

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais
PPGEM

**METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE BIOSSENSORES
AMPEROMÉTRICOS ENZIMÁTICOS UTILIZANDO POLÍMEROS
CONDUTORES: CASO POLIANILINA**

Betina Hansen

Dissertação para obtenção do título
MESTRE EM ENGENHARIA

Porto Alegre
2011

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais
PPGEM

**METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE BIOSSENSORES
AMPEROMÉTRICOS ENZIMÁTICOS UTILIZANDO POLÍMEROS
CONDUTORES: CASO POLIANILINA**

Betina Hansen

Engenheira de Materiais

Trabalho realizado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre

2011

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração de Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz (FK Biotecnologia)

Dr^a. Alessandra Fiorini Baldissera (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Jane Zoppas Ferreira (PPGEM)

Prof. Dr. Telmo R. Strohaecker
Coordenador do PPGEM

AGRADECIMENTOS

*A minha família, pelo carinho, incentivo
e por sempre acreditarem na minha capacidade.*

Agradecimentos

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento.

Principalmente ao professor Dr. Carlos Arthur Ferreira pela dedicação e orientação.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL) da Escola de Engenharia da UFRGS, sobretudo aos colegas da sala 111, Eliane, Cristiane, Larissa, Franciéli, Rafael, Mauro e José Manoel pelo apoio e amizade. Um agradecimento especial à colega e amiga Marcele Arais Hocevar por estes dois anos de convivência, trabalho e amizade os quais foram essenciais para o sucesso deste trabalho.

Ao bolsista de iniciação científica Lucas S. Karpouzas pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos colegas da FK Biotecnologia, principalmente ao Alexandre Mello e à Márcia Polese pela ajuda nos testes colorimétricos e longas discussões sobre enzimas.

Ao professor Dr. Alvaro Meneguzzi pela ajuda na realização dos ensaios de voltametria cíclica.

Ao Laboratório de Resistividade do Instituto de Física da UFRGS, em especial ao Jorge, pelo auxílio nas medidas de condutividade.

À minha família e em especial aos meus pais Irineu e Maria da Graça pelo apoio incondicional, incentivo, segurança e amor. Sem vocês este trabalho não seria possível, amo vocês.

Ao meu namorado Ricardo pela paciência ao meu lado nos inúmeros fins de semana em casa, escrevendo. Pelo amor e companheirismo.

À UFRGS, PPGEM, CNPq e FK Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro.

Trabalhos Produzidos

Trabalhos publicados em anais de congressos

- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Synthesis and characterization of polyacid doped polyaniline composites. ISNaPOL, Gramado, setembro 2010 (*Trabalho completo*).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Nanocomposites of polyaniline produced with different concentrations of poly(styrene sulfonic). ISNaPOL, Gramado, setembro 2010 (*Trabalho completo*).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Influência da concentração de poliestireno sulfonado na formação de compósitos com nanofibras de polianilina. CBECiMat, Campos do Jordão, novembro 2010 (*Trabalho completo*).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Polianilina convencional ou polianilina nanoestruturada para produção de biossensores para detecção de peróxido de hidrogênio. CBECiMat, Campos do Jordão, novembro 2010 (*Trabalho completo*).

Trabalhos aceitos para publicação em anais de congressos

- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Estudos eletroquímicos da polianilina e polianilina dopada com poliestireno sulfonado. CBPol, Campos do Jordão, outubro 2011 (*Trabalho completo*).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. A influência de nanoestruturas de polianilina e polipirrol na imobilização de HRPO. CBPol, Campos do Jordão, outubro 2011 (*Trabalho completo*).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Estudo da imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (*Trabalho completo*).

- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Caracterização colorimétrica e amperométrica da horseradish peroxidase imobilizada em polianilina. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (*Trabalho completo*).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Estudo do uso de polipirrol como agente de imobilização para enzima horseradish peroxidase. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Imobilização de enzima horseradish peroxidase em polipirrol e na presença de um poliânion. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Polímeros intrinsecamente condutores	4
3.1.1 Mecanismo de Condução	6
3.2 A polianilina	9
3.2.1 Síntese.....	12
3.2.1.1 Nanoestruturas	14
3.2.2 Processabilidade.....	17
3.3 Enzimas	18
3.3.1 Noções gerais.....	18
3.3.2 Atividade enzimática.....	20
3.3.3 Especificidade enzimática	21
3.3.4 Classificação.....	22
3.3.4.1 Peroxidases	24
3.3.5 Processos de imobilização de enzimas	27
3.3.5.1 Adsorção Física	28
3.3.5.2 Ligação Covalente	30
3.3.5.3 Entrapment	30
3.3.5.4 Confinamento.....	31
3.4 Biossensores	32
3.4.1 Conceitos e definições	32
3.4.1.1 Receptor bioquímico	33
3.4.1.2 Transdutor.....	34
3.4.1.2.1 Biossensores amperométricos	35
3.4.1.2.2 Biossensores potenciométricos.....	36
3.4.2 Tecnologia de filmes espessos aplicados aos biossensores	36
3.5 Polímeros condutores em biossensores	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Materiais	42
4.2 Síntese dos polímeros	43

4.2.1 Caracterização dos polímeros	45
4.2.1.1 FT-IR.....	45
4.2.1.2 MET	45
4.2.1.3 Condutividade elétrica	45
4.2.1.4 Voltametria cíclica.....	46
4.3 Produção das tiras teste.....	47
4.3.1 Caracterização das tiras teste.....	48
4.3.1.1 MO	48
4.3.1.2 MEV	48
4.3.1.3 Voltametria cíclica.....	49
4.4 Imobilização da enzima e caracterização dos biossensores	50
4.4.1 Estudo da atividade da enzima livre e imobilizada.....	51
4.4.2 Estudo do método de imobilização da enzima.....	53
4.4.3 Estudo da influência da concentração de H ₂ O ₂	53
4.4.4 Estudo da sensibilidade do biossensor ao H ₂ O ₂	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Caracterização dos polímeros	56
5.1.1 FT-IR.....	56
5.1.2 MET.....	58
5.1.3 Condutividade elétrica.....	60
5.1.4 Voltametria cíclica.....	61
5.2 Caracterização das tiras teste	64
5.2.1 MO.....	64
5.2.2 MEV.....	66
5.2.3 Voltametria cíclica.....	67
5.3 Imobilização da enzima e caracterização dos biossensores	70
5.3.1 Estudo da atividade enzimática	71
5.3.2 Estudo do método da imobilização da enzima.....	73
5.3.3 Estudo da influência da concentração de H ₂ O ₂	76
5.3.4 Estudo da sensibilidade do biossensor ao H ₂ O ₂	79
6 CONCLUSÕES.....	83
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

Índice de Figuras

Figura 1 - Biossensores comerciais de glicose.	2
Figura 2 – Comparação da condutividade dos PICs com alguns materiais.	5
Figura 3 – Principais polímeros condutores.	5
Figura 4 – Esquema de bandas para materiais isolantes, semicondutores e condutores.....	6
Figura 5 - Modelo de bandas para um polímero condutor: a) polarons e b) bipolarons.....	7
Figura 6 – Representação esquemática do transporte de cargas via polaron na polianilina.	8
Figura 7 - Possíveis saltos dos portadores de carga onde A indica o transporte dentro da molécula, B o transporte entre as cadeias e C o transporte entre as partículas.....	8
Figura 8 - Estrutura geral da PANi.	10
Figura 9 - Estruturas ideais da PANi.	11
Figura 10 - Voltamograma cíclico da polianilina em meio ácido no intervalo de síntese, mostrando as cores dos diferentes estados de oxidação.	13
Figura 11 – Evolução do crescimento da polianilina durante a síntese convencional, explorada por MET. (A) nanofibras são produzidas nos primeiros estágios; (B) e (C), crescimento e aglomeração ao redor das fibras.....	15
Figura 12 - Ilustração da síntese interfacial. a) uma interface é formada entre a fase orgânica e a fase aquosa. b) nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa (superior). c) nanofibras se acumulam na fase aquosa.	16
Figura 13 - Ilustração da síntese por adição rápida. a) a solução oxidante é rapidamente adicionada à solução contendo anilina. b) uma solução homogênea é	

obtida, onde toda a anilina e oxidante estão bem distribuídos por toda a solução. c) todos os reagentes são consumidos na formação das nanofibras.....	16
Figura 14 – Estrutura química da PAni dopada com PSS.....	18
Figura 15 – Representação da energia de ativação (E_a) de uma reação não enzimática e uma reação enzimática. ΔG – energia livre de Gibbs, S – substrato e P – produto.	19
Figura 16 – Mecanismos de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (A) e a teoria do encaixe induzido (B).	22
Figura 17 – (A) Centro ativo de uma heme peroxidase, grupo Ferriprotoporfirina IX ou Hemina, (B) Representação 3D da HRP. Na região central da molécula é possível observar a estrutura ferriprotoporfirina IX e nas porções inferiores e superiores os dois cátions Ca^{2+} - esferas escuras.....	25
Figura 18 – Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença do H_2O_2 . AH representa o substrato redutor e $A\cdot$ o radical formado.	26
Figura 19 – Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática sobre um suporte. (A) adsorção física, (B) ligação covalente, (C) <i>entrapment</i> e (D) confinamento.....	29
Figura 20 - Representação gráfica dos constituintes de um biossensor.	34
Figura 21 – (A) Ilustração do processo de impressão pela colocação da pasta sobre o molde e espalhamento com espátula, (B) 10 eletrodos impressos.	37
Figura 22 – Desenho esquemático de uma tira teste produzida pela tecnologia de filmes espessos.....	38
Figura 23 – Aplicação de PICs como transdutores em biossensores.	40
Figura 24 – Fotos da reação da amostra de PAni com 20% em massa de PSS em (A) início da reação, (B) 30 minutos e (C) 1 hora.....	43
Figura 25 – Amostras sintetizadas (A) pH 1, (B) pH 5.....	44

Figura 26 – (A) Dimensões das trilhas do biossensor e (B) tela de serigrafia utilizada	47
Figura 27 – Tiras teste pintadas pelo método de <i>silk-screen</i> com as pastas de carbono e Ag/AgCl.	48
Figura 28 – Sistema utilizado para os testes de voltametria cíclica.	49
Figura 29 – Tiras comerciais produzidas pela EcoBioServices.	50
Figura 30 – Representação gráfica dos dados obtidos por cronoamperometria.	55
Figura 31 – Espectroscopia FT-IR das amostras poliméricas de pH 1. (A) PSS, (B) PANi, (C) PANi + PSS 5%, (D) PANi + PSS 10% e (E) PANi + PSS 20%.	57
Figura 32 - Espectroscopia FT-IR das amostras poliméricas de pH 5. (A) PSS, (B) PANi, (C) PANi + PSS 5%, (D) PANi + PSS 10% e (E) PANi + PSS 20%.	57
Figura 33 – Micrografias MET das amostras sintetizadas. (A) PANi; (B) PANi + PSS 5%, (C) PANi + PSS 10% e (D) PANi + PSS 20%.	59
Figura 34 – Voltamogramas cíclicos dos polímeros com valor de pH ajustado para 5 em HCl 1 M. O potencial foi ciclado de -0,2 a 1,0 V vs ECS com velocidade de varredura de 10 mV/s.	62
Figura 35 - Voltamogramas cíclicos dos polímeros com valor de pH ajustado para 5 em (A) KCl pH 5 e (B) PBS pH 7. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs ECS com velocidade de varredura de 10 mV/s.	63
Figura 36 – Microscopias ópticas de (A) trilha de carbono; (B) trilha de Ag/AgCl; e trilha de carbono coberta com: (C) PANi; (D) PANi + PSS 5%, (E) PANi + PSS 10% e (F) PANi + PSS 20%.	65
Figura 37 – Micrografias MEV das amostras de (A) PANi, (B) PANi + PSS 5%, (C) PANi + PSS 10% e (D) PANi + PSS 20%.	66

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos das tiras cobertas com os polímeros com pH ajustado para 5 em (A) KCl, pH 5 e (B) PBS, pH 7. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV/s.	68
Figura 39 – Voltamogramas cíclicos da tira comercial e da tira produzida neste trabalho em (A) KCl e (B) PBS. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV/s.	70
Figura 40 – Resposta espectroscópica para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PAni, PAni + PSS 5% e PAni + PSS 20%.	72
Figura 41 – Resposta espectroscópica da enzima livre, utilizando as concentrações diluídas em 10 vezes.....	73
Figura 42 – Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PAni, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.	74
Figura 43 - Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PAni + PSS 5%, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.	74
Figura 44 - Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PAni + PSS 20%, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.	75
Figura 45 – Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H ₂ O ₂ para a enzima imobilizada na amostra de PAni.	77
Figura 46 - Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H ₂ O ₂ para a enzima imobilizada na amostra de PAni + PSS 5%.	77
Figura 47 - Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H ₂ O ₂ para a enzima imobilizada na amostra de PAni + PSS 20%.	78
Figura 48 – Cronoamperometrias obtidas pela aplicação de um potencial constante de 0,6 V e adições sucessivas de 10 µL (0,14 mmol) de H ₂ O ₂ a cada 2 minutos.	79
Figura 49 – Corrente <i>versus</i> concentração de H ₂ O ₂ obtidas a partir da Figura 48....	80
Figura 50 – Resposta dos biossensores amperométricos em função do tempo.	81

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação internacional das enzimas.....	23
Tabela 2 – Nomenclatura das amostras produzidas.	44
Tabela 3 – Reagentes utilizados para os testes colorimétricos.....	52
Tabela 4 – Concentrações de H ₂ O ₂ utilizadas no ensaio colorimétrico.	54
Tabela 5 – Condutividade elétrica dos polímeros sintetizados determinada pelo método de 4 pontas.....	60

Lista de abreviaturas e símbolos

ρ	Resistividade elétrica ($\Omega\cdot\text{cm}$)
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
Da	Dalton
DMSO	Dimetil sulfóxido
E	Potencial (V)
E_0	Constante característica da membrana seletiva do biossensor
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
F	Constante de Faraday
HRP	Horseradish peroxidase
I	Corrente
M	Molar
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
n	Número de elétrons
n_{an}	Número de mol de anilina
n_e	Número de elétrons
n_{ox}	Número de mols de oxidante
PAni	Polianilina
PBS	Solução tampão de fosfato
PICs	Polímeros intrinsecamente condutores
PSS	Poliestireno sulfonado
PVC	Cloreto de Polivinila
R	Constante dos gases
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TMB	Tetrametilbenzidina
UI	Unidade Internacional
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
v_a	Taxa que a reação ocorre
w	Espessura da amostra
z	Carga iônica

Resumo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia para a produção de biossensores amperométricos enzimáticos a partir da imobilização da enzima em polímeros condutores. Para isto, tiras testes constituídas por três eletrodos foram produzidas a partir da técnica de *silk-screen* utilizando pastas condutoras de carbono e Ag/AgCl para a formação do eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência. Os polímeros estudados foram nanofibras de polianilina (PAni) e de polianilina dopada com diferentes porcentagens em massa de poliestireno sulfonado (PSS) os quais serviram de suporte para a imobilização da enzima horseradish peroxidase (HRP) na construção de um biossensor amperométrico. A enzima imobilizada nos polímeros foi aplicada sobre o eletrodo de trabalho e a partir daí o biossensor foi estudado. Inicialmente, os polímeros puros foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), condutividade elétrica e voltametria cíclica. Após a imobilização da HRP nos diferentes polímeros sintetizados, testes colorimétricos foram realizados a fim de estimar a atividade enzimática antes e após a imobilização, bem como a influência do substrato peróxido de hidrogênio nas respostas colorimétricas. O método de imobilização da enzima na matriz polimérica foi avaliado através da lavagem dos sensores com diferentes soluções para desta forma, determinar a quantidade de enzima que ainda permanecia imobilizada após as lavagens. O método de cronoamperometria foi utilizado para caracterizar a resposta elétrica do biossensor a adições sucessivas de peróxido de hidrogênio, determinando assim a sua sensibilidade e tempo de resposta. A amostra de PAni com 20% em massa de PSS mostrou as melhores respostas colorimétricas e amperométricas, apresentando uma resposta linear na faixa de 0,14 a 0,84 mmol de peróxido de hidrogênio e um tempo de resposta de 10 segundos. Em geral, a metodologia proposta se mostrou eficiente para a produção de biossensores enzimáticos utilizando polímeros condutores.

Abstract

The aim of this work is to develop a methodology for amperometric enzymatic biosensors production through the immobilization of enzymes in conducting polymers. For this, test strips consisting of three electrodes were produced by silk-screen technique using conductive pastes of carbon and Ag/AgCl to produce the work electrode, counter electrode and reference electrode. The polymers studied in this work were nanofibers of polyaniline (PAni) and polyaniline synthesized with different weight percentages of poly(styrene sulfonate) (PSS) which were used as support for the immobilization of the enzyme horseradish peroxidase (HRP) in the construction of an amperometric biosensor. The enzyme immobilized in the polymers was applied on the working electrode and then the biosensor was studied. Initially, the pure polymers were characterized by infrared spectroscopy (FT-IR), transmission electron microscopy (TEM), electrical conductivity and cyclic voltammetry. After the immobilization of HRP in the different synthesized polymers, colorimetric tests were conducted to estimate the enzyme activity before and after immobilization as well as the influence of hydrogen peroxide in the colorimetric tests response. The method of immobilizing the enzyme in the polymer matrix was evaluated by washing the sensors with different solutions to thereby determine the amount of enzyme that was still immobilized after washing. The method of chronoamperometry was used to characterize the electrical response of the biosensor to successive additions of hydrogen peroxide, thus determining its sensitivity and response time. PAni with 20 wt% of PSS showed the best colorimetric and amperometric responses, presenting a linear response ranging from 0,14 to 0,84 mmol of hydrogen peroxide and a response time of 10 seconds. In general, the proposed methodology is efficient for producing enzymatic biosensors using conducting polymers.

1 INTRODUÇÃO

Com a descoberta dos polímeros condutores em 1977, surgiu uma nova e ampla área de pesquisa, aplicando esta classe de polímeros nas mais diversas áreas da ciência. Estes materiais combinam as propriedades dos polímeros convencionais com propriedades ópticas e elétricas muito interessantes, permitindo sua aplicação em dispositivos como baterias, capacitores, sensores e até em músculos artificiais.

Um dos grandes avanços proporcionados pela descoberta dos polímeros condutores foi o aprimoramento dos biossensores. Estes dispositivos são responsáveis pela detecção e quantificação de um determinado analito através de reações químicas que geram um sinal biológico, o qual é convertido a um sinal mensurável que pode ser elétrico, óptico, calorimétrico, etc. Os polímeros condutores, por serem biocompatíveis, auxiliam tanto na imobilização do elemento sensível na superfície do biossensor quanto na conversão do sinal biológico em sinal elétrico, a partir das suas propriedades condutoras.

Outra característica importante e que auxilia na aplicação em sensores e biossensores é a facilidade de síntese destes polímeros na escala nanométrica. Ao utilizarmos polímeros condutores nanoestruturados na construção de um biossensor, estamos aumentando a área de contato entre a superfície do biossensor e a amostra a ser analisada. Desta forma, respostas mais rápidas e precisas podem ser obtidas, permitindo a produção de biossensores mais sensíveis.

A utilização de polímeros condutores criou os chamados “biossensores de terceira geração” os quais são simples, fáceis de produzir e com grande potencial de aplicação já que os mais diversos biocomponentes (células, proteínas, enzimas, anticorpos e etc.) podem ser imobilizados junto ao polímero para a detecção de analitos que variam desde a glicose até DNA ou, mais recentemente, o câncer. No entanto, a aplicação mais difundida e que já se encontra no mercado desde 1975, são os biossensores enzimáticos, em sua maioria de glicose (Figura 1).

Considerando o crescente aumento no índice de diabéticos no Brasil, há necessidade de desenvolver tecnologias nacionais que permitam a produção dos biossensores enzimáticos de glicose a baixo custo, tendo em vista que estes são

importados e caros, impossibilitando o monitoramento diário dos níveis de glicose pela população em geral.



Figura 1 - Biossensores comerciais de glicose.

Diversos estudos têm sido realizados nesta área já que estes dispositivos permitem o diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças de um modo simples e rápido através de um dispositivo pequeno e portátil, sem a necessidade de análises clínicas laboratoriais. Porém, apesar de simples, ainda há dificuldades no desenvolvimento e produção destes dispositivos utilizando materiais como, por exemplo, os polímeros condutores os quais são de baixo custo e biocompatíveis.

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para imobilização de enzimas em polímeros condutores e sua aplicação sobre uma tira teste. Primeiramente foram discutidas algumas definições importantes como polímeros condutores, enzimas e biossensores. Em seguida, o procedimento experimental foi apresentado, indicando os materiais, equipamentos e metodologia utilizados, bem como as técnicas de caracterização dos polímeros sintetizados e das tiras produzidas. Por fim, serão apresentados os resultados, conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

Deve-se destacar que este trabalho foi desenvolvido em cooperação com a empresa FK Biotecnologia consolidando esta favorável aliança universidade-empresa a qual permite desenvolver pesquisa visando à inovação tecnológica.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia para a produção de biossensores amperométricos enzimáticos baseada na utilização de polímeros condutores como suporte para a imobilização da enzima, incluindo também, a produção de tiras teste pelo método de *silk-screen*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros intrinsecamente condutores

Os polímeros intrinsecamente condutores (PICs) foram descobertos acidentalmente em 1977 por Hideki Shirakawa, no Instituto de Tecnologia de Tóquio através da exposição do poliacetileno a agentes dopantes, tornando-o um condutor elétrico intrínseco [1, 2, 3]. Desde então, uma variedade de aplicações começou a ser pesquisada com base nas seguintes propriedades desta classe de polímeros [4]:

- Condutividade do polímero condutor puro ou de uma blenda do polímero condutor com um polímero convencional. Aplicações como diodos emissores de luz [5], transistores [6], etc.
- Nas propriedades eletroquímicas de oxi-redução do polímero. Aplicações na fabricação de janelas eletrocromáticas [7], dispositivos para armazenamento de energia [8], músculos artificiais [9], tintas e revestimentos protetores [10], etc.
- Na morfologia e microestrutura do polímero. Aplicações como biossensores [11], sensores de pH [12], sensores de gás [13], etc.

