p. 1083-1088, 2014/03/24 2003. ISSN 0003-2700. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ac035143t> >.

KHUDAISH, E. A. **The Electrochemical Oxidation Of Hydrogen Peroxide On Platinum Electrodes At Phosphate Buffer Solutions**. 1999. 236 (Doctor Degree). Chemistry Department, Massey University, New Zeland.

LIANG, W.; ZHUOBIN, Y. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase at a Gold Electrode Modified with Single-Wall Carbon Nanotubes **Sensors**, v. 3, p. 544-554, 2003.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2435-2453, 2005. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566304005470> >.

NJAGI, J.; ANDREESCU, S. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au-polypyrrole nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 2, p. 168-175, 2007. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566307001959> >.

SADKI, S. et al. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 5, p. 283-293, 2000. ISSN 0306-0012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/A807124A> >.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012/6// 2012. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501100156X> >.

SCHUHMANN, W. Electron-transfer pathways in amperometric biosensors. Ferrocene-modified enzymes entrapped in conducting-polymer layers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 10, n. 1-2, p. 181-193, 1995. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566395968059> >.

SEGEL, I. H. **Biochemical Calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry**. 2nd. USA: John Wiley & Sons, Inc., 1975. 464.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007. ISSN 1615-4169. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/adsc.200700082> >.

SINGH, M.; KATHUROJU, P. K.; JAMPANA, N. Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n. 1, p. 430-443, 2009. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400509006947> >.

SITTA, E. et al. Electrocatalysis of H₂O₂ reduction/oxidation at model platinum surfaces. **Electrochemistry Communications**, v. 33, n. 0, p. 39-42, 2013. ISSN 1388-2481. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248113001549> >.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9th. Belmont, USA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013. 1088.

STEINER, M.-S.; DUERKOP, A.; WOLFBEIS, O. S. Optical methods for sensing glucose. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 9, p. 4805-4839, 2011. ISSN 0306-0012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C1CS15063D> >.

UANG, Y.-M.; CHOU, T.-C. Fabrication of glucose oxidase/polypyrrole biosensor by galvanostatic method in various pH aqueous solutions. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2003. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566303001684> >.

UNNIKISHNAN, B.; PALANISAMY, S.; CHEN, S.-M. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 70-75, 2013. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312004046> >.

WALTMAN, R. J.; BARGON, J. Electrically conducting polymers: a review of the electropolymerization reaction, of the effects of chemical structure on polymer film properties, and of applications towards technology. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 76-95, 2014/06/20 1986. ISSN 0008-4042. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1139/v86-015> >.

WANG, J. Electrochemical Glucose Biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2014/06/14 2007. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr068123a> >.

WANG, J. et al. Glucose oxidase entrapped in polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: a model platform for sensitive electroenzymatic biosensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 575, n. 1, p. 139-146, 2005. ISSN 1572-6657. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072804004796> >.

WANG, Y. et al. Carbon nanotube/chitosan/gold nanoparticles-based glucose biosensor prepared by a layer-by-layer technique. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 1, p. 50-54, 2009. Disponível em: < <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-61349177942&partnerID=40&md5=707f13ac55ee54d3ac22acb0741294a8> >.

WONG, C.; WONG, K.; CHEN, X. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 6, p. 927-938, 2008. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4> >.

WU, Q. et al. Organization of glucose-responsive systems and their properties. n. 1520-6890 (Electronic), 2011.

YANG, H. et al. Glucose sensor using a microfabricated electrode and electropolymerized bilayer films. n. 0956-5663 (Print), 2002.

YANG, Z. et al. Facile synthesis of tetragonal columnar-shaped TiO₂ nanorods for the construction of sensitive electrochemical glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 54, n. 0, p. 528-533, 2014. ISSN 0956-5663. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313008336> >.

ZHANG, H. et al. A novel glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase incorporated in biomediated gold nanoparticles-carbon nanotubes composite film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 158, n. 1, p. 23-27, 2011. ISSN 0925-4005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400511003546> >.