O grande interesse em estudar esta classe de polímeros deriva do fato destes poderem combinar as propriedades mecânicas e processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, óptico e magnético semelhante ao dos metais e semicondutores inorgânicos [3, 14]. Com modificações químicas apropriadas, os PICs podem exibir um intervalo de condutividades desde semicondutor até condutor, chegando a condutividades comparáveis à do cobre (10^6 S/cm) (Figura 2) [4].

Os PICs caracterizam-se por possuírem ligações insaturadas conjugadas, ou seja, uma alternância de ligações duplas e simples ao longo da cadeia, formando uma estrutura ressonante com deslocalização dos elétrons π a qual forma um “caminho” para a mobilidade de cargas ao longo da cadeia [4, 14]. No entanto, PICs

não apresentam nenhuma condutividade no estado neutro. Sua condutividade intrínseca resulta da oxidação, redução ou dopagem da cadeia polimérica [15].

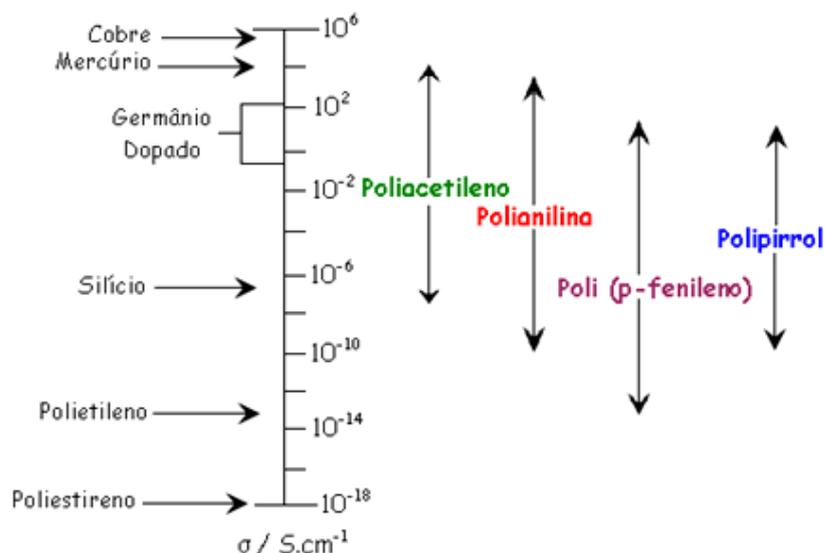


Figura 2 – Comparação da condutividade dos PICs com alguns materiais [16].

Entre os polímeros condutores mais conhecidos destacam-se o poliacetileno, o polipirrol, o politiofeno e a polianilina cujas estruturas estão representadas na Figura 3.

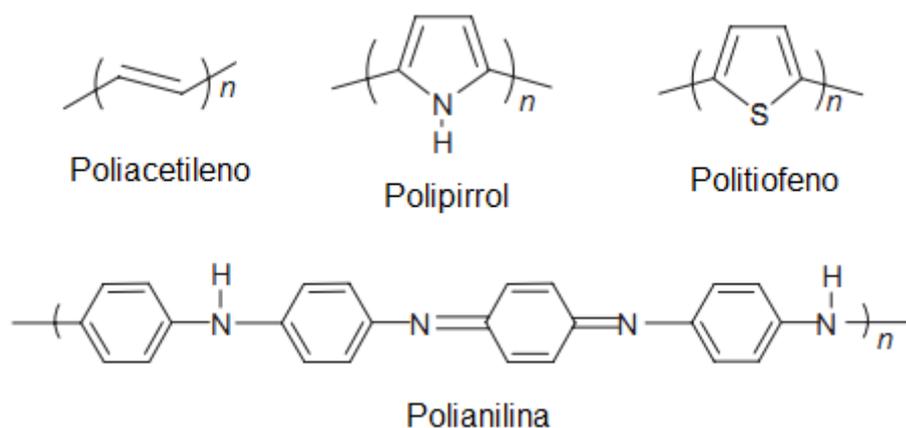


Figura 3 – Principais polímeros condutores [17].

3.1.1 Mecanismo de Condução

O primeiro modelo proposto para explicar a condutividade de polímeros era baseado no “modelo de bandas”, semelhante aos semicondutores inorgânicos. Este modelo diz que, num cristal, como em um polímero, a interação entre celas unitárias (ou meros da cadeia) com todos os seus vizinhos, leva à formação de bandas eletrônicas. Os níveis ocupados de mais alta energia constituem a banda de condução (BC), e os níveis eletrônicos vazios de mais baixa energia constituem a banda de valência (BV). Estes dois níveis de energia estão separados por uma faixa de energia proibida, a qual é chamada de *gap*. A largura do *gap* determina as propriedades elétricas intrínsecas do material (Figura 4) [18, 19].

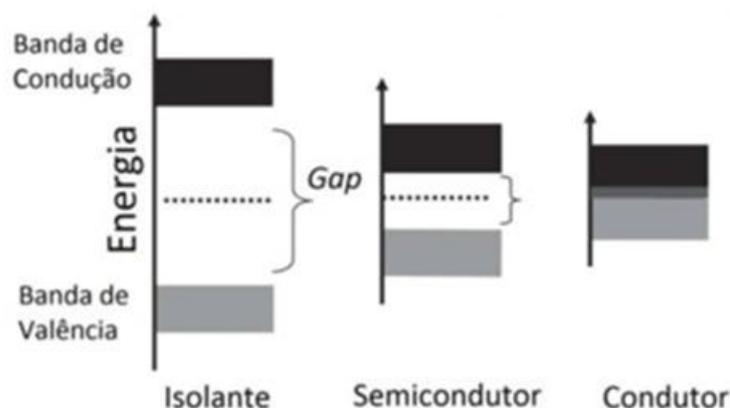


Figura 4 – Esquema de bandas para materiais isolantes, semicondutores e condutores [19, 20].

Ainda por analogia aos semicondutores, o processo pelo qual o polímero passa do estado isolante para condutor é chamado de dopagem. Pelo modelo de bandas, a condutividade se dá pela movimentação de elétrons na banda de condução (dopagem do tipo “*n*”, ou redução do polímero) ou pela movimentação de vacâncias na banda de valência (dopagem do tipo “*p*”, ou oxidação do polímero). Quando as bandas estão completamente cheias ou vazias, não há condução [20, 21].

Nos polímeros conjugados, quando um elétron é removido por oxidação da banda de valência, uma vacância (ou cátion-radical) é gerada. Esta densidade de

carga localizada que surge no polímero é chamada de polaron, e faz com que ocorra uma deslocalização parcial sobre algumas unidades monoméricas, causando uma distorção estrutural local. Este processo causa a formação de bandas de energia localizadas no meio do gap (Figura 5) [18].

Se um segundo elétron é removido por oxidação, podem-se ter duas situações: este elétron pode ser retirado de um segmento diferente da cadeia dando origem a mais um polaron, ou o elétron é retirado de um nível polarônico já existente, levando à formação de um dicátion radical ou bipolaron [18, 19, 22].

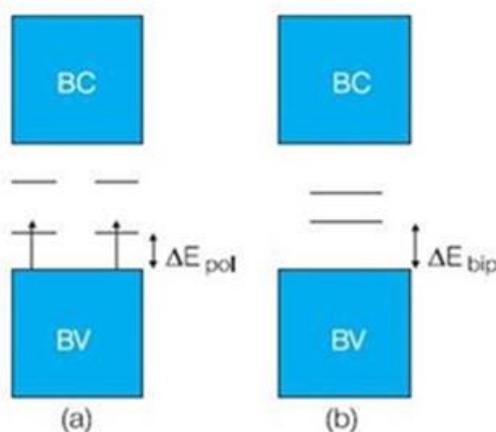


Figura 5 - Modelo de bandas para um polímero condutor: a) polarons e b) bipolarons [18].

Tanto polarons como bipolarons podem mover-se ao longo da cadeia polimérica através de um rearranjo das ligações duplas e simples que ocorre em um sistema conjugado, quando exposto a um campo elétrico (Figura 6) e é esta movimentação que gera a condutividade elétrica dos PICs [21].

Segundo Matveeva [23], a condutividade ocorre devido ao salto dos portadores de carga (polarons e bipolarons) entre as cadeias poliméricas. Neste caso três elementos contribuiriam para a mobilidade dos portadores: (A) o transporte ao longo da cadeia do polímero; (B) o transporte entre duas cadeias adjacentes; (C) o salto dos portadores entre duas partículas do polímero (Figura 7).

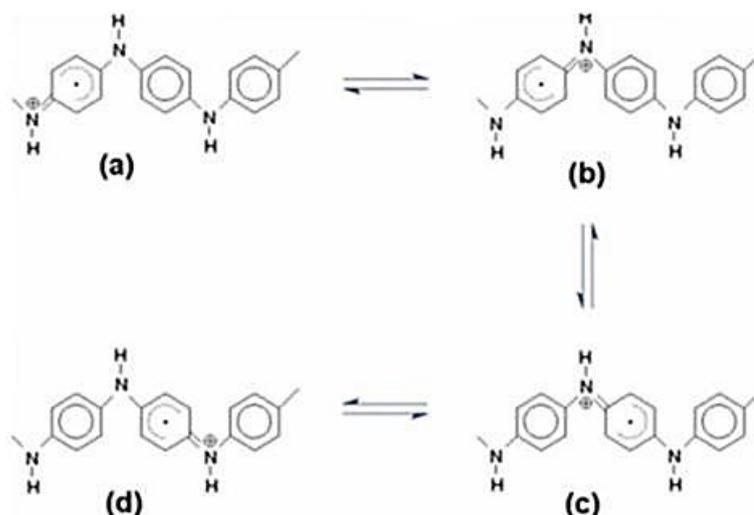


Figura 6 – Representação esquemática do transporte de cargas via polaron na polianilina [24].



Figura 7 - Possíveis saltos dos portadores de carga onde A indica o transporte dentro da molécula, B o transporte entre as cadeias e C o transporte entre as partículas [16, 22].

Como dito anteriormente, para o polímero se tornar condutor, é necessário passar pelo processo de dopagem. A dopagem ocorre através de métodos químicos de exposição direta do polímero a agentes de transferência de carga (dopantes), em fase gasosa ou em solução, ou ainda por oxidação ou redução eletroquímica [25].

Os agentes dopantes químicos são fortes agentes oxidantes ou redutores e podem ser moléculas neutras, compostos ou sais inorgânicos que podem facilmente formar íons, dopantes orgânicos e poliméricos [25]. Sua natureza e concentração não somente alteram a condutividade como também o transporte elétrico, processabilidade, propriedades ópticas e morfologia do polímero [3, 26, 27].

Na dopagem de um polímero, ao contrário de um semicondutor, as impurezas não são introduzidas nas cadeias, mas sim nas suas “vizinhanças” e a interação impureza-cadeia gera os chamados “defeitos carregados” localizados (polarons e bipolarons), responsáveis pelo aumento da condutividade [4, 25].

A dopagem dos polímeros condutores difere da dopagem tradicional de semicondutores já que, além de adicionar ou remover elétrons, há também incorporação de contra-íons, como cátions para dopagem tipo-*p* (remoção de elétrons da cadeia) ou ânions para dopagem tipo-*n* (adição de elétrons na cadeia) [28]. Desta forma, o polímero condutor no seu estado dopado possui tipicamente cargas positivas (polarons ou bipolarons) ao longo da cadeia, as quais são balanceadas pela inserção dos ânions. Existe uma grande variedade de grupamentos químicos que podem ser incorporados na cadeia polimérica, variando desde ânions simples como Cl^- , HSO_4^- e ClO_4^- até espécies como o *p*-toluenosulfonato (*p*-TSA) e grandes polieletrólitos como o poliestireno sulfonado (PSS) [20].

Outra diferença significativa entre a dopagem dos PICs e dos semicondutores está na quantidade de dopante utilizada. Enquanto os semicondutores apresentam “impurezas” que atuam como dopantes, da ordem de ppm, os PICs chegam a ter 50% em massa de dopantes [4, 28].

3.2 A polianilina

A polianilina (PAni) é o polímero condutor mais estudado nos últimos 100 anos devido as suas propriedades singulares como baixo custo do monômero, estabilidade química de sua forma condutora em condição ambiente, facilidade de polimerização e dopagem e alto rendimento [3, 14, 29].

O termo polianilina na verdade se refere a uma classe de polímeros consistindo de 1000 ou mais unidades repetitivas, cuja forma básica (não dopada) é dada pela fórmula geral representada na Figura 8, possuindo *y* e **(1-y)** unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas, respectivamente. As propriedades dos polímeros

descritos por esta fórmula podem variar dependendo de dois fatores: grau de oxidação e grau de protonação do polímero [30].

O estado de oxidação da polianilina pode, em princípio, ser variado continuamente desde o valor de $y = 1$, para um polímero totalmente reduzido, contendo somente nitrogênios amina, até o valor de $y = 0$ no caso do polímero totalmente oxidado, contendo somente nitrogênios imina [3, 31]. Além destes estados de oxidação, existe um estado intermediário conhecido correspondente ao valor de $y = 0,5$. Estes três estados de oxidação são bem definidos e possuem propriedades físicas e químicas bem distintas, sendo conhecidos como leucoesmeraldina ($y = 1$), esmeraldina ($y = 0,5$) e pernigranilina ($y = 0$).

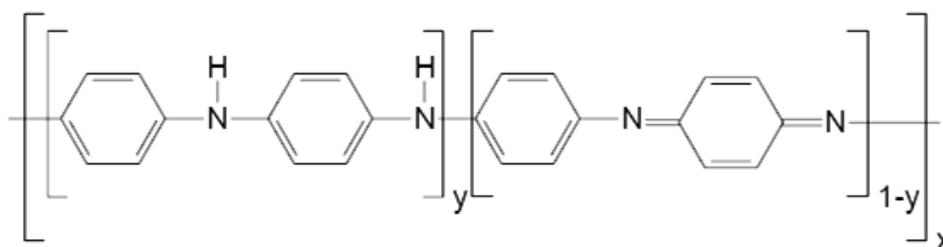


Figura 8 - Estrutura geral da PAni [16].

O átomo de nitrogênio imina de qualquer uma das espécies de polianilina citadas acima pode ser totalmente ou parcialmente protonado, dando origem aos sais correspondentes, sendo que o grau de protonação do polímero básico depende de seu estado de oxidação e do pH do ácido empregado na síntese [31, 32]. Porém, dentre todas as formas possíveis de estado de oxidação e protonação da polianilina, somente a forma oxidada e protonada, conhecida como sal esmeraldina, é condutora [33].

A PAni é o único polímero condutor que pode ter suas propriedades elétricas reversivelmente controladas e alteradas, tanto por alteração no estado de oxidação, quanto pelo grau de dopagem ou protonação [31]. Desta forma, pode ser transformada em condutora através de dois métodos: oxidação (química ou eletroquímica) da leucoesmeraldina base (Figura 9, Reação 1) ou então, protonação da esmeraldina base através de reações ácido-base (Figura 9, Reação 2). Em

ambos os casos ocorre inserção de contra-íons na cadeia polimérica e, desta forma, a polianilina condutora pode ser caracterizada como um sal (polication com um ânion por unidade repetitiva) [14]. Esta facilidade de conversão entre as formas básicas torna a polianilina um grande potencial em aplicações tecnológicas.

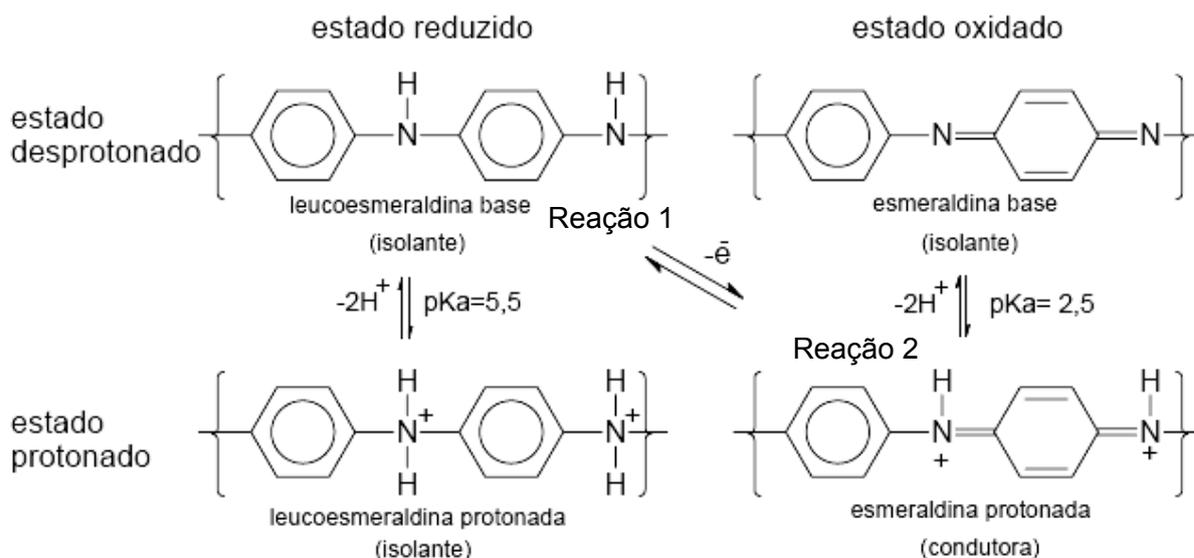


Figura 9 - Estruturas ideais da PANi [16].

A dopagem da PANi por protonação utilizando-se diversos ácidos ocorre através de uma reação redox interna, isto é, sem alteração no número de elétrons associados à cadeia polimérica, apresentando a vantagem de ser reversivelmente desprotonada. Sais de metais de transição e agentes redutores fortes também podem ser utilizados como dopantes [28]. O resultado é uma banda parcialmente ocupada e um estado metálico onde há uma carga positiva em cada unidade repetitiva (proveniente da protonação) e um contra-íon associado (por exemplo, Cl⁻, HSO₄⁻, etc.) [14].

Estudos sugerem que a protonação da polianilina não é homogênea, mas que ocorre a formação de domínios completamente protonados, que originam ilhas metálicas embebidas em regiões não protonadas isolantes [3, 34]. Outra proposição existente afirma que o fator determinante na condutividade elétrica da polianilina é a resistência interpartículas, ou seja, a resistência ao transporte de elétrons não é resultante de efeitos intra ou intermoleculares [3].

3.2.1 Síntese

Existem diversos métodos para sintetizar polianilinas, como polimerização química, eletroquímica, fotoinduzida e catalisada por enzimas [35], no entanto, os dois primeiros métodos são os mais utilizados.

Utilizando-se um agente oxidante químico apropriado, a PANi pode ser sintetizada quimicamente na forma de pó ou então, na forma de filmes finos pela oxidação eletroquímica do monômero sobre eletrodos de diferentes materiais inertes [3].

A síntese eletroquímica é realizada em meio ácido contendo altas concentrações de anilina e pode ser feita mediante um potencial estático, em geral com um valor entre 0,7 V e 1,2 V (*versus* ECS) ou por voltametria cíclica, com o potencial sendo ciclado entre -0,2 V e 1,2 V (*versus* ECS) com velocidades de varredura variando entre 10 e 100 mV.s⁻¹ (Figura 10) [3, 28]. Este método possui a vantagem de não necessitar de agente oxidante ou iniciador e, além disto, permite a formação de filmes finos com um polímero com maior grau de pureza [3, 35].

A síntese química também ocorre em meio ácido sob a ação de um agente oxidante, ocorrendo precipitação do polímero na forma de um pó verde, dopado com o ácido utilizado na síntese. Este método tem a grande vantagem de produzir um polímero de alto peso molecular e em grandes quantidades [3]. Além disso, possibilita a produção em larga escala e, portanto a industrialização [17].

Uma grande variedade de agentes oxidantes e ácidos dopantes podem ser utilizados sendo os sistemas mais comuns compostos de persulfato de amônio ou cloreto férrico como agentes oxidantes e soluções de ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄, HClO₄) como dopantes. O grupo funcional presente no ácido dopante (inorgânico, orgânico ou poliácido), tem grande influência sobre a solubilidade, dispersão, condutividade elétrica, etc. da polianilina sintetizada [3, 29].

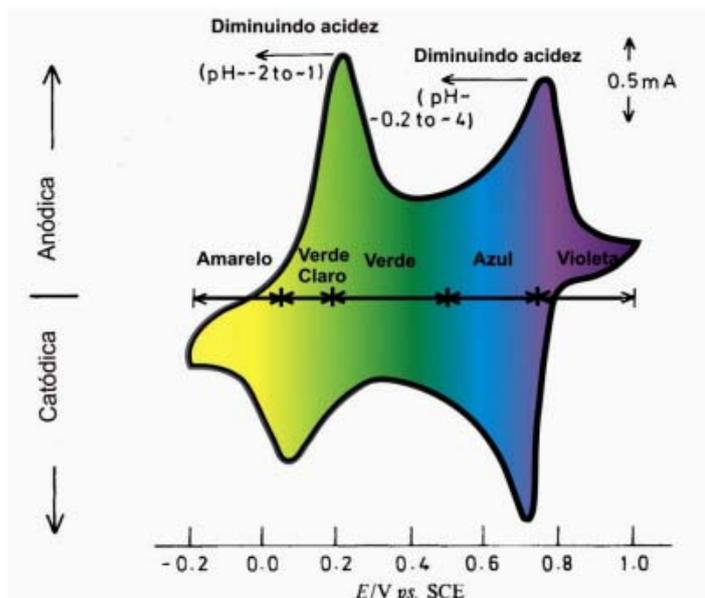


Figura 10 - Voltamograma cíclico da polianilina em meio ácido no intervalo de síntese, mostrando as cores dos diferentes estados de oxidação [28].

Além do dopante, diversas outras variáveis são determinantes na morfologia e propriedades finais do polímero. Em particular, uma relação importante na polimerização é a razão molar monômero/oxidante, expressa como o parâmetro K (Equação 1) [28]:

$$K = \frac{2,5n_{an}}{n_{ox}n_e} \quad (1)$$

onde n_{an} é o número de mols de anilina, n_{ox} é o número de mols do oxidante e n_e é o número de elétrons envolvidos na redução do oxidante. A constante 2,5 é o valor médio de elétrons perdidos por mol de anilina.

O rendimento da reação e as propriedades do polímero final são diretamente afetados por este parâmetro. Estudos anteriores demonstraram que quanto maior o valor de K , maior a condutividade da polianilina, e menor o rendimento da reação [16]. Além disto, um excesso de oxidante pode resultar em degradação do polímero resultante [3, 29].

Devido à facilidade e diversidade dos métodos de síntese, a polianilina pode ser preparada para apresentar determinadas características, dependendo do dopante e das condições de síntese utilizadas. Por exemplo, um polímero de

elevada estabilidade térmica pode ser obtido quando sintetizado na presença de ácido fosfórico ou então, quando se utiliza poliácidos como dopantes, a polianilina pode se manter dopada inclusive em valores de pH básicos [3].

3.2.1.1 Nanoestruturas

A estrutura e morfologia da PANi dependem não só do método de síntese, mas também da dopagem e das condições de processamento do polímero. Desta forma, um número grande de estruturas amorfas e cristalinas e morfologias podem ser obtidas devido à variedade de métodos de síntese e dopantes existentes [3].

Polímeros condutores nanoestruturados têm recebido grande interesse nos últimos anos nas áreas científica e tecnológica, já que combinam as vantagens de um condutor orgânico com sistemas de pequena dimensão, criando boas propriedades físico-químicas e diversas aplicações promissoras [36].

Com a morfologia em escala nanométrica, têm-se um relativo aumento da área superficial, maiores interações do polímero com o meio e, portanto desempenho superior quando comparado a polímeros obtidos por síntese convencional, principalmente em sensores químicos, nanocompósitos, entre outras aplicações que exigem maior sensibilidade e interação com o meio-ambiente [37].

A síntese da polianilina em escala nanométrica tem sido extensivamente estudada nos últimos anos e diversas aplicações foram propostas e estudadas. A polianilina em nanoestruturas possui maior organização, apresentando melhor resistência mecânica, valores de condutividade mais altos e é mais facilmente dispersa em solventes [28, 38]. Dentre as principais aplicações destacam-se os sensores químicos [39], colóides [40] e biossensores [41, 42].

Através da síntese convencional da polianilina, utilizando-se elevadas concentrações de anilina e agente oxidante, são obtidos particulados de tamanhos irregulares, como mostrado na Figura 11. A formação do polímero pode ser feita através de sua auto-nucleação (nucleação homogênea) ou nucleação sobre superfícies (nucleação heterogênea), que é o método mais comum de crescimento. A nucleação homogênea requer alta pureza dos reagentes e condições controladas,

já que qualquer impureza presente no meio reacional leva à nucleação heterogênea, na qual o crescimento do polímero ocorre a partir desta impureza (método *seed*) [28].

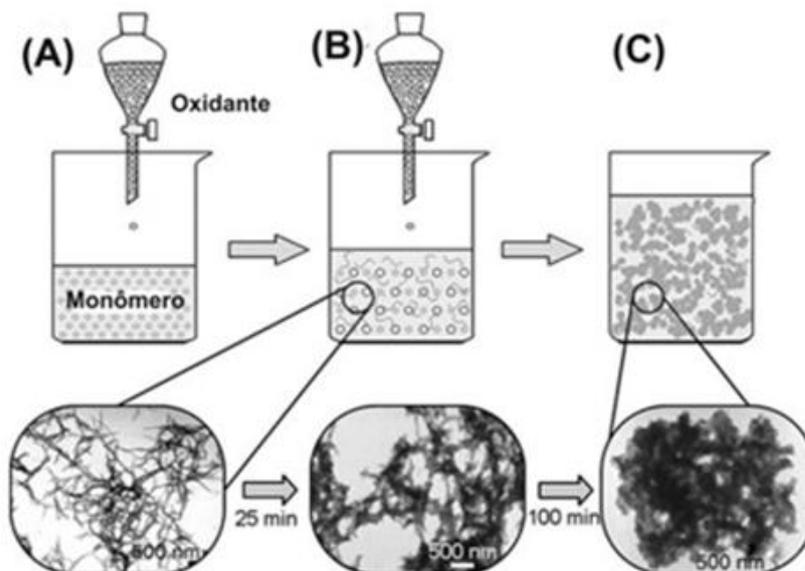


Figura 11 – Evolução do crescimento da polianilina durante a síntese convencional, explorada por MET. (A) nanofibras são produzidas nos primeiros estágios; (B) e (C), crescimento e aglomeração ao redor das fibras [28].

Como pode ser visualizado na Figura 11, nanofibras de polianilina se formam espontaneamente no início da reação, comprovando que esta estrutura é intrínseca ao polímero, ou seja, forma-se naturalmente nos primeiros minutos de reação. Desta forma, não há necessidade de utilizarem-se métodos de síntese especiais como, por exemplo, o uso de zeólitas [43] e surfactantes [44] para a obtenção de nanoestruturas, basta controlar as condições de síntese, como tempo de reação, agitação e concentração dos reagentes.

Diferentes métodos de síntese foram propostos tendo como objetivo suprimir o crescimento secundário das nanofibras formadas no início da reação. Um destes métodos é conhecido como síntese interfacial (Figura 12) [45]. Nesta síntese, a polimerização ocorre na interface de um sistema bifásico composto de água (contendo o agente oxidante) e solvente orgânico (contendo o monômero). As

nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa por serem hidrofílicas e, com a ausência de agente oxidante, não crescem, mantendo-se em escala nanométrica.

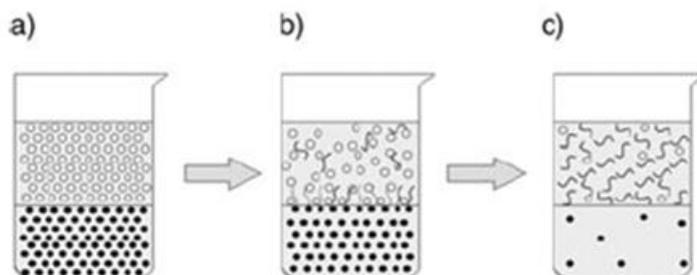


Figura 12 - Ilustração da síntese interfacial. a) uma interface é formada entre a fase orgânica e a fase aquosa. b) nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa (superior). c) nanofibras se acumulam na fase aquosa [45].

Outra maneira de prevenir o crescimento secundário é parar a polimerização assim que todas as nanofibras se formam. Isto é possível através da agitação rápida das soluções de monômero e oxidante, já que todas as moléculas são consumidas rapidamente, evitando excesso de reagentes para crescimento posterior das nanofibras [36, 45]. Chamaremos este método de síntese de adição rápida de reagentes (Figura 13).

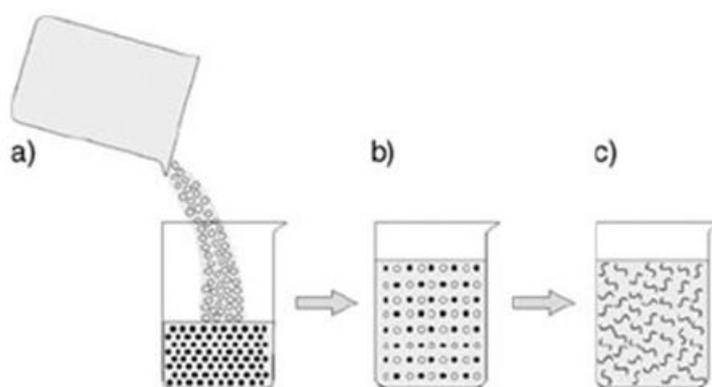


Figura 13 - Ilustração da síntese por adição rápida. a) a solução oxidante é rapidamente adicionada à solução contendo anilina. b) uma solução homogênea é obtida, onde toda a anilina e oxidante estão bem distribuídos por toda a solução. c) todos os reagentes são consumidos na formação das nanofibras [45].

A polianilina sintetizada pelos métodos citados tem excelente dispersibilidade em água devido a sua morfologia nanofibrilar e, quando forma-se um filme por solução (*casting*) desta dispersão sobre um substrato, uma rede de nanofibras é obtida [36].

3.2.2 Processabilidade

Devido as suas ligações conjugadas, os PICs tem uma estrutura muito rígida, o que torna difícil a solubilização, fusão e deformação termoplástica do material, principalmente no estado dopado [46]. Neste aspecto, a PAni tem se destacado entre os outros polímeros condutores pois, de acordo com o tipo de síntese empregada e suas condições, a PAni pode ser processada por uma variedade de técnicas, dentre elas, filmes por solução (*casting*), filme-gel, blendas poliméricas, polimerização química *in situ* e filmes depositados eletroquimicamente [3].

O sal esmeraldina sintetizado pelos métodos comuns e dopado com ácidos inorgânicos é tipicamente amorfo, infusível e insolúvel em solventes inorgânicos, orgânicos e em água [47]. Alguns dopantes podem conferir certa solubilidade à polianilina, como bases de Lewis (AlCl_3 , SnCl_4 , FeCl_3), em acetonitrila e outros solventes porém, a conformação das cadeias poliméricas é alterada, o que se reflete na formação e qualidade dos filmes [28, 47]. Outra alternativa para melhorar a processabilidade da PAni na sua forma dopada, é utilizar métodos de síntese diferentes como polimerização em emulsão ou síntese de polianilina coloidal [47].

Como dito anteriormente, a PAni sintetizada na forma de nanofibras possui excelente dispersibilidade em água na sua forma dopada. No entanto, apesar da fácil síntese e boas propriedades, a baixa solubilidade deste polímero em solventes comuns e não tóxicos, além de pobres propriedades físicas e mecânicas, dificultam sua aplicação industrial [48, 49, 50].

Para superar estes problemas estuda-se a formação de compósitos com outros materiais. Uma das possibilidades é misturar a PAni com polímeros isolantes como o poli(metilmetacrilato) (PMMA) [50] ou poli(vinil álcool) (PVA) [49], em diferentes porcentagens em peso, formando blendas. Outra possibilidade consiste

em utilizar polieletrólitos como o poli(ácido acrílico) (PAA) [51] ou poliestireno sulfonado (PSS) [52] como dopantes e matriz para a PAni através de técnica conhecida como polimerização *in situ* [48].

Quando um polieletrólito é utilizado como dopante ao invés de um ácido inorgânico, a estabilidade química e as propriedades elétricas da PAni ficam preservadas já que o poliácido é imóvel e dificilmente se desloca da cadeia garantindo maior estabilidade química [17, 52]. A Figura 14 ilustra a estrutura química da PAni dopada com PSS.

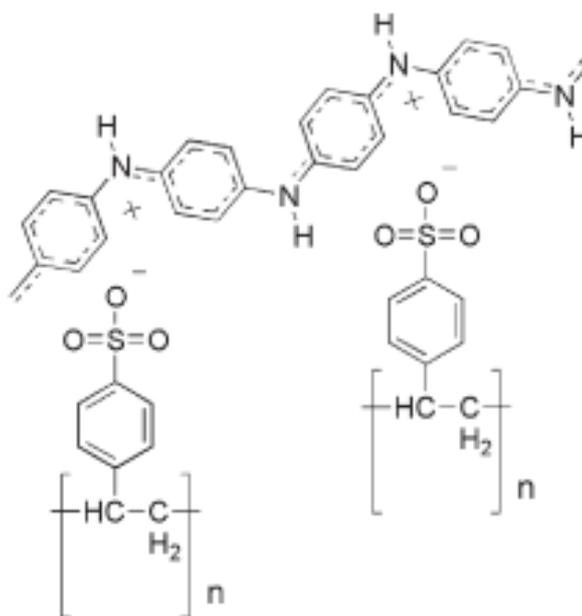


Figura 14 – Estrutura química da PAni dopada com PSS [27].

3.3 Enzimas

3.3.1 Noções gerais

As enzimas são, por definição, proteínas com extraordinária capacidade de catalisar reações biológicas com um alto grau de especificidade. São constituídas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas que determinam a sua estrutura. A sequência e organização desses aminoácidos resultam na estrutura tridimensional

que por sua vez, é responsável pela especificidade e atividade da enzima como catalisador [53].

Como todos os outros catalisadores, as enzimas aumentam a velocidade de determinadas reações diminuindo sua energia de ativação através da ligação temporária a um ou mais dos reagentes que catalisam, formando complexos intermediários, sem alterar o equilíbrio da reação [53]. Ao formar estes complexos, ocorre o abaixamento da energia de ativação necessária para que a reação ocorra, aumentando assim a velocidade da reação (Figura 15). Algumas enzimas são capazes de aumentar a taxa de certas reações cerca de 10^{14} vezes [54, 55].

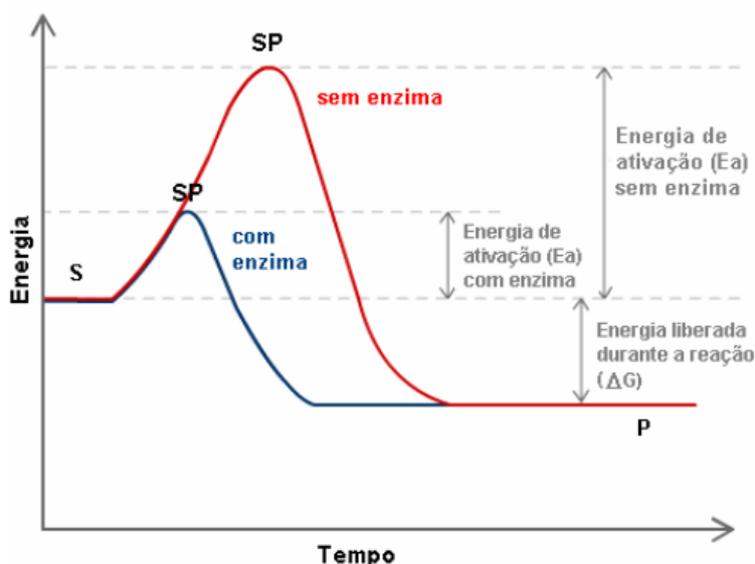


Figura 15 – Representação da energia de ativação (E_a) de uma reação não enzimática e uma reação enzimática. ΔG – energia livre de Gibbs, S – substrato e P – produto [56].

Embora a enzima participe da sequência da reação, ela não sofre nenhuma transformação. Desta forma, poucas moléculas de enzima são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato a produto [56].

A característica principal das enzimas que as diferem dos catalisadores sintéticos é a sua alta especificidade pelos seus substratos, de forma que em uma reação catalisada por enzimas não há formação de produtos laterais [31]. Além disto, as reações catalisadas por enzimas podem ocorrer em condições suaves de

temperatura, pH e pressão, ao contrário daquelas reações catalisadas por catalisadores sintéticos.

As enzimas podem ser produzidas, industrialmente, a partir de diversas fontes. Podem ser extraídas de animais ou plantas, porém, as principais fontes são os microrganismos. A produção a partir de fungos e bactérias permite a redução de custos de produção, por serem uma fonte de mais fácil reposição através de uma origem segura e por oferecerem enzimas de alta pureza [57].

Atualmente, muitas indústrias utilizam enzimas como catalisadores, como por exemplo, no setor alimentício, tratamento de couro, produção de detergentes, análises químicas e clínicas, etc.

3.3.2 Atividade enzimática

A característica de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima, chamada centro ativo. A molécula que se liga ao centro ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato e a habilidade com que a enzima se liga ao substrato se denomina atividade biológica [54, 55, 58]. Para ser reconhecida como substrato, a molécula deve possuir a forma apropriada para acomodar-se no centro ativo e grupos químicos capazes de se ligarem aos grupos químicos ali presentes. Daí vem a alta especificidade das enzimas [54, 57].

Para serem ativas, algumas enzimas não requerem nenhum outro grupo químico além daqueles presentes em sua estrutura. Outras requerem componentes químicos adicionais chamados cofatores, os quais podem ser um ou mais íons inorgânicos (Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) ou uma molécula orgânica complexa chamada, neste caso, coenzima. Algumas enzimas requerem ambos, coenzima e um ou mais íons metálicos, para exibirem sua atividade. Uma coenzima (ou íon inorgânico) que está covalentemente ligada à parte proteica da enzima é chamada grupo prostético [54].

A atividade enzimática vai depender da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo destas cadeias na molécula, da natureza do substrato e ainda, se existir, da natureza do grupo prostético [55, 58]. A atividade

enzimática é afetada também, por fatores como a presença de inibidores, pH e temperatura. Esses fatores podem aumentar, diminuir ou até mesmo suprimir a velocidade da reação catalítica [53].

A determinação quantitativa da atividade enzimática envolve a medida da velocidade da reação. Por definição, “uma unidade internacional (UI) de atividade é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato ou a formação de 1 micromol de produto por minuto”, nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração do substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (UI/mg) [55].

3.3.3 Especificidade enzimática

O conceito de que as enzimas formam complexos intermediários com seus substratos foi primeiramente articulada no final do século XIX. Nesta época Emil Fischer estudava a especificidade enzimática e propôs, em 1884, que as enzimas eram estruturalmente complementares a seus substratos, de tal forma que eles se ajustariam perfeitamente, como “chave-fechadura” [55, 59]. De acordo com este modelo, o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas semelhantes. Dessa forma, o substrato (chave) se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima como se este fosse rígido analogamente a uma fechadura (Figura 16, (A)). Conforme esse modelo, cada enzima agiria sobre um número muito limitado de compostos [55, 56].

Porém, sabe-se que este modelo não corresponde à realidade visto que a flexibilidade da estrutura enzimática é um dos fatores que permite que moléculas estruturalmente semelhantes apresentem conformações e orientações relativas distintas no sítio de ligação do receptor e, em consequência, afinidades e atividades também diferentes [57, 60].

Desta forma, foi proposta outra hipótese para a alta especificidade enzimática, conhecida como teoria do encaixe induzido. Esta teoria considera a capacidade do substrato de selecionar ou induzir uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage, isto é, posiciona resíduos de aminoácidos em uma

posição espacial correta para a ligação do substrato (Figura 16, (B)). Esta mudança conformacional pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico [60]. Desta forma, o centro ativo não precisa preexistir de uma maneira rígida devendo, contudo, existir em um arranjo espacial específico, o qual pode ser induzido pelo contato com o substrato [58].

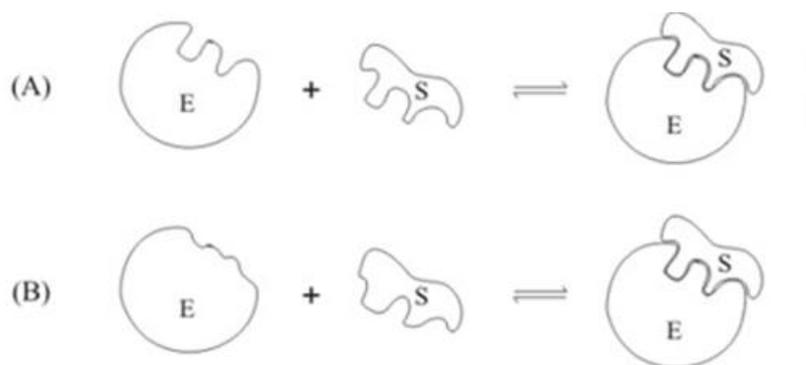


Figura 16 – Mecanismos de ação enzimática segundo o modelo “chave-fechadura” (A) e a teoria do encaixe induzido (B) [57].

De acordo com a teoria do encaixe induzido, a enzima é capaz de reconhecer uma ou um conjunto de conformações do substrato. Este, ao provocar uma mudança conformacional na enzima, pode estar induzindo-a a adotar a conformação responsável pelo seu reconhecimento. Assim como a enzima, o substrato tem a sua conformação tensionada e distorcida. Este é o mecanismo que leva a alta eficiência da catálise produzida pelas enzimas [57].

3.3.4 Classificação

Muitas enzimas têm sido nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome do seu substrato, ou à palavra ou frase que descreve sua atividade. Desta forma, a urease catalisa a hidrólise da ureia e a peroxidase catalisa a redução do peróxido. Algumas vezes uma enzima possui dois nomes ou duas enzimas diferentes possuem o mesmo nome. Devido a tais ambiguidades e ao crescente número de

enzimas recém-descobertas, por acordo internacional, foi adotado um sistema para nomear e classificar as enzimas [54].

A classificação consiste em dividir as enzimas em seis grandes classes de acordo com as reações que catalisam e cada classe se divide em subclasses conforme o tipo de reação catalisada (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação internacional das enzimas [54, 56].

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Reações de oxirredução Transferência de H, O ou elétrons
2	Transferases	Reações de transferências de grupos entre moléculas
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Reações de adição de grupos em ligações duplas e vice-versa
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N

As oxidoredutases, grupo de interesse neste trabalho, são subdivididas conforme o grupo prostético: flavina, quinona, heme ou cobre [61].

A classe das oxidoredutases é muito interessante e tem sido bastante aplicada na construção de biossensores amperométricos, já que catalisam uma reação química redox, envolvendo a transferência de elétrons. Os três grupos de oxidoredutases mais utilizados para este fim são as oxidases, desidrogenases e as peroxidases [61].

3.3.4.1 Peroxidases

As peroxidases são proteínas do grupo das oxidorreduções capazes de catalisar a redução de peróxidos como, por exemplo, peróxido de hidrogênio, e a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Seu peso molecular varia de 30 a 150 kDa [62, 63].

Esta classe de enzimas pode ser classificada de acordo com a fonte de onde a peroxidase é extraída [31, 62] em:

Classe I – enzimas intracelulares (por exemplo, ascorbato peroxidase);

Classe II – enzimas secretórias de origem fúngica (por exemplo, lignina peroxidase);

Classe III – enzimas secretórias de plantas (por exemplo, peroxidase de raiz forte ou *horseradish peroxidase*).

Uma das fontes vegetais mais ricas em peroxidases é o tubérculo de *Armoracia rusticana*, conhecida pelo nome usual de “horseradish” e que se assemelha bastante à chamada “raiz forte” dos estados do sul do Brasil ou ainda ao “rabanete” [31]. Deste tubérculo é extraída a enzima *horseradish peroxidase* ou peroxidase de raiz forte (HRP).

A HRP é uma glicohemeproteína, sendo na realidade, uma mistura de mais de 30 isoenzimas, usualmente classificadas como ácidas, neutras ou básicas. Possui dois íons Ca^{2+} e uma porção Ferriprotoporfirina IX (Figura 17 (A)), não covalentemente ligada à cadeia polipeptídica, que forma o centro ativo da enzima. O conteúdo de carboidrato constitui, aproximadamente, de 18% a 22% da massa molar total, 40 - 45 kDa [31, 61, 64]. A Figura 17 (B) ilustra a representação tridimensional da HRP.

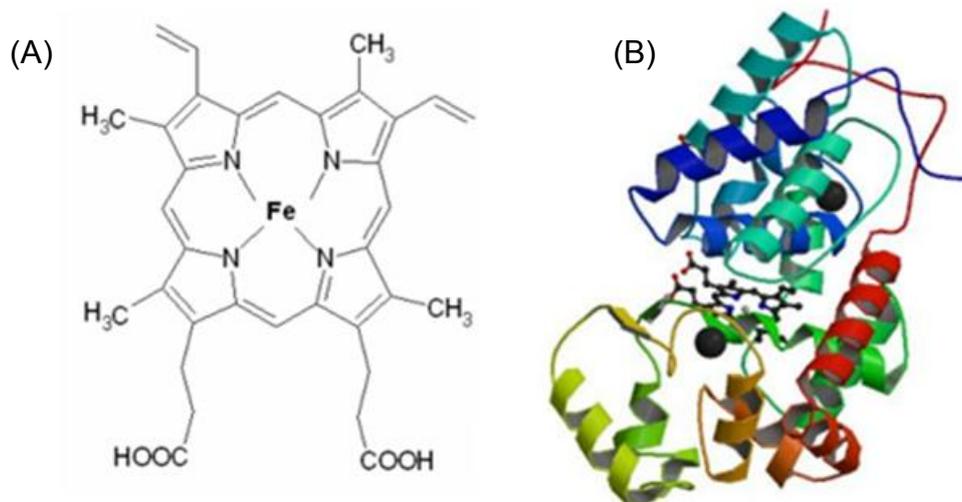
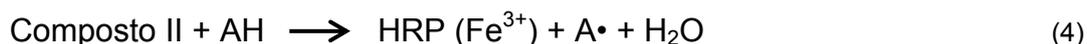


Figura 17 – (A) Centro ativo de uma heme peroxidase, grupo Ferriprotoporfirina IX ou Hemina, (B) Representação 3D da HRP. Na região central da molécula é possível observar a estrutura ferriprotoporfirina IX e nas porções inferiores e superiores os dois cátions Ca^{2+} - esferas escuras [61].

O mecanismo catalítico da HRP tem sido amplamente estudado e já está bem estabelecido, podendo ser dividido em 3 etapas, representadas pelas Equações 2 a 4 e que estão ilustradas na Figura 18.



Conforme a Figura 18 e a Reação 1, na primeira etapa o grupo prostético heme da HRP [$\text{HRP} (\text{Fe}^{3+})$] sofre oxidação pelo H_2O_2 , resultando na formação de um intermediário instável, chamado Composto I. Na presença de doadores fortes de elétrons (AH), o Composto I é convertido em Composto II, produzindo um radical livre do substrato correspondente (A^\bullet), conforme representado na Reação 2.

Na última etapa (Reação 3), o Composto II, com a participação do doador de elétrons, é convertido na forma nativa da enzima [31, 61, 63, 65].

O excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico normal, assim, o Composto II passa à forma de Composto III, que por perda de oxigênio pode chegar ao Composto IV, o qual pode reagir com H_2O_2 e retornar à forma de Composto II. Este

caminho, além de apresentar uma velocidade de reação bem inferior, ainda apresenta um agravante que é a possibilidade de o Composto II passar a uma forma inativa irreversível, ocasionando a perda total da atividade enzimática [64, 65].

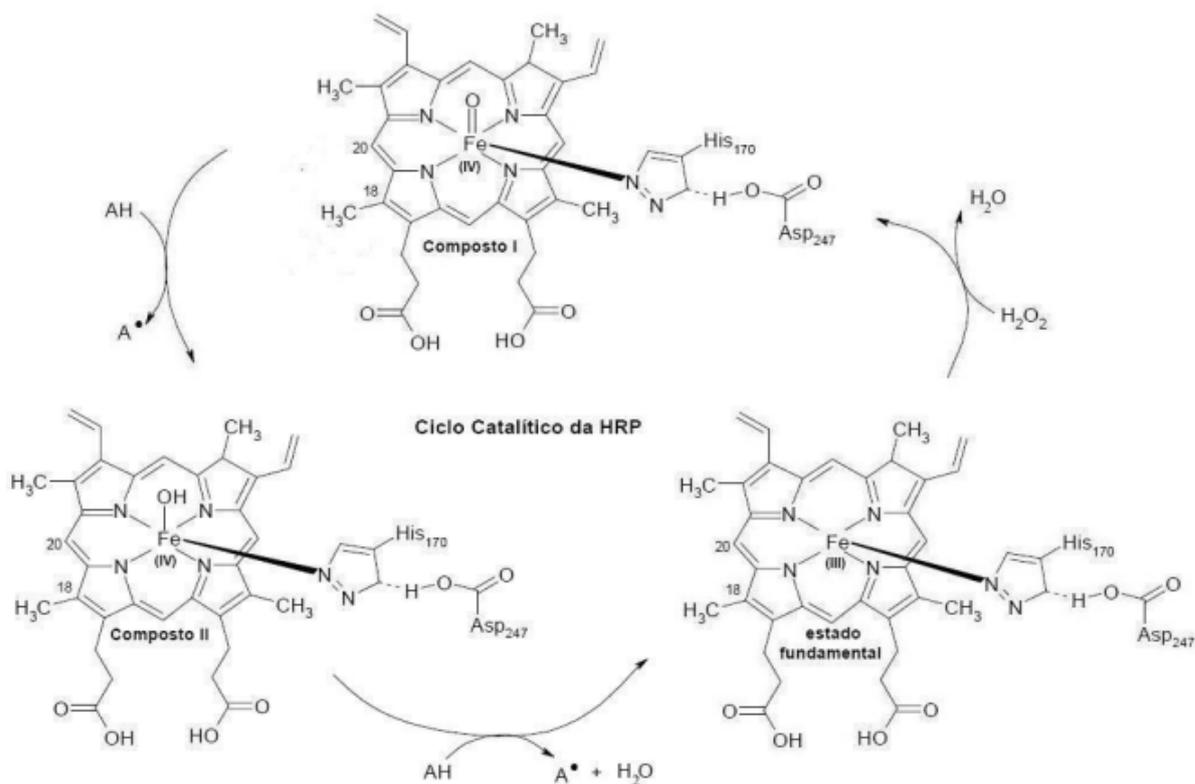


Figura 18 – Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença do H_2O_2 . AH representa o substrato redutor e $\text{A}\cdot$ o radical formado [61, 64].

Os substratos que reduzem os Compostos I e II são chamados “substratos redutores” e são, principalmente, da classe dos fenóis e naftóis (pirogalol, hidroquinona, etc...) e aminas aromáticas (anilina, benzidina, etc...) [31, 64].

As peroxidases possuem várias aplicações interessantes em diversos campos. Estas enzimas estão envolvidas na degradação de compostos aromáticos e, portanto, podem ser utilizadas na remoção de contaminantes e poluentes. Além disto, podem ser utilizadas como antioxidantes e na síntese de polímeros, dentre outras diversas aplicações [63]. Porém, a aplicação mais importante está nos diagnósticos analíticos, onde as peroxidases são componentes chaves de biossensores e imunoenaios [65, 66].

Nos biossensores, as peroxidases são utilizadas na detecção e monitoramento do seu substrato, peróxido de hidrogênio. Este, devido ao seu alto poder oxidante, é utilizado em vários campos industriais, particularmente nas indústrias têxteis, de alimento ou na área de tratamento de efluentes, onde atua como esterilizante, alvejante e oxidante.

O peróxido de hidrogênio também é produto da reação de outras oxidorreduções. Utilizando a peroxidase em conjunto com estas enzimas, é possível realizar a dosagem de compostos de importância clínica, dentre eles, glicose e colesterol [31].

3.3.5 Processos de imobilização de enzimas

Embora as enzimas apresentem inúmeras vantagens como catalisadores e também na quantificação e monitoramento de analitos, o custo da sua utilização na forma pura inviabiliza sua aplicação. Neste caso, uma possível solução é a imobilização da enzima em suportes insolúveis, permitindo a sua reutilização várias vezes. Além disto, com a imobilização há um aumento da estabilidade da proteína devido ao menor grau de liberdade, menor sensibilidade a interferentes e maior estabilidade quanto às mudanças de pH e elevação de temperatura [57].

A aplicação mais comum das enzimas e que exige a escolha correta do método de imobilização e de um suporte adequado é, sem dúvida, a de biossensores enzimáticos, cuja definição será discutida mais a frente. Neste caso, a enzima é imobilizada sobre um eletrodo e a imobilização deverá satisfazer alguns pré-requisitos [67]:

- Imobilização eficiente e estável da biomolécula sobre a superfície do transdutor;
- Retenção das propriedades biológicas;
- A enzima deverá ser compatível e inerte frente ao seu suporte;
- Acessibilidade ao substrato após a imobilização.

Na construção de um biossensor enzimático, o processo de imobilização é uma etapa crítica e tem como objetivo promover um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo sua atividade e permitindo a difusão de substrato e produto para dentro e para fora da camada catalítica. A imobilização de enzimas sempre resulta em um decréscimo de sua atividade catalítica, porém prolonga o tempo de meia-vida deste biocomponente. A atividade do biocomponente imobilizado depende da área superficial, porosidade e caráter hidrofílico do suporte, assim como das condições de reação e método de imobilização [68].

O suporte ideal para a imobilização de enzimas deve ser insolúvel em água, se ligar facilmente à enzima e ser inerte quimicamente. Nos últimos anos, inúmeros artigos têm sido publicados indicando os polímeros condutores como suportes apropriados para a imobilização de enzimas sobre eletrodos, visto que proporcionam um ambiente adequado e facilitam a interação da enzima com a superfície do eletrodo [69].

Os principais métodos de imobilização enzimática são adsorção física, ligação covalente, *entrapment* e confinamento. A Figura 19 ilustra estes métodos de imobilização. A seleção do método mais adequado dependerá primeiramente do suporte a ser utilizado e também do uso pretendido e da aplicação [70].

3.3.5.1 Adsorção Física

Este é um dos métodos de imobilização mais utilizados devido a sua simplicidade. A enzima é imobilizada em um suporte sólido, onde estão envolvidas ligações, em sua maioria de natureza eletrostática como ligações de hidrogênio, ligações iônicas e forças de van der Waals, as quais ocorrem entre os grupos superficiais do suporte e os grupos superficiais da enzima. Estas forças são muito fracas, porém, em grande quantidade, permitem uma ligação razoável com o suporte [70, 71].

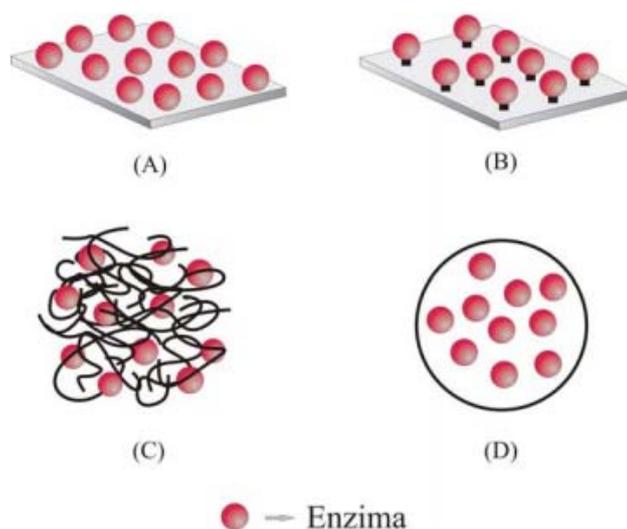


Figura 19 – Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática sobre um suporte. (A) adsorção física, (B) ligação covalente, (C) *entrapment* e (D) confinamento [57].

O processo de imobilização consiste em misturar o componente biológico e o suporte, sob condições adequadas de pH, força iônica, dentre outras, por um período de incubação seguido pela coleta do material imobilizado e extensiva lavagem para remover os componentes biológicos não ligados [70]. A imobilização também pode ocorrer por simples imersão do suporte em uma solução que contenha o biocomponente, porém por este método, apenas uma monocamada de material biológico é imobilizada, limitando a faixa de resposta do biossensor [72].

A literatura exhibe vários exemplos onde se utiliza este método de imobilização na construção de biossensores. Jin et al. estudaram a imobilização de horseradish peroxidase por adsorção física em membranas de quitosana [73]. Shin et al. desenvolveram um biossensor de glicose pela adsorção da enzima glucose oxidase sobre um suporte de poliéster revestido de polianilina [74].

O método de imobilização por adsorção, apesar da simplicidade, não permite boa aderência da enzima ao suporte devido às fracas forças de interação, ocasionando dessorção da enzima para o meio, resultando em perda de reprodutibilidade e redução do tempo de vida útil do sensor. Além disto, por este método é difícil controlar a quantidade de enzima efetivamente imobilizada no suporte [17].

3.3.5.2 *Ligação Covalente*

Este método de imobilização consiste na formação de ligações químicas covalentes entre a enzima e o suporte. A ligação geralmente é formada entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais pertencentes aos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima [70].

Cuidado especial deve ser tomado para que grupos importantes para o desempenho da atividade catalítica não sejam envolvidos na formação de ligação covalente entre a enzima e o suporte, o que teria como consequência, a perda da atividade enzimática [31].

Geralmente o suporte para a ligação necessita de ativação prévia de seus grupos reativos a fim de torna-los fortemente eletrofílicos (deficientes de elétrons) para então, reagir com os grupos nucleofílicos (doadores de elétrons) da superfície da enzima e formar a ligação covalente [70]. Esta ativação, na maioria das vezes consiste em silanização, reações com carboiminas, carboimidias e glutaraldeído [56].

Quando se utiliza a polianilina como suporte na imobilização covalente de enzimas, esta é previamente ativada com glutaraldeído como descrito por Caramori et al. [75, 76] e Fernandes et al. [77, 78].

O método de imobilização via ligação covalente é bastante estável em relação aos demais, contudo requer maior tempo para a realização, além de ser mais difícil de executar [72].

3.3.5.3 *Entrapment*

A imobilização por *entrapment* ou aprisionamento difere das demais já que a enzima está livre em solução, mas seu movimento é restrito pela estrutura em forma de rede de um gel ou polímero. Na maioria das vezes, o método é baseado na imobilização da enzima durante a síntese de polímeros condutores através de oxidação eletroquímica do monômero em solução contendo a enzima. Além disto, um agente reticulante pode ser adicionado ao meio a fim de auxiliar na formação de uma estrutura tridimensional que aprisione a enzima [70].

Este método permite a cobertura completa e uniforme da superfície do eletrodo, controle da espessura do filme a ser depositado e grande reprodutibilidade. Outra vantagem da imobilização por *entrapment* é que a síntese do polímero e a imobilização da enzima são realizadas em uma única etapa [67].

Apesar das vantagens, este método possui algumas limitações. São necessárias altas concentrações de enzima e monômero em solução e o procedimento de imobilização diminui a acessibilidade do analito à molécula de enzima [17].

3.3.5.4 Confinamento

Consiste em confinar a enzima através de diferentes formas, dentro de membranas semipermeáveis (cápsulas) ou então na rede tridimensional de um polímero. No caso da imobilização em cápsulas, as moléculas grandes de enzima não conseguem passar para fora da cápsula, mas pequenos substratos e produtos conseguem, permitindo assim a movimentação de produtos pela estrutura do sensor [70].

A imobilização pelo confinamento em polímero reticulado é conveniente para processos que envolvem substrato de baixo peso molecular e permite uma maior estabilidade quanto a alterações no microambiente da enzima.

A vantagem da imobilização por confinamento é que a enzima não reage quimicamente com o suporte, não comprometendo assim seu centro ativo. Porém, no caso do confinamento em cápsulas, os processos difusionais através de suas membranas podem rompê-las e também comprometem o tempo de resposta do biossensor. Além disso, a atividade enzimática pode ser prejudicada pela necessidade do substrato de se difundir através da matriz do polímero reticulado [56, 57].

3.4 Biossensores

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lions em 1962 e ficou conhecido como “eletrodo enzimático”. O conceito foi testado em uma experiência usando a enzima glicose oxidase imobilizada na superfície de um eletrodo de oxigênio. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos nesta área até a produção do primeiro biossensor comercial, em 1975 [34, 53].

Nos últimos anos, biossensores têm atraído a atenção de muitos pesquisadores por todo o mundo, os quais tem se dedicado a criação de novos sensores e ao desenvolvimento dos já existentes. Com a necessidade de portabilidade, miniaturização e rapidez de resposta, os biossensores têm encontrado aplicações em praticamente todas as áreas científicas, como diagnóstico, biotecnologia, indústria alimentícia, engenharia genética, dentre outras. Além destas áreas, os biossensores podem ser utilizados na pecuária, para a detecção de drogas veterinárias residuais, na área ambiental, para o monitoramento de pesticidas e na agricultura, para a detecção de patógenos.

Na área da saúde, estes dispositivos permitem o diagnóstico do paciente no local de atendimento ou em salas de emergência, e também o monitoramento contínuo em leitos de pacientes ou em sua própria casa, como os sensores de glicemia, já bastante conhecidos no mercado. Com a aplicação dos biossensores é possível simplificar qualquer análise química que utilize como detector um organismo capaz de ser imobilizado, reduzindo o custo e o tempo de análises [68].

3.4.1 Conceitos e definições

Biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que converte a concentração de um analito (sinal biológico) em um sinal elétrico proporcional a esta concentração, através da integração de um elemento biológico sensor com um transdutor [11, 42, 69].

No que diz respeito aos biossensores eletroquímicos, ou seja, aqueles que convertem o sinal biológico em uma grandeza como corrente ou potencial elétrico, a

União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) criou algumas definições, classificações e nomenclaturas, as quais definem biossensor eletroquímico como “um dispositivo integrado auto-referente (*self-contained*), capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é mantido em contato espacial direto com um elemento de transdução eletroquímica” [34, 68]. Desta forma, um biossensor é composto basicamente de um receptor bioquímico e de um transdutor.

3.4.1.1 Receptor bioquímico

O receptor bioquímico ou biocomponente é o elemento biologicamente ativo que interage com o analito de forma específica e reversível, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos associados com esta interação, podendo produzir íons, elétrons, luz ou calor [68].

O receptor, no caso de um sensor, pode ser qualquer substância ou sistema capaz de detectar o sinal bioquímico. Já no caso dos biossensores, o receptor deve ser necessariamente um elemento vivo o qual pode ser uma enzima, um anticorpo, um antígeno, uma célula, dentre outros, sendo responsável pelo reconhecimento do analito, especificidade e estabilidade do biossensor. É necessário que o receptor esteja intimamente ligado ao transdutor a fim de facilitar a transmissão do sinal biológico. Portanto, a etapa de imobilização do biocomponente é fundamental para a sensibilidade de resposta do biossensor.

Levando em consideração o receptor, os biossensores podem ser classificados em catalíticos e por bioafinidade, também conhecidos como imunossensores.

Os imunossensores envolvem a especificidade da ligação entre antígeno e anticorpo. Nestes dispositivos, os anticorpos ou antígenos são imobilizados em um substrato e a ligação antígeno-anticorpo gera mudanças em condutância, massa, calor e propriedades ópticas, as quais são detectadas por um transdutor [11].

Os biossensores catalíticos utilizam a especificidade das reações enzimáticas as quais resultam em um produto que é detectado e quantificado através de um transdutor. A maioria dos biossensores enzimáticos utiliza as enzimas da classe das oxidoredutases como receptor biológico, já que estas geram como produto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é fácil de detectar e quantificar [34, 79].

3.4.1.2 Transdutor

O transdutor converte o sinal biológico resultante da interação do biocomponente em um sinal elétrico ou digital que pode ser quantificado, reproduzido e analisado. O sistema de transdução mais adequado pode ser adaptado ao sensor dependendo da natureza da interação bioquímica das espécies de interesse [79, 80].

Em geral, os transdutores se enquadram em quatro categorias: eletroquímicos (amperométricos e potenciométrico), ópticos (colorimétrico, fluorescente e luminescente), baseados na variação de massa (piezoelétricos) e calorimétricos (baseados na temperatura) (Figura 20). Dentre estes, os transdutores eletroquímicos são os mais aplicados e estudados.

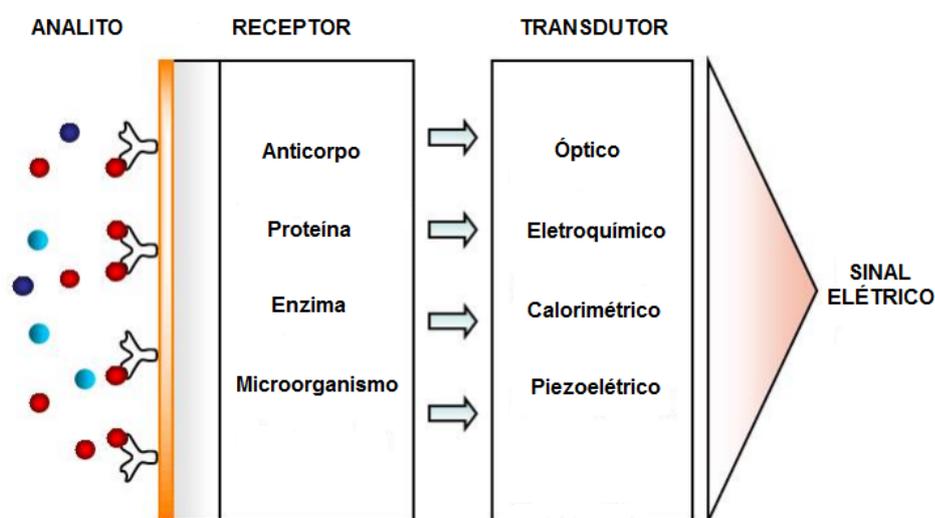


Figura 20 - Representação gráfica dos constituintes de um biossensor [81].

3.4.1.2.1 Biossensores amperométricos

Um biossensor amperométrico mede a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou reagente, sob a aplicação de um potencial constante, apresentando uma resposta rápida, boa sensibilidade e precisão em relação aos biossensores potenciométricos. Apresentam também, resposta linear em uma faixa mais ampla de concentração do analito e, portanto, são os mais utilizados [57, 69].

Este tipo de biossensor é aplicado na indústria, medicina, monitoramento do ambiente e também em sensores comerciais de glicose, e dão uma análise mais precisa do analito a ser medido, pois a relação entre a quantidade de substrato e o sinal criado varia linearmente de acordo com a Equação 5:

$$I = nFAv_a \quad (5)$$

onde I é a corrente criada na reação, n o número de elétrons transferidos, A é a área do eletrodo, F a constante de Faraday e v_a a taxa em que a reação ocorre, sendo esta proporcional à concentração do substrato [56].

Como dito anteriormente, utiliza-se as enzimas da classe das oxidoredutases como receptores. Estas enzimas quase sempre liberam como subproduto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é facilmente detectado amperometricamente pela liberação de elétrons, conforme a Equação 6:



A quantidade de elétrons liberada é proporcional à concentração de H_2O_2 , que por sua vez, é proporcional à concentração do analito.

Diversos biossensores amperométricos têm sido desenvolvidos a fim de detectar os mais variados analitos como, por exemplo, polifenóis [82], triglicerídeos [83], colesterol [84], ácido úrico [85], dentre outros.

3.4.1.2.2 Biossensores potenciométricos

Biossensores potenciométricos utilizam eletrodos íon-seletivos como transdutores físicos e envolvem a medida de diferença de potencial entre um eletrodo de trabalho e um de referência.

São constituídos por uma membrana contendo biocatalisadores imobilizados onde ocorre a reação catalisada enzimaticamente. As enzimas catalisam a conversão do analito em reações que consomem ou liberam prótons. A geração ou consumo de prótons H^+ altera o pH do meio e uma diferença de potencial é criada entre um eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo [11, 56]. Esta diferença de potencial é proporcional ao logaritmo da atividade iônica, ou concentração, conforme descrito pela equação de Nernst-Donnam (Equação 7):

$$E = E_0 - \frac{RT}{zF} \ln ([i]) \quad (7)$$

sendo E o potencial lido, E_0 uma constante característica da membrana seletiva do biossensor, R a constante dos gases, T a temperatura absoluta, z a carga iônica, F a constante de Faraday e $[i]$ é a concentração da espécie iônica livre, ou seja, a concentração do analito [57].

No caso do H_2O_2 , sua detecção é possível devido à geração dos dois prótons H^+ , conforme a Equação 6.

Biossensores potenciométricos encontram aplicação na detecção de vários analitos como, por exemplo, ureia [86], glicose [87] e colesterol [88].

3.4.2 Tecnologia de filmes espessos aplicados aos biossensores

A fim de facilitar a comercialização e miniaturização dos biossensores, muitos pesquisadores propuseram a utilização de uma tecnologia denominada de tecnologia de filmes espessos. Esta técnica além de versátil e barata permite a integração do sensor com o circuito elétrico em diversos arranjos e permite a produção em massa de biossensores [89].

Um biossensor construído a partir desta técnica consiste em camadas de tintas especiais (ou pastas) depositadas sequencialmente sobre um substrato ou suporte isolante. O que distingue a técnica de filmes espessos das outras é a forma de aplicação das tintas chamada de *screen-printing* (ou serigrafia), uma das técnicas mais antigas de reprodução das artes gráficas [90]. A impressão do filme é feita através de um molde ou tela em contato com o substrato e o filme é depositado pela transferência do padrão do molde, geralmente na forma de trilhas (Figura 21).

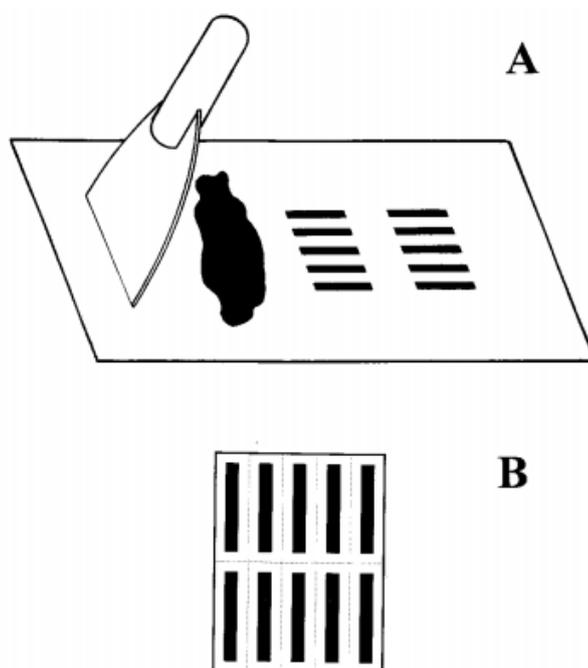


Figura 21 – (A) Ilustração do processo de impressão pela colocação da pasta sobre o molde e espalhamento com espátula, (B) 10 eletrodos impressos [91].

A tecnologia de filmes espessos permite a produção de sensores no estado sólido, robustos mecanicamente e de fácil reprodutibilidade. Porém, a técnica também apresenta algumas limitações como a adesão dos filmes ao substrato, compatibilidade entre os materiais utilizados e a própria técnica de impressão [89, 92]. Atualmente já existem impressoras destinadas somente à impressão das trilhas condutoras dos sensores.

A tendência nesta área é integrar o eletrodo de trabalho, o contra eletrodo e o eletrodo de referência em um só dispositivo a fim de miniaturizar e simplificar a

utilização destes dispositivos [90]. Isto é possível a partir da impressão de três trilhas de tintas condutoras sobre o substrato, cada uma atuando como um eletrodo, formando as conhecidas tiras teste, conforme pode ser visualizado na Figura 22. A maioria dos dispositivos estudados recentemente utiliza esta configuração.

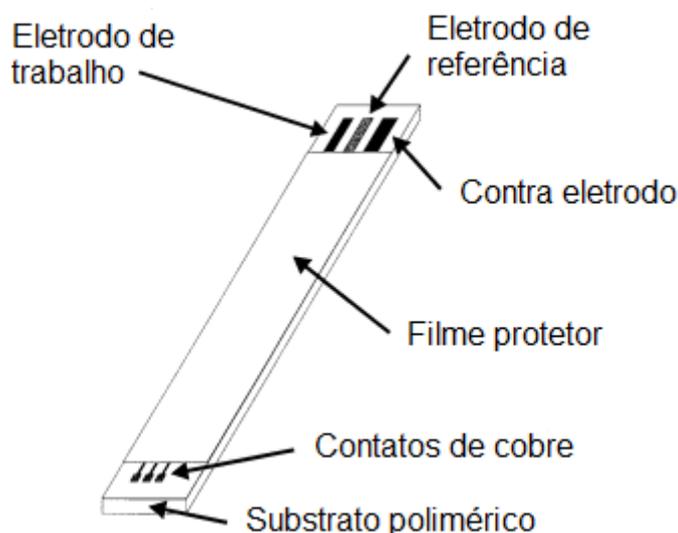


Figura 22 – Desenho esquemático de uma tira teste produzida pela tecnologia de filmes espessos [90].

3.5 Polímeros condutores em biossensores

A pesquisa na área de PICs para aplicações biomédicas teve uma grande expansão com a descoberta, nos anos 80, de que estes materiais são compatíveis com muitas moléculas biológicas, incluindo aquelas utilizadas em biossensores [17].

Os PICs apresentam grandes vantagens quanto à área biomédica como biocompatibilidade, habilidade de aprisionar e imobilizar biomoléculas, liberação controlada de fármacos e habilidade de transferir cargas elétricas produzidas em uma reação bioquímica. Outra vantagem desta classe de polímeros é a flexibilidade de suas estruturas químicas, as quais podem ser modificadas através dos agentes dopantes, métodos de síntese, etc., proporcionando propriedades de acordo com a aplicação desejada [17, 69, 79].

Outros fatores que devem ser levados em consideração são as vantagens dos PICs em relação a outros materiais mais sofisticados que são utilizados na área biomédica. PICs apresentam baixo custo, são fáceis de sintetizar e possuem propriedades bastante versáteis. Quanto à síntese, ainda há uma vantagem adicional visto que podem ser precisamente sintetizados e depositados na forma de filmes finos sobre a superfície de um eletrodo, podendo estar intimamente em contato com biomoléculas.

Levando em consideração todas as vantagens descritas acima, os PICs são amplamente utilizados em biossensores como suporte para a imobilização de biomoléculas e como transdutores, integrando os sinais biológicos e elétricos. São utilizados também, para aumentar a estabilidade, velocidade e sensibilidade em aplicações biomédicas [69, 79].

Como discutido anteriormente, há diversas formas de imobilização de enzimas e todas elas podem usar como suporte um PIC, proporcionando boa faixa de detecção e resposta rápida, já que a reação redox ocorre no interior da matriz do polímero [69]. Ao mesmo tempo em que o PIC atua como suporte para a imobilização de enzimas, ele está atuando também como transdutor, auxiliando no transporte de cargas elétricas, conforme ilustrado na Figura 23.

O fator mais importante que afeta o funcionamento de um biossensor, especialmente o biossensor amperométrico, é justamente esta transferência de cargas elétricas entre o receptor e a superfície do eletrodo, a qual pode ser auxiliada por um PIC. Este tipo de biossensor é conhecido como biossensor de terceira geração e é caracterizado pela co-imobilização da enzima e do mediador, neste caso um PIC, sobre a superfície do eletrodo, proporcionando contato direto da enzima com o eletrodo. No entanto, o exato mecanismo desta transferência de elétrons não é completamente entendido.

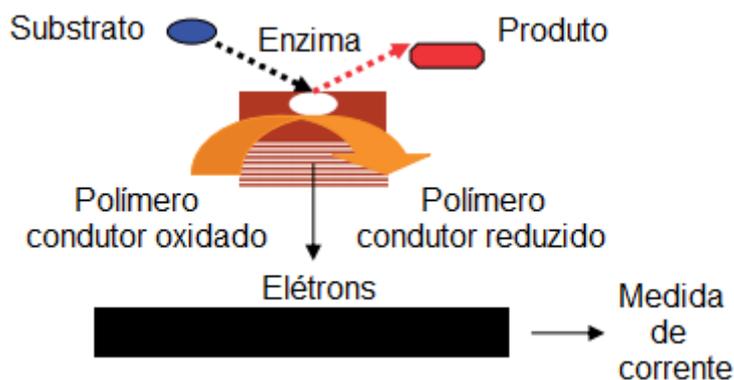


Figura 23 – Aplicação de PICs como transdutores em biossensores [17].

Dentre os PICs, a PANi destaca-se como um material interessante para ser aplicado em biossensores já que pode atuar como um excelente mediador de elétrons nas reações redox enzimáticas. Seu papel como mediador é possível devido às cargas deslocalizadas presentes nas estruturas polarônicas. Além disto, a PANi é considerada um polímero atrativo para esta aplicação pois possui dois pares de reações redox os quais facilitam a transferência de cargas entre enzima-polímero, não precisando de auxílio de nenhum outro mediador. A PANi também atua como um excelente suporte na imobilização de enzimas devido à flexibilidade química e estrutural ao redor dos seus nitrogênios imina, permitindo uma ligação e imobilização efetiva de biomoléculas [34].

Nos últimos anos, os estudos voltados à aplicação de PICs em biossensores tem mostrado uma tendência ao desenvolvimento de PICs nanoestruturados já que estes proporcionam maior sensibilidade e respostas mais rápidas em sensores e biossensores. Nesta área, a PANi novamente leva vantagem já que nanoestruturas são obtidas facilmente apenas com algumas modificações no método e condições de síntese, proporcionando as propriedades físicas e eletroquímicas desejadas para a aplicação em biossensores [34, 42].

Apesar de todas as vantagens apresentadas pelos PICs, este material ainda encontra dificuldades para ser utilizado nos biossensores. O maior obstáculo é a aplicação do polímero sobre a tira teste.

Grande parte dos artigos produzidos nos últimos anos que envolvem a utilização de PICs em biossensores estuda apenas diferentes métodos de

imobilização enzimática, geralmente com o polímero na forma de pó ou então sintetizado eletroquimicamente, ou seja, não estuda a produção do dispositivo em sua totalidade, englobando desde a imobilização enzimática até a produção e aplicação do polímero sobre as tiras teste. É necessário realizar estudos que viabilizem a utilização de PICs em biossensores de forma que seja possível obter condições reais de análise e uma futura produção em escala industrial.

Considerando estas necessidades, neste trabalho foram desenvolvidas todas as etapas de preparação de um biossensor, envolvendo desde a produção das tiras com as trilhas condutoras, até a imobilização da enzima num PIC e aplicação sobre o sensor.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a síntese dos polímeros foram utilizados anilina (Synth) previamente destilada e armazenada sob refrigeração, ácido poliestireno sulfônico (PSS - Sigma, Mw = 75.000 g/mol, 18% em massa, solução em água), ácido clorídrico (HCl - Nuclear) e persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈ - Synth). Membranas de diálise foram utilizadas para a purificação das soluções (Fisherbrand, MWCO de 12.000 – 14.000).

Para a produção das tiras teste, três trilhas foram pintadas sobre um substrato de PVC (0,6 mm de espessura) com pasta de carbono (Gwent Group, referência C2030519P4) e pasta de Ag/AgCl (Gwent Group, referência C61003P7).

A enzima estudada foi a horseradish peroxidase Tipo VI (HRP - Sigma, ~ 1500 UI/mg). Para os testes colorimétricos, foi utilizada uma solução de 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina (TMB – Sigma) em dimetil sulfóxido (DMSO – Sigma) como doador de elétrons, uma solução de pH 5 de hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄ anidro - Nuclear) e ácido cítrico anidro (C₆H₈O₇ - Synth) em água de osmose reversa como diluente e por fim, peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - Vetec, 40% em solução, determinada por titulação) como substrato da enzima. Foi utilizado ácido sulfúrico (H₂SO₄ - Vetec) como solução para cessar a reação enzimática.

Para as lavagens das tiras, foram utilizadas soluções de tampão fosfato salino (PBS) 10X (Na₂HPO₄ anidro – Synth, NaH₂PO₄ anidro – Synth, NaCl anidro – Vetec em água de osmose reversa), PBS Tween (Tween 20 – Vetec, 0,05% em PBS) e dodecil sulfato de sódio 10% em água de osmose reversa (SDS – Synth).

4.2 Síntese dos polímeros

A síntese dos polímeros foi realizada em Becker de 250 mL, com agitação magnética e à temperatura ambiente. Manteve-se a relação entre monômero/oxidante em 4:1, com valor de $K = 5$ (Equação 1, página 13). Os polímeros foram sintetizados de acordo com o método de adição rápida de reagentes proposto por Huang e Kaner [45].

Para a síntese da PAni pura, anilina foi dissolvida em HCl 1M assim como o agente oxidante, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. As duas soluções foram adicionadas rapidamente e mantidas sob agitação magnética por 1 hora. Para a produção dos polímeros dopados com PSS, o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ foi solubilizado em PSS nas concentrações de 5, 10 e 20% em massa em relação ao monômero e a reação prosseguiu da mesma maneira que para a PAni pura. A Figura 24 apresenta as fotos da reação da amostra de PAni com 20% em massa de PSS onde é possível observar que após 30 min, PAni no seu estado de oxidação sal de esmeraldina começa a se formar e em 1 hora toda a solução está verde escura, indicando o término da reação.

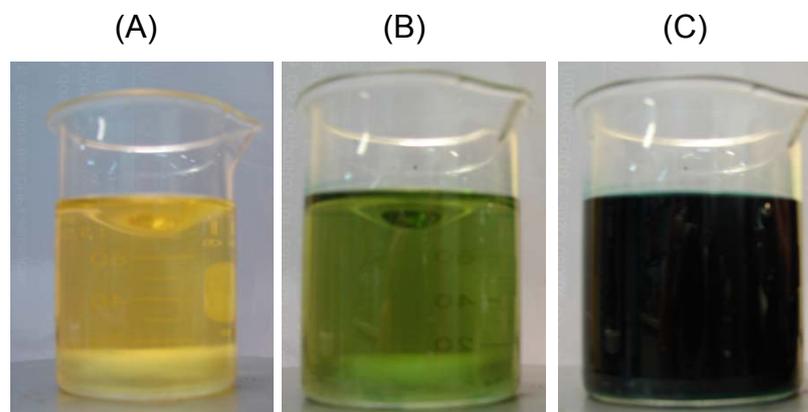


Figura 24 – Fotos da reação da amostra de PAni com 20% em massa de PSS em (A) início da reação, (B) 30 minutos e (C) 1 hora.

Após o término das reações, as soluções foram purificadas através de diálise em água destilada por aproximadamente 1 hora a fim de eliminar o excesso de HCl, oxidante que não reagiu e oligômeros. Parte das soluções foi seca em estufa a 60°C

para fins de caracterização e a outra parte teve seu pH ajustado para 5 com NaOH 4M (o pH final da reação de todos os polímeros ficou em torno de 1), a fim de otimizar o processo de imobilização enzimática. As amostras foram nomeadas de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Nomenclatura das amostras produzidas.

Amostra	Nomenclatura
Polianilina pura	PAni
Polianilina com 5% em massa de PSS	PAni + PSS 5%
Polianilina com 10% em massa de PSS	PAni + PSS 10%
Polianilina com 20% em massa de PSS	PAni + PSS 20%

A Figura 25 mostra as amostras com o pH 1 e com o pH 5. Observa-se que, ao ajustar o pH para 5, a amostra de PAni adquiriu um tom rosado que pode estar relacionado com a desdopagem devido ao ajuste do pH. Já a amostra de PAni + PSS 20% fica dispersa em solução.

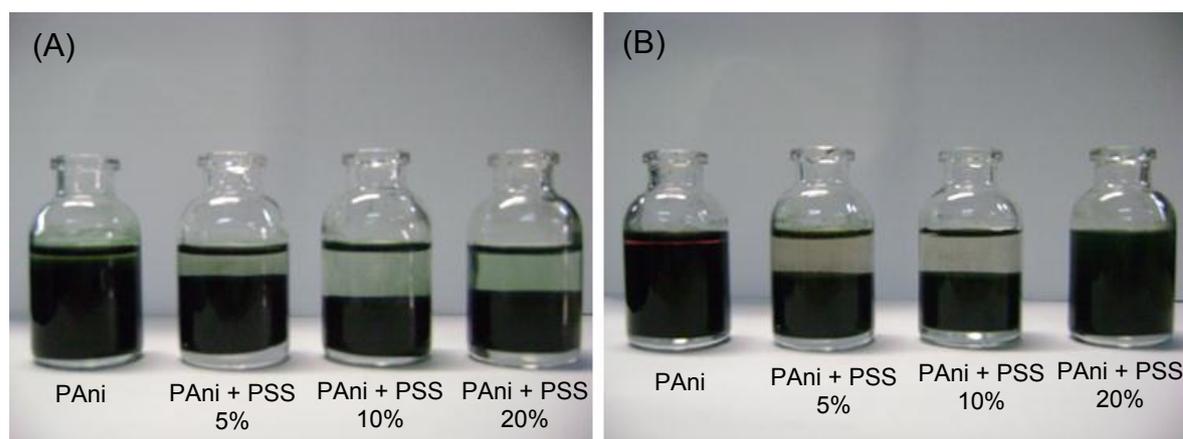


Figura 25 – Amostras sintetizadas (A) pH 1, (B) pH 5.

4.2.1 Caracterização dos polímeros

Os polímeros foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), condutividade elétrica e voltametria cíclica.

4.2.1.1 FT-IR

As análises de FT-IR são realizadas a fim de se obter informações sobre o estado de oxidação da PANi e interação entre o agente dopante e a cadeia polimérica. As análises foram realizadas utilizando-se pastilha do material a ser analisado com KBr. Os polímeros foram previamente secos e moídos para a confecção das pastilhas. Foi utilizado um espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum 1000. Tanto os polímeros com o pH 1 quanto aqueles com o pH ajustado para 5 foram analisados para verificação de possíveis modificações químicas na estrutura dos polímeros com este ajuste.

4.2.1.2 MET

Para esta análise, uma alíquota dos polímeros foi diluída a 1% em água e depositada sobre *grid* (grade) de cobre com filme de carbono. Os *grids* foram secos a temperatura ambiente. Somente os polímeros com os valores de pH ajustados para 5 foram analisados já que o pH não influencia na morfologia. A análise foi realizada em microscópio JEOL JEM 1200.

4.2.1.3 Condutividade elétrica

A condutividade foi medida com as amostras em forma de pastilha, usando o método padrão de quatro pontas em um equipamento Cascade Microtech CS 4-64, associado a uma fonte Keithley 227 e a um nanovoltímetro Keithley 2182A. O método consiste em aplicar corrente nas pontas externas e medir o potencial nas pontas internas. A condutividade é determinada a partir do inverso da resistividade, a qual é calculada pela Equação 8:

$$\rho = \frac{V}{I} w F_2 F_4 \quad (8)$$

onde ρ é a resistividade ($\Omega \cdot \text{cm}$), V é o potencial (Volts), I é a corrente (Ampéres), w é a espessura da amostra (cm) e F_2 e F_4 são constantes que dependem da espessura da amostra, diâmetro e distância entre as ponteiras [93].

4.2.1.4 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica utilizada em conjunto com o método de 4 pontas para caracterizar as propriedades redox do material. Porém, a voltametria cíclica não pode ser utilizada para medir a condutividade quantitativamente, ela somente indica se o material está de fato condutor. Além disto, pode fornecer informações quanto à estabilidade, reversibilidade do sistema e potenciais de oxidação e redução [17].

O método consiste na ciclagem do potencial de um eletrodo (eletrodo de trabalho) imerso em uma solução sem agitação a partir de um valor inicial até um limite pré-determinado onde a direção da varredura se inverte. Durante a ciclagem, valores de corrente são medidos e o resultado é expresso na forma de um gráfico de corrente (eixo vertical) *versus* potencial (eixo horizontal). Parâmetros importantes a serem determinados a partir desta curva são a magnitude dos picos de corrente (catódicos e anódicos) e a localização dos picos em relação aos valores de potencial [94].

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em uma célula com três eletrodos. O eletrodo de trabalho utilizado foi uma rede de Pt sobre a qual as amostras na forma de pó foram depositadas e envolvidas com papel filtro, garantindo o contato entre a amostra e o eletrodo, além de evitar que a amostra se desprendesse. Como contra eletrodo foi utilizado um fio de Pt e como referência um eletrodo de calomelano saturado (ECS). Três diferentes eletrólitos foram testados, HCl 1M (pH 1), KCl 1M (pH 5) e PBS (pH 7). O potencial foi ciclado de -0,2 V a 0,8 V vs ECS, com velocidade de varredura de 10 mV/s. As medidas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT 302 com auxílio do software GPES.

4.3 Produção das tiras teste

As tiras foram produzidas pela técnica de *silk-screen*, a partir da utilização de uma tela de serigrafia onde foi impresso o desenho dos biossensores. A Figura 26 mostra as dimensões das trilhas dos biossensores e a tela de serigrafia utilizada.

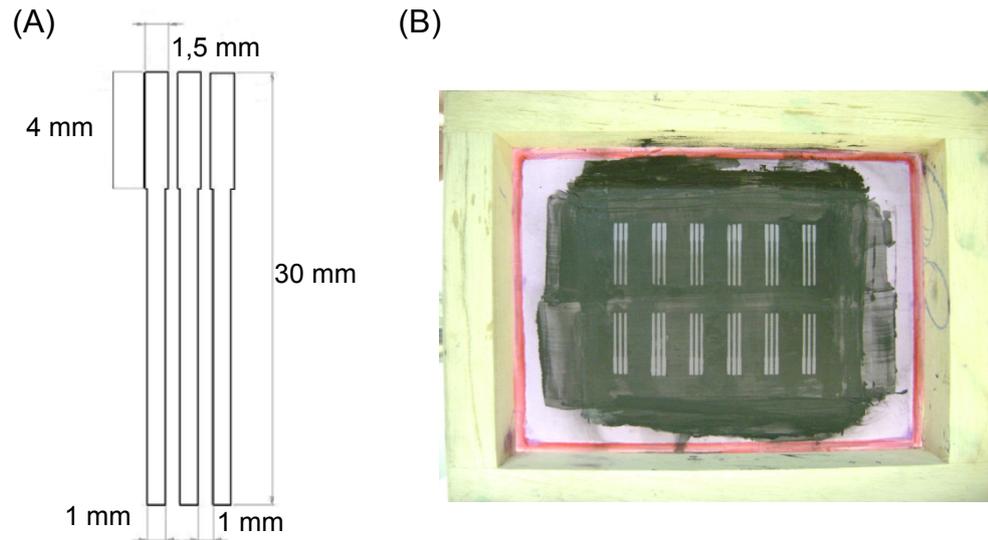


Figura 26 – (A) Dimensões das trilhas do biossensor e (B) tela de serigrafia utilizada.

Com a tela pronta, foi utilizada a pasta de carbono para pintar a base das três trilhas e a pasta de Ag/AgCl para pintar a área destinada ao eletrodo de referência. Conforme pode ser observado na Figura 27, somente a extremidade das trilhas de carbono é que constitui a área efetiva dos eletrodos de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência, resultando numa área total de 6 mm^2 ($4 \text{ mm} \times 1,5 \text{ mm}$) para cada eletrodo

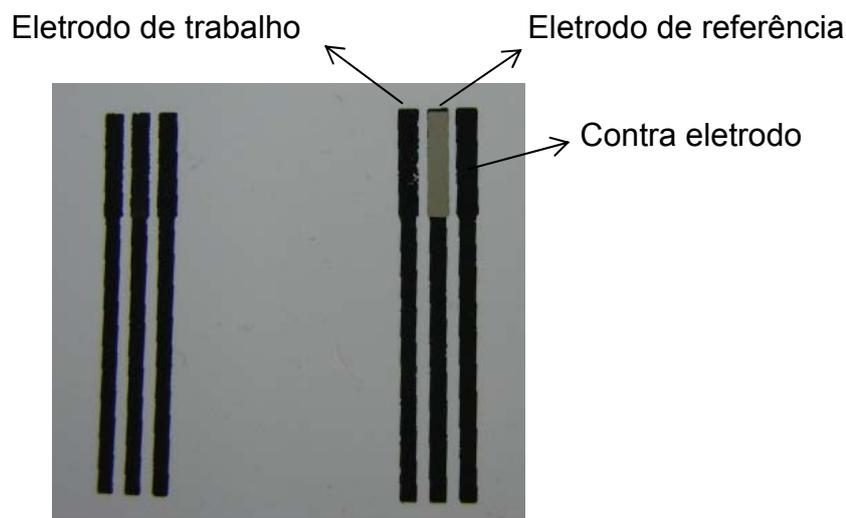


Figura 27 – Tiras teste pintadas pelo método de *silk-screen* com as pastas de carbono e Ag/AgCl.

4.3.1 Caracterização das tiras teste

Após a produção das tiras, 5 μL dos polímeros com o pH ajustado para 5 foram aplicados sobre o eletrodo de trabalho com o auxílio de uma micropipeta e secos em estufa a 37°C. As tiras contendo somente o polímero condutor foram caracterizadas pelas técnicas de microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e voltametria cíclica.

4.3.1.1 MO

A superfície das tiras foi observada por microscopia óptica a fim de analisar a cobertura das pastas sobre o substrato de PVC, assim como, a cobertura dos polímeros sobre a pasta de carbono. A análise foi realizada em microscópio modelo Trinocular Axio Scope A1 com luz refletida em aumento de 20x.

4.3.1.2 MEV

A superfície das tiras foi observada também por microscopia eletrônica de varredura para analisar a morfologia dos polímeros após a aplicação sobre a pasta

condutora. A análise foi realizada em microscópio JEOL JSM 6060 com as amostras previamente metalizadas com ouro.

4.3.1.3 Voltametria cíclica

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados com as tiras, utilizando a trilha de carbono como contra eletrodo, a trilha de carbono coberta com Ag/AgCl como referência e a trilha de carbono coberta com os polímeros como eletrodo de trabalho.

Para fazer os contatos elétricos com o potenciostato, foi utilizado um cabo USB de forma que cada trilha da tira entrasse em contato com os contatos elétricos metálicos do dispositivo USB. O sistema foi montado conforme a Figura 28. Desta forma, a tira pôde ser estudada e a corrente que realmente passa pelo sensor pôde ser determinada.

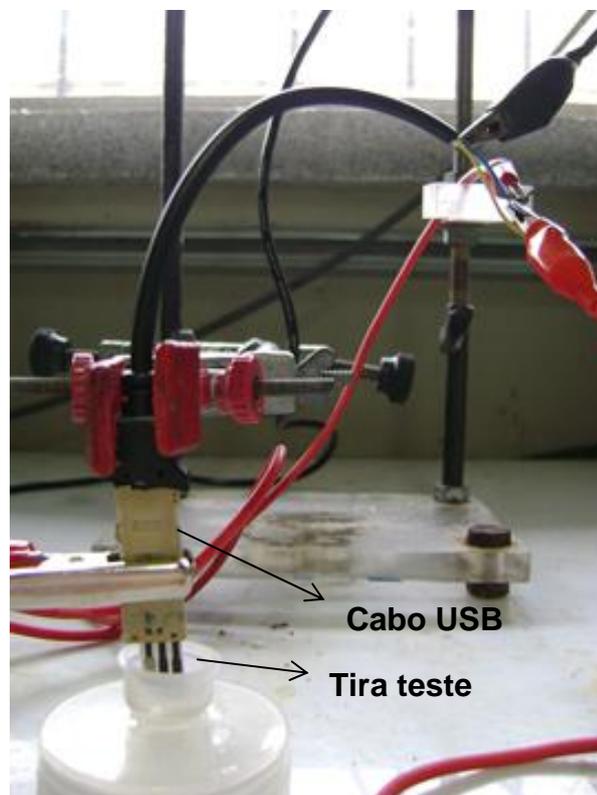


Figura 28 – Sistema utilizado para os testes de voltametria cíclica.

Os eletrólitos utilizados foram KCl 1M e PBS e o potencial foi ciclado de -0,2 V a 0,8 V vs ECS, com velocidade de varredura de 10 mV/s, para desta forma comparar os resultados deste ensaio com aquele realizado com os polímeros na forma de pó.

Além da tira teste produzida neste trabalho, também foi realizado o ensaio de voltametria cíclica para uma tira comercial fabricada pela empresa EcoBioServices, a qual também é formada por três eletrodos, sendo os eletrodos de trabalho e contra eletrodo fabricados com pasta de carbono e o eletrodo de referência com pasta de Ag/AgCl. Porém, as trilhas da tira comercial são impressas com impressoras especiais e não por *silk-screen*. Na Figura 29 estas tiras podem ser visualizadas.

Deve-se destacar que esta tira é comercializada como uma “base” para posteriores modificações para produção de sensores e biossensores, ou seja, contém somente as trilhas impressas com as pastas condutoras.

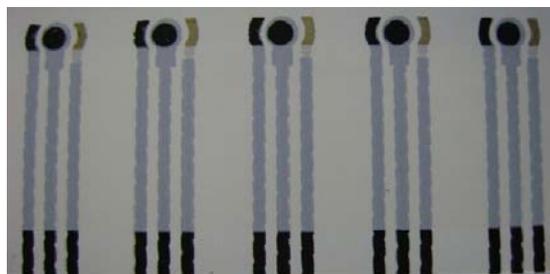


Figura 29 – Tiras comerciais produzidas pela EcoBioServices.

O objetivo do ensaio com a tira comercial foi comparar a ordem de grandeza da corrente gerada pelos eletrodos comerciais com a dos eletrodos produzidos neste trabalho.

4.4 Imobilização da enzima e caracterização dos biossensores

Para a imobilização, cada solução de polímero foi misturada com soluções de enzima em água nas concentrações de 3200 UI/mL, 1600 UI/mL, 800 UI/mL, 400 UI/mL e 200 UI/mL (concentrações determinadas a partir de testes preliminares).

Manteve-se a relação de 1:1 entre a solução de polímero e a solução de enzima. Após a mistura, 5 μL de cada solução final foram aplicados sobre a área destinada ao eletrodo de trabalho (apenas uma das trilhas de carbono foi utilizada para estes ensaios tendo em vista que não é necessária a utilização do eletrodo de referência e do contra eletrodo). A trilha foi seca em estufa a 37°C, por 30 min.

Para estes ensaios, foram estudadas as amostras de PANi, PANi + PSS 5% e PANi + PSS 20% tendo em vista que representam os casos extremos, ou seja, PANi pura e PANi com a menor e maior concentração de PSS.

A eficiência da imobilização enzimática foi caracterizada através de ensaios colorimétricos pelo método ELISA (do inglês Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) os quais avaliam a atividade enzimática. A partir destes ensaios foi possível realizar os seguintes estudos:

- Atividade da enzima livre e da enzima imobilizada nos polímeros;
- Determinação do método de imobilização enzimática;
- Influência da concentração de H_2O_2 nos testes colorimétricos.

Já a sensibilidade amperométrica do biossensor ao H_2O_2 foi estudada através de ensaios de cronoamperometria. Todos os ensaios colorimétricos foram realizados na empresa FK Biotecnologia.

4.4.1 Estudo da atividade da enzima livre e imobilizada

O método ELISA se baseia nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. O princípio básico deste método é a mudança e intensidade de coloração que ocorre na amostra a partir da adição do anticorpo ou, neste caso, do substrato da enzima.

Neste trabalho, o método ELISA foi utilizado para estimar a atividade da enzima HRP imobilizada nos diferentes polímeros sintetizados. De acordo com as Equações 2, 3 e 4, observa-se que o ciclo catalítico da HRP necessita da presença de um substrato redutor, o qual é um forte doador de elétrons. Durante a reação este substrato sofre alterações químicas, as quais, dependendo da sua natureza, causam

alterações na sua cor. Desta forma, a alteração da cor durante a reação confirma a presença de peroxidase ativa no meio e através da intensidade desta cor, estima-se sua atividade.

Para isto, foi utilizada uma solução reveladora cujos reagentes estão descritos na Tabela 3. Os reagentes utilizados, sua concentração e proporção seguiram protocolo de teste da FK Biotecnologia.

Tabela 3 – Reagentes utilizados para os testes colorimétricos.

Reagente	Função	Concentração	Proporção
TMB	Substrato doador de elétrons	0,1 mg/mL em DMSO	10%
Na₂HPO₄ e ácido cítrico	Diluyente TMB	45 mM	90%
H₂O₂	Substrato da enzima	0,09% (v/v)	0,3%

250 µL da solução descrita acima foram adicionados em cada poço de uma microplaca de ELISA de 96 poços e as trilhas com a enzima imobilizada no polímero foram colocadas em cada poço. A reação prosseguiu por 15 min quando então, foram retirados de cada poço 125 µL e adicionados outros 125 µL de uma solução de H₂SO₄ 1M para cessar a reação enzimática. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA Thermo Plate modelo TP-Reader.

Para estimar a perda da atividade enzimática com a imobilização, o mesmo ensaio foi realizado com a enzima livre. Para isto, as soluções de enzima nas concentrações de 3200 UI/mL, 1600 UI/mL, 800 UI/mL, 400 UI/mL e 200 UI/mL foram misturadas com água (ao invés dos polímeros) na proporção de 1:1 e 5 µL desta solução final foram aplicados sobre a trilha e secos em estufa a 37°C por 30 min. O ensaio prosseguiu da mesma maneira que o realizado para a enzima imobilizada nos polímeros.

4.4.2 Estudo do método de imobilização da enzima

Como descrito anteriormente, a imobilização da enzima nos PICs ocorreu pela simples mistura de duas soluções, uma contendo o polímero e a outra contendo a enzima. A solução final foi depositada sobre a trilha de carbono e seca em estufa. A partir daí, não é possível afirmar qual o método de imobilização (adsorção, confinamento, ligação covalente) ou qual o tipo de ligação que está ocorrendo entre a HRP e a PAni ou PAni dopada com PSS. Analisando a descrição dos métodos de imobilização apresentada no item 3.3.5 na página 27, pode-se estimar que existam dois métodos de imobilização passíveis de estar ocorrendo: adsorção física ou confinamento na matriz polimérica.

Para avaliar qual a forma de imobilização predominante neste sistema, as trilhas foram submetidas a lavagens com diferentes soluções partindo do pressuposto de que cada solução eliminaria da superfície da trilha as moléculas de enzima ligadas de diferentes maneiras. Uma solução poderia remover as moléculas de enzima que ficaram somente depositadas sobre a superfície após a secagem enquanto uma outra solução conseguiria penetrar na matriz polimérica e arrastar as moléculas de enzima confinadas. Já uma terceira solução conseguiria romper as ligações físicas das moléculas de enzima adsorvidas ao polímero.

Cada trilha, depois de retirada da estufa, foi submetida à lavagem com três soluções diferentes: PBS, PBS Tween e SDS 10%. A lavagem consistiu em mergulhar a trilha na solução e agitá-la 3 vezes mantendo desta forma, um método padrão para todas as soluções. Após a lavagem, cada trilha foi colocada em um poço da microplaca e a análise por método ELISA prosseguiu da mesma forma que descrito no item anterior. Menores leituras de absorbância significam que uma maior quantidade de enzima foi eliminada da superfície do sensor.

4.4.3 Estudo da influência da concentração de H₂O₂

O método ELISA aplicado até este momento baseou-se no protocolo de testes utilizado pela FK Biotecnologia, ou seja, foram mantidas as concentrações de 90% de TMB, 10% de diluente e 0,3% de H₂O₂.

A fim de estudar a influência da concentração de H_2O_2 nos valores de absorbância e futuramente relacionar estes valores aos valores de corrente obtidos nos ensaios amperométricos, a porcentagem de H_2O_2 utilizada no teste foi variada em dois valores abaixo e dois valores acima da porcentagem de 0,3%. Além disto, considerando que a peroxidase apresenta desativação de seu centro ativo pelo excesso de H_2O_2 [65] é importante determinar a partir de qual concentração de peróxido esta desativação pode começar a ocorrer. As porcentagens em volume (% v/v) e a correspondente concentração em mol de H_2O_2 (considerando o volume de 250 μ L do poço da microplaca) utilizadas neste estudo estão listadas na Tabela 4.

Este teste ocorreu da mesma forma que os anteriores, ou seja, após imobilização da enzima no polímero, aplicação sobre a trilha de carbono e secagem em estufa, as trilhas foram submetidas ao método ELISA, porém, variando-se a concentração do H_2O_2 . Todas as concentrações de enzima foram testadas para obtenção de curvas de absorbância.

Tabela 4 – Concentrações de H_2O_2 utilizadas no ensaio colorimétrico.

% (v/v)	Concentração (mmol)
0,075	0,002
0,15	0,005
0,3	0,010
0,6	0,020
1,2	0,040

4.4.4 Estudo da sensibilidade do biossensor ao H_2O_2

A técnica de cronoamperometria é amplamente utilizada na caracterização de biossensores. Consiste na imersão do biossensor em um eletrólito e, sob agitação e aplicação de um potencial constante, são feitas adições do analito. A corrente inicial medida no eletrólito é muito baixa e resulta de pequenas quantidades de impureza ou espécies adsorvidas na superfície do sensor. A cada adição, corresponde um

aumento na corrente, que é proporcional ao analito adicionado [95]. O gráfico resultante tem o formato daquele apresentado na Figura 30.

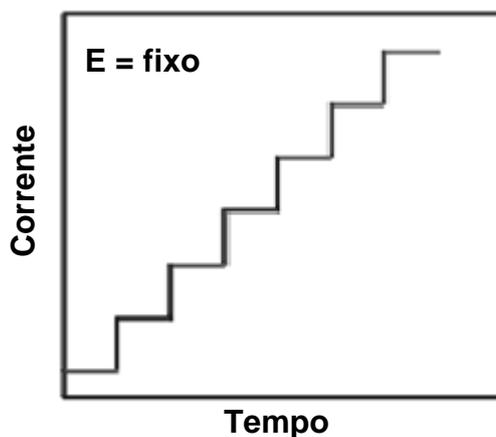


Figura 30 – Representação gráfica dos dados obtidos por cronoamperometria [95].

O ensaio de sensibilidade realizado consistiu na aplicação de um potencial de 0,6 V e adições sucessivas, a cada 2 minutos, de uma alíquota de 10 μL (0,14mmol) de H_2O_2 com micropipeta, a qual auxiliou também na agitação do sistema. O resultado é um gráfico conforme o da Figura 30 através do qual é possível construir um gráfico de corrente *versus* concentração de H_2O_2 onde é esperada uma relação linear. A faixa de concentrações onde esta relação corrente/concentração se mantém linear é definida como o intervalo de sensibilidade do biossensor.

Além do intervalo de sensibilidade, é possível determinar o tempo de resposta do biossensor, o qual é definido como o tempo necessário para que ocorra a mudança no sinal. No caso da cronoamperometria, o tempo necessário para o pico de corrente ser atingido.

Para a realização do ensaio de cronoamperometria, o sistema foi montado da mesma maneira que para a realização da voltametria cíclica com o sensor (Figura 28, página 48) e as medidas foram realizadas com o auxílio do potenciostato Autolab PGSTAT 302 e do software GPES. 1500 μL de PBS foram utilizados como eletrólito em todos os ensaios. Somente uma concentração de enzima foi testada (1600 UI/mL) a qual foi escolhida de acordo com os resultados dos testes preliminares.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão que serão relacionados a seguir foram divididos em três partes principais: síntese dos polímeros, produção e caracterização das tiras e por último, imobilização da enzima no polímero seguida pela caracterização do biossensor.

5.1 Caracterização dos polímeros

5.1.1 FT-IR

Os espectros de infravermelho dos polímeros sintetizados em pH 1 e dos polímeros com o pH ajustado para 5 podem ser visualizados nas Figuras 31 e 32, respectivamente. O intervalo de comprimentos de onda analisados foi de 4000 a 400 cm^{-1} , porém o espectro foi reduzido para o intervalo de 1800 a 900 cm^{-1} , já que é neste intervalo que se localizam as bandas de interesse.

Analisando o espectro de transmitância do PSS e comparando com os dados obtidos da literatura, pode-se afirmar que as bandas características deste polímero são aquelas em 1033 e 1007 cm^{-1} , as quais correspondem à vibração no plano e ao estiramento simétrico do grupo SO_3^- , respectivamente [96]. Estas bandas podem ser visualizadas com baixa intensidade nas PANis dopadas com o PSS nos dois valores de pH, devido à baixa concentração de PSS na matriz de PAni.

Analisando os espectros das PANis puras em ambos os valores de pH, observa-se bandas intensas em torno de 1100 cm^{-1} , as quais se referem a vibração no plano das ligações C-H. As bandas em torno de 1300 cm^{-1} e 1400 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento das ligações C=N e C-N da cadeia das PANis [96].

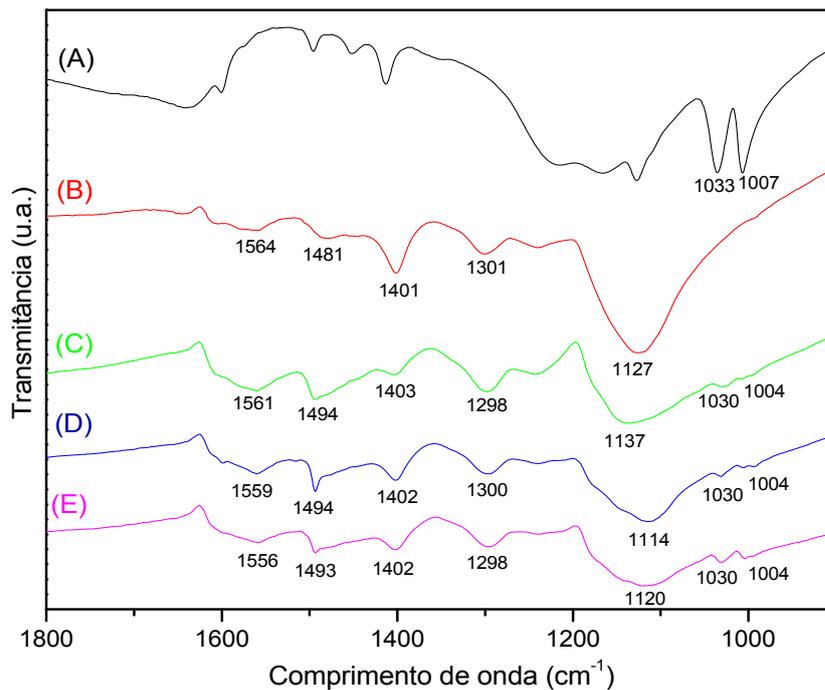


Figura 31 – Espectroscopia FT-IR das amostras poliméricas de pH 1. (A) PSS, (B) PANi, (C) PANi + PSS 5%, (D) PANi + PSS 10% e (E) PANi + PSS 20%.

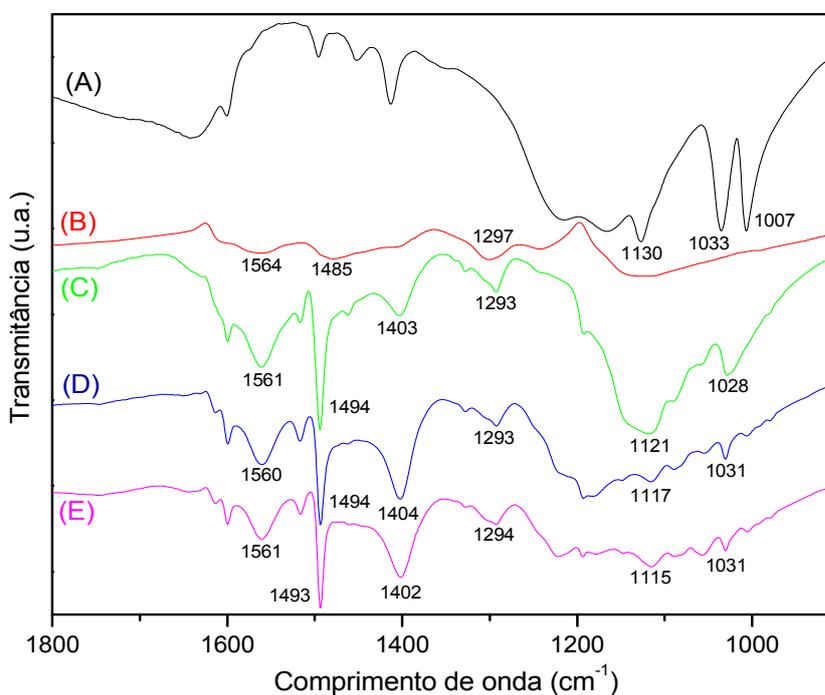


Figura 32 - Espectroscopia FT-IR das amostras poliméricas de pH 5. (A) PSS, (B) PANi, (C) PANi + PSS 5%, (D) PANi + PSS 10% e (E) PANi + PSS 20%.

Uma característica importante e que pode ser examinada por FT-IR é o estado de oxidação do polímero, o qual pode ser determinado a partir da relação

entre a intensidade das bandas em torno de 1560 cm^{-1} (estiramento das ligações C=C dos anéis quinoides) com a intensidade das bandas em torno de 1490 cm^{-1} (estiramento das ligações C=C dos anéis benzenoide). As estruturas benzenoides predominam nos estados reduzidos enquanto que as estruturas quinoides predominam nos estados oxidados [29, 31].

Através da Figura 31, a qual mostra o espectro dos polímeros com pH 1, observa-se que as bandas em torno de 1560 e 1490 cm^{-1} apresentam praticamente a mesma intensidade, com as bandas em torno de 1490 cm^{-1} levemente mais intensas. Isto indica que os polímeros não estão no estado totalmente oxidado, mas sim parcialmente oxidados e parcialmente reduzidos. Este fato está de acordo com o esperado, visto que as PANis foram sintetizadas em meio ácido na sua forma verde condutora, sal esmeraldina.

Analisando a Figura 32 observa-se que os picos em torno de 1490 cm^{-1} são mais intensos do que os picos em 1560 cm^{-1} para os polímeros de pH 5. Portanto, há predominância de anéis benzenoides (reduzidos) os quais indicam que os polímeros estão em um estado majoritariamente reduzido. Este fato também está de acordo com o esperado tendo em vista que o pH foi ajustado para 5 e a intensidade da cor verde diminuiu, porém não chegando a atingir a cor azul, que indicaria um polímero totalmente reduzido.

Desta forma, pode-se afirmar que PANi na sua forma dopada sal esmeraldina foi sintetizada na presença de 5, 10 e 20% em massa de PSS. Ao ajustarmos o pH das amostras para 5, os polímeros foram parcialmente desdopados estando em um estado intermediário de oxidação.

5.1.2 MET

A técnica de caracterização por microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para confirmar a formação de nanofibras, conforme previsto ao se utilizar o método de síntese por adição rápida de reagentes. Somente os polímeros com pH ajustado para 5 foram analisados.

De acordo com a Figura 33, observa-se que as nanofibras se formaram apenas nas amostras de PANi e PANi + PSS 5% sendo que nesta última, o diâmetro das nanofibras é menor tendo em vista que todas as barras de escala correspondem a 0,2 μm .

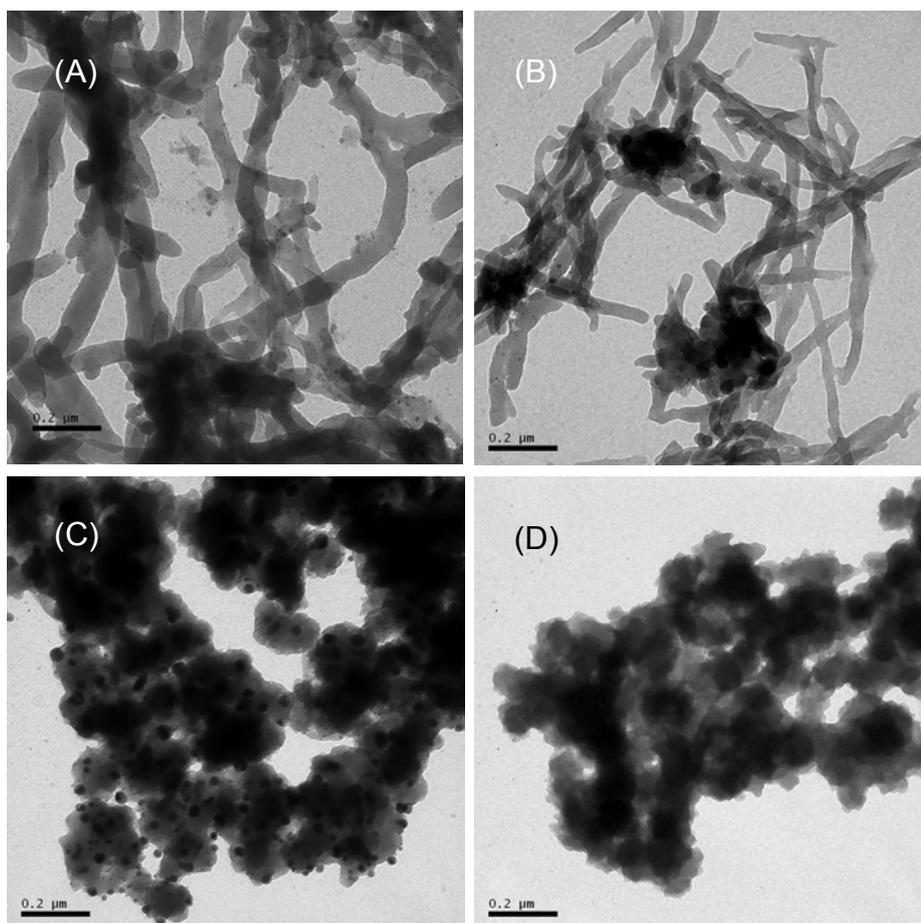


Figura 33 – Micrografias MET das amostras sintetizadas. (A) PANi; (B) PANi + PSS 5%, (C) PANi + PSS 10% e (D) PANi + PSS 20%.

Observa-se também que ao aumentar a concentração de PSS na síntese para 10 e 20% em massa, aglomerados de partículas são formados. Na amostra de PANi + PSS 10%, além das partículas ocorreu também a formação de nanoesferas. Já na amostra contendo 20% de PSS partículas sem forma definida se formaram sendo que algumas possuem diâmetro na ordem de nanômetros.

O PSS nas concentrações de 10 e 20% pode estar atuando como uma impureza no meio reacional e não somente como dopante, levando à ocorrência de

nucleação heterogênea da PANi e desta forma, a morfologia nanoestruturada não consegue ser formada.

5.1.3 Condutividade elétrica

Os resultados do ensaio de condutividade elétrica pelo método de 4 pontas para os polímeros com pH 5 estão listados na Tabela 5. Os ensaios foram realizados em duplicata e para cada pastilha, 5 valores de corrente foram aplicados. Os resultados da Tabela 5 representam a média dos valores obtidos.

Tabela 5 – Condutividade elétrica dos polímeros sintetizados determinada pelo método de 4 pontas.

Amostra	Condutividade (S/cm)
PAni pH 5	2,8 ± 0,68
PAni + PSS 5% pH 5	1,2 ± 0,46
PAni + PSS 10% pH 5	1,4 ± 0,49
PAni + PSS 20% pH 5	0,4 ± 0,04

Analisando a Tabela 5, observa-se que os valores de condutividade tendem a diminuir com a adição do PSS na síntese. Como dito anteriormente, a dopagem e protonação da PANi não acontecem de forma homogênea pois há formação de domínios completamente metálicos (condutores) embebidos em regiões isolantes [3]. A adição de um polieletrólito na síntese, além de estabilizar os portadores de carga pela dopagem, forma uma matriz isolante na qual o polímero fica inserido [27]. Desta forma, a adição do PSS aumenta a proporção das regiões isolantes (matriz), prejudicando a transferência de elétrons e, conseqüentemente, diminuindo a condutividade elétrica.

Outro fator importante que influencia nos valores de condutividade é o pH, já que a PANi pode ser tornada condutora por protonação. Como o pH dos polímeros foi ajustado para 5 a fim de auxiliar na imobilização de enzima, uma perda em condutividade deve ter ocorrido. Apesar disto, os valores de condutividade se

encontram na ordem de grandeza esperada para os polímeros sintetizados nas condições descritas neste trabalho.

5.1.4 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é um método auxiliar para verificar o comportamento eletroquímico da PANi, como as mudanças no estado de oxidação do polímero.

Dois conceitos são bem definidos e conhecidos em relação ao ensaio de voltametria cíclica aplicado à PANi [3, 97]:

1. PANi existe em 3 estados de oxidação principais: leucoesmeraldina, esmeraldina e pernigranilina. Através da voltametria cíclica, 2 pares de processos redox podem ser visualizados na faixa de potencial de 0,2 a 1,0 V vs ECS. O primeiro corresponde a conversão entre os estados leucoesmeraldina e esmeraldina e o segundo, entre os estados esmeraldina e pernigranilina. Um voltamograma cíclico típico da PANi em seu estado condutor e em meio ácido está representado na Figura 10, página 13.
2. A eletroatividade da PANi depende principalmente do pH do meio. Em meios neutros e alcalinos a PANi perde sua eletroatividade e o comportamento acima tende a desaparecer.

Considerando o segundo item, as aplicações deste polímero ficariam restritas àquelas onde somente um meio ácido pode ser utilizado, ou seja, não seria possível utilizar a PANi como transdutor e suporte de enzimas em biossensores onde pH neutro ou alcalino são utilizados. Porém, estudos recentes [96] comprovaram que ao utilizar polieletrólitos negativamente carregados (por exemplo, poliácido acrílico (PAA) e PSS) como dopantes na síntese da PANi, a eletroatividade é mantida mesmo quando examinada em valores mais elevados de pH.

Assim, o ensaio de voltametria cíclica foi realizado para os polímeros com o pH ajustado para 5, tendo em vista que estes são os polímeros que serão utilizados na imobilização enzimática. Primeiramente, as amostras foram ensaiadas em meio

ácido (HCl 1M) a fim de verificar se estão no estado dopado e condutor. Neste ensaio preliminar, foi utilizado o intervalo de potenciais de -0,2 a 1,0 V vs ECS. Os voltamogramas cíclicos neste meio, referentes ao 2º ciclo de cada amostra, podem ser observados na Figura 34.

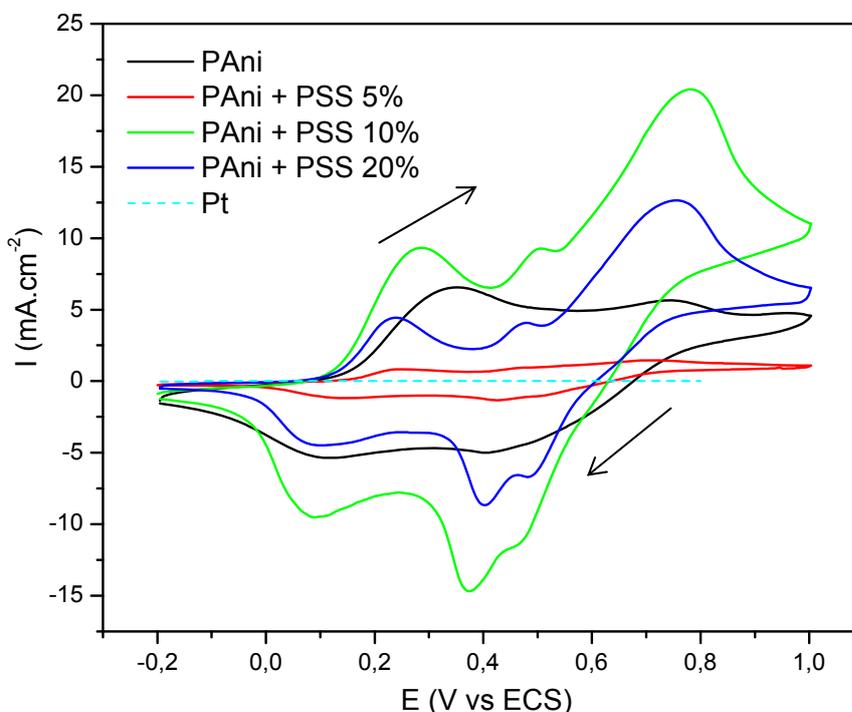


Figura 34 – Voltamogramas cíclicos dos polímeros com valor de pH ajustado para 5 em HCl 1 M. O potencial foi ciclado de -0,2 a 1,0 V vs ECS com velocidade de varredura de 10 mV/s.

Analisando a Figura 34 observa-se os dois pares de picos redox característicos da PAni para praticamente todas as amostras, indicando que os polímeros se encontram no estado condutor e eletroativo neste meio. Além disto, nas amostras contendo 10 e 20% em massa de PSS, um terceiro par de picos intermediário pode ser observado o qual está associado à degradação do polímero, provavelmente devido à presença do PSS. [3].

Os ensaios também foram realizados em dois outros eletrólitos: KCl 1M (pH 5) e PBS (pH 7). Os voltamogramas cíclicos podem ser observados na Figura 35.

Analisando a Figura 35 observa-se que o formato das curvas foi modificado em relação à curva padrão obtida em meios ácidos (Figura 10, página 13). Apenas um par de picos redox é visível em +0,35 V e -0,05 V em KCl. Em meio PBS o

sistema redox é menos evidente que em KCl, certamente pela baixa atividade da PANi em PBS e pelo pH 7.

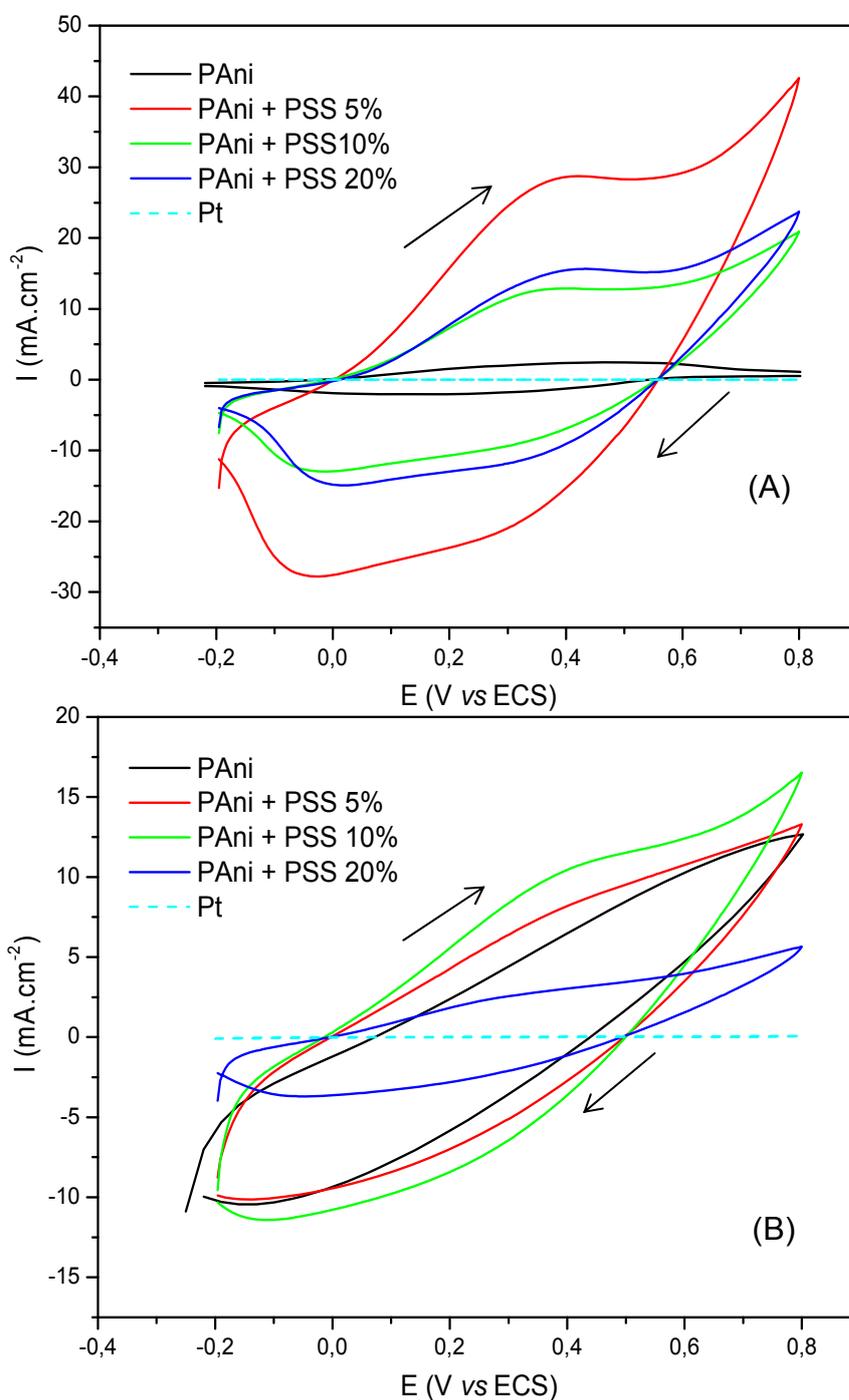


Figura 35 - Voltamogramas cíclicos dos polímeros com valor de pH ajustado para 5 em (A) KCl pH 5 e (B) PBS pH 7. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs ECS com velocidade de varredura de 10 mV/s.

Os ensaios realizados em KCl pH 5 tendem a mostrar os polímeros mais eletroativos tendo em vista que o pH do eletrólito ainda se mantém um pouco ácido, favorecendo a PANi. A amostra de PANi + PSS 5% se mostrou a mais ativa neste meio já que além de apresentar os fenômenos de oxidação e redução, possui a maior área no gráfico, confirmando sua alta eletroatividade.

Quando o PBS foi utilizado como eletrólito, a primeira característica a ser observada é a redução nos valores de densidade de corrente. Para a amostra de PANi + PSS 10%, um pequeno pico de oxidação pode ser observado em aproximadamente +0,38 V, porém o correspondente pico de redução não pode ser distinguido. Neste meio, esta foi a amostra que se mostrou mais eletroativa.

Em todos os meios estudados, a rede de platina utilizada como eletrodo de trabalho foi submetida à voltametria cíclica sem a adição do polímero (denominada Pt nas Figuras 34 e 35). Observa-se que a Pt não apresenta atividade eletroquímica no intervalo estudado, confirmando que as respostas eletroquímicas obtidas correspondem aos polímeros.

A adição de PSS a PANi levou à obtenção de um material cuja eletroatividade é superior a da PANi pura e cujo comportamento eletroquímico é mais claro em KCl pH 5 do que em PBS pH 7.

5.2 Caracterização das tiras teste

5.2.1 MO

A superfície das tiras, após a aplicação dos polímeros com pH 5, foi analisada por microscopia óptica a fim de verificar quanto da pasta de carbono foi efetivamente coberta pelo polímero. Um dos motivos da adição do PSS na síntese além dos já discutidos até agora, é possibilitar uma melhora das propriedades mecânicas da PANi, permitindo a formação de filmes homogêneos sobre superfícies. As imagens obtidas podem ser observadas na Figura 36.

A Figura 36 (A) e (B) mostra uma cobertura total e homogênea do substrato de PVC pelas pastas condutoras. Já os polímeros, mesmo aqueles contendo o PSS, não cobriram totalmente a superfície da trilha de carbono, deixando a pasta à mostra. Este fato pode prejudicar as respostas elétricas já que não há uma superfície homogênea para a passagem de corrente. Uma possível solução para melhorar a cobertura da superfície do sensor seria aumentar a quantidade em massa de PSS adicionada na síntese, facilitando a formação de filmes, porém perdendo em propriedades elétricas, ou então aumentar a quantidade de polímero aplicada sobre a tira.

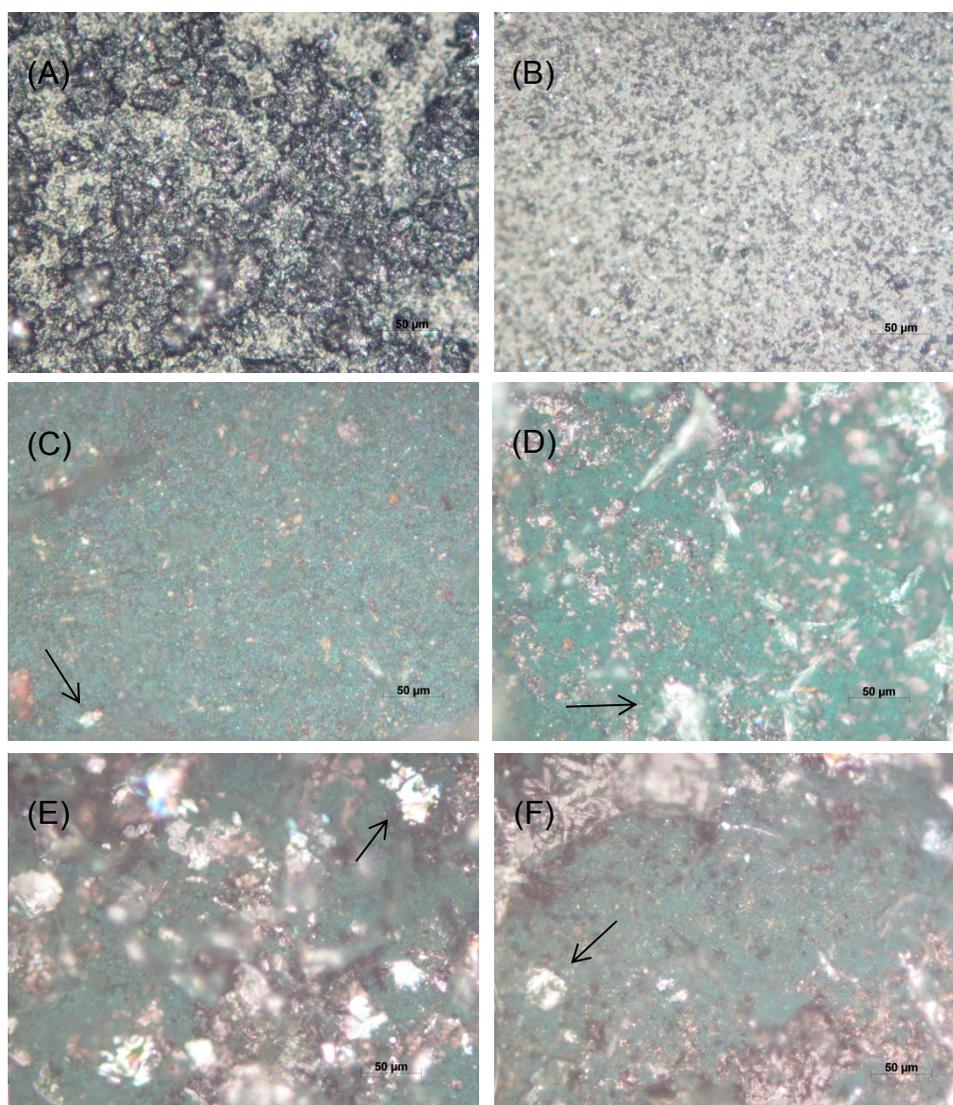


Figura 36 – Microscopias ópticas de (A) trilha de carbono; (B) trilha de Ag/AgCl; e trilha de carbono coberta com: (C) PANi; (D) PANi + PSS 5%, (E) PANi + PSS 10% e (F) PANi + PSS 20%.

Observa-se também a formação de cristais sobre os polímeros (indicados pelas setas na Figura 36) devido ao ajuste de pH com a solução de NaOH 4M. Estes cristais, por serem isolantes, também podem prejudicar o transporte de elétrons sobre a superfície do sensor.

5.2.2 MEV

A análise por microscopia eletrônica de varredura também foi realizada após a aplicação dos polímeros com pH 5 sobre a trilha de carbono com a finalidade de observar sua morfologia sobre a superfície. As microscopias podem ser visualizadas na Figura 37.

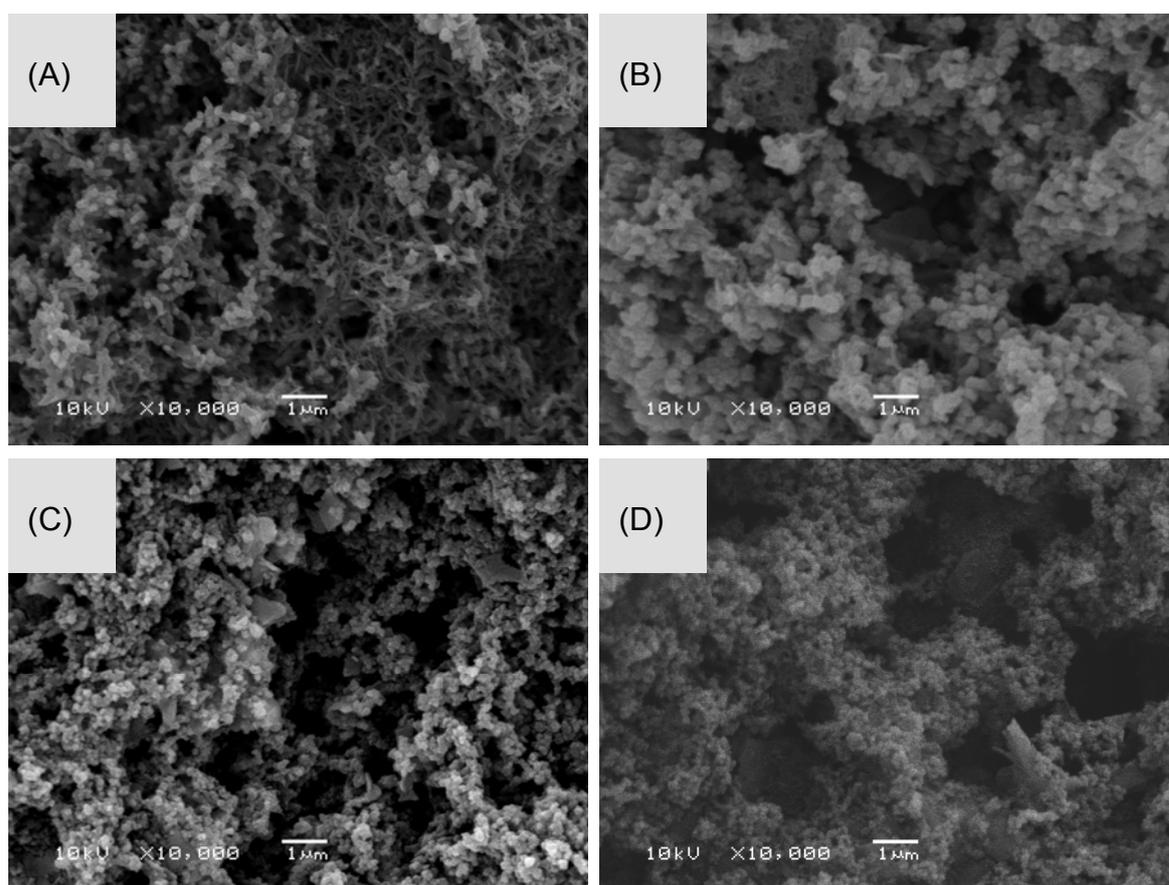


Figura 37 – Micrografias MEV das amostras de (A) PANi, (B) PANi + PSS 5%, (C) PANi + PSS 10% e (D) PANi + PSS 20%.

As imagens da Figura 37 confirmam o que já havia sido observado por MET. Nanofibras de PANi se formaram na amostra de PANi pura e na amostra de PANi + PSS 5%, sendo que nesta última também houve a formação de particulados. Já nas amostras contendo 10 e 20% em massa de PSS, particulados de vários diâmetros foram formados.

Pode-se observar também, uma elevada área superficial dos polímeros sobre a trilha, o que favorece os processos de imobilização enzimática e transporte de elétrons, resultando em melhores propriedades do biossensor.

5.2.3 Voltametria cíclica

Ensaio de voltametria cíclica também foram realizados utilizando as trilhas do sensor como eletrodo de trabalho, contra eletrodo e eletrodo de referência, conforme o esquema da Figura 28, página 48. O sensor sem a aplicação do polímero (denominado eletrodo na Figura 38) também foi estudado a fim de verificar a presença de possíveis interferentes nas pastas que poderiam oxidar ou reduzir no intervalo de análise.

Analisando a Figura 38 e comparando com a Figura 35, pode-se observar que as amostras se comportaram de maneira diferente após a aplicação sobre as trilhas. Primeiramente observa-se um decréscimo acentuado nos valores de densidade de corrente, antes da ordem de miliampères/cm² e agora, microampères/cm² devido à quantidade pequena de amostra e pelo fato do sistema estar miniaturizado.

Quando a solução de KCl foi utilizada como eletrólito, as amostras de PANi + PSS 10 e 20% mostraram os picos de oxidação e redução além de maior área no gráfico, resultando em polímeros com maior eletroatividade. A amostra de PANi + PSS 5%, que na voltametria cíclica com o polímero na forma de pó tinha apresentado a maior eletroatividade, neste ensaio se mostrou a amostra menos eletroativa.

Com o eletrólito de PBS, novamente a amostra de PANi + PSS 5% não apresentou os picos redox, sendo a menos eletroativa. Os outros polímeros

apresentaram praticamente a mesma eletroatividade e o PSS não pareceu interferir nas respostas eletroquímicas.

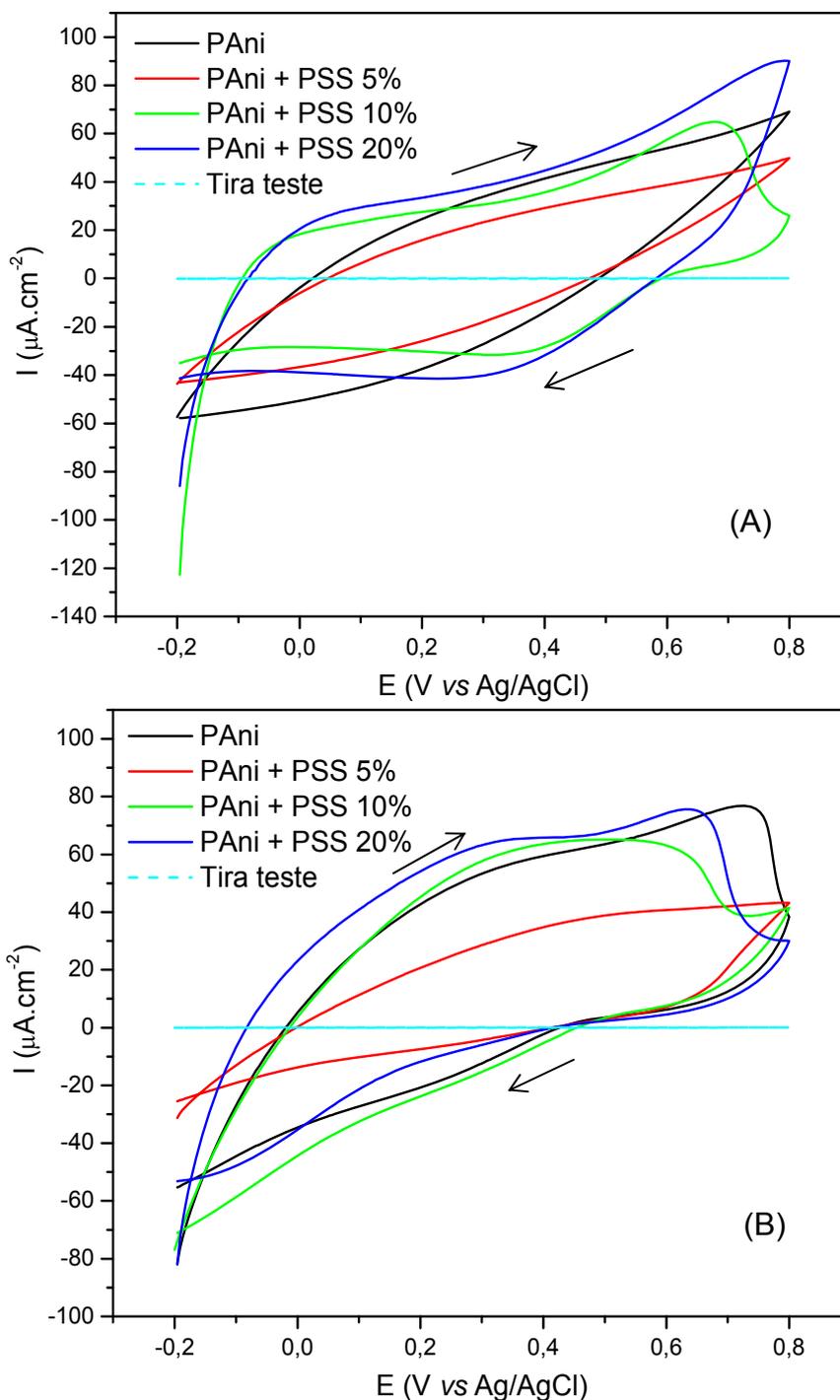


Figura 38 - Voltamogramas cíclicos das tiras cobertas com os polímeros com pH ajustado para 5 em (A) KCl, pH 5 e (B) PBS, pH 7. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV/s.

Este comportamento das amostras pode estar relacionado ao fato dos eletrodos serem totalmente diferentes daqueles utilizados na análise dos polímeros em forma de pó. Nesta análise, o eletrodo de trabalho foi a própria pasta de carbono, a qual é menos condutora que a platina utilizada no ensaio anterior, e desta forma respostas diferentes eram esperadas.

Observa-se também na Figura 38 que a tira sem a aplicação dos polímeros não mostra eletroatividade neste intervalo de potenciais, garantido que não houve interferências nas respostas eletroquímicas.

O ensaio de voltametria cíclica também foi utilizado para comparar as respostas eletroquímicas obtidas pela tira produzida neste trabalho com uma tira comercial. Para este ensaio, nenhum polímero foi aplicado sobre o eletrodo de trabalho. O resultado pode ser visualizado na Figura 39.

Analisando a Figura 39 observa-se que, tanto para o KCl quanto para o PBS, a tira comercial apresenta picos de oxidação e redução na faixa de análise. Já o sensor produzido neste trabalho não apresenta nenhum pico redox. Esta diferença deve estar relacionada ao fato de que as tiras não são produzidas a partir das mesmas pastas condutoras, ou seja, podem ter composições químicas diferentes. A eletroatividade da tira comercial na faixa de análise pode estar relacionada à presença de constituintes metálicos na pasta de carbono, adicionados com fins de melhorar a condutividade elétrica da tira.

Deve-se observar que a ordem de grandeza da densidade de corrente se manteve a mesma para os dois sensores nos dois meios, indicando que o método de fabricação não afetou na eficiência do sensor. Os sensores produzidos apresentaram praticamente a mesma densidade máxima de corrente nos dois meios ($\sim 0,1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$).

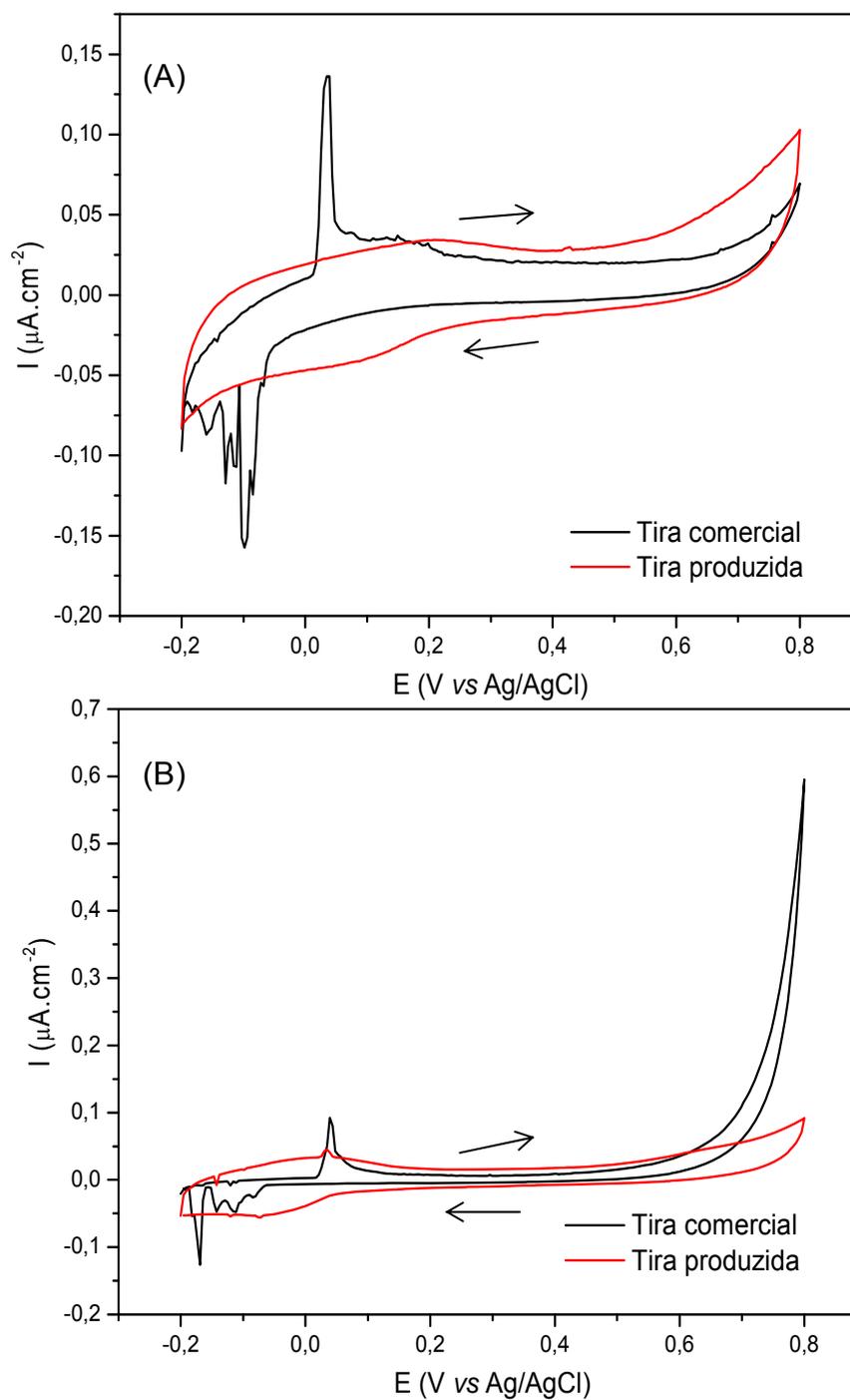


Figura 39 – Voltamogramas cíclicos da tira comercial e da tira produzida neste trabalho em (A) KCl e (B) PBS. O potencial foi ciclado de -0,2 a 0,8 V vs Ag/AgCl com velocidade de varredura de 10 mV/s.

5.3 Imobilização da enzima e caracterização dos biossensores

Considerando os resultados obtidos até agora, foram escolhidos apenas três polímeros para o estudo da imobilização da enzima: PANi, PANi + PSS 5% e PANi +

PSS 20%. Estas amostras foram escolhidas já que caracterizam as três diferentes microestruturas obtidas e as melhores coberturas sobre a pasta de carbono, conforme Figura 36. E também, pelos resultados de voltametria cíclica utilizando o sensor, caracterizam todos os comportamentos possíveis de eletroatividade, sendo que a amostra contendo 10% em massa de PSS possui um comportamento intermediário.

5.3.1 Estudo da atividade enzimática

Ao imobilizar a enzima em um suporte, parte da atividade enzimática é perdida. Fatores como o tipo de suporte, o pH do meio e o método de imobilização empregado determinarão o quão significativa é essa perda.

Sabe-se que a atividade enzimática pode ser determinada por testes colorimétricos, conforme discutido no capítulo Materiais e Métodos. O resultado destes testes é apresentado nas Figuras 40 e 41, as quais ilustram as curvas de absorvância para a enzima imobilizada nos diferentes polímeros e para a enzima livre, respectivamente.

Analisando a Figura 40 observa-se que maiores valores de absorvância, para todos os valores de concentração de enzima, foram obtidos quando PANi + PSS 20% foi utilizada como suporte.

A maior atividade da HRP imobilizada neste polímero pode ser atribuída a maior concentração de PSS no meio, a qual facilita a formação de complexos enzima-polieletrólito. Estes complexos aumentam a estabilidade da enzima e previnem sua dessorção da superfície do suporte [98].

Considerando as definições básicas de química analítica, sabe-se que o valor 1 de absorvância corresponde a 0% de transmitância, ou seja, uma solução de coloração intensa e, portanto concentrada. Desta forma, valores de absorvância maiores que 1 não tem significado químico e indicam sempre uma solução saturada. Para todos os polímeros, a concentração de 3200 UI/mL resulta em uma solução concentrada, com excesso de enzima. Já a concentração de 1600 UI/mL apresenta

bons resultados de absorvância para todas as amostras, principalmente para PAni + PSS 20%.

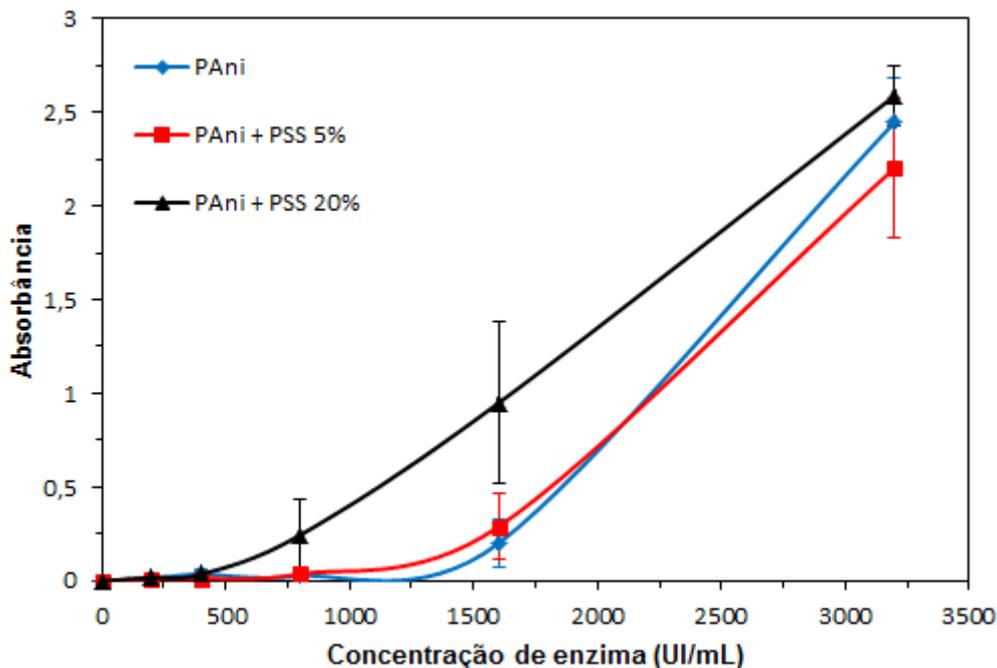


Figura 40 – Resposta espectroscópica para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PAni, PAni + PSS 5% e PAni + PSS 20%.

Porém, ao utilizar concentrações de enzima menores que 1600 UI/mL, os valores de absorvância caem drasticamente, indicando atividade quase nula da enzima.

Para avaliar a perda da atividade enzimática com a imobilização nos PICs, foi construída a curva da enzima livre em solução. Para isto, os valores de concentração de enzima utilizados na imobilização no polímero (3200, 1600, 800, 400 e 200 UI/mL) tiveram que ser diluídos 10 vezes a fim de se obter valores de absorvância significativos, ou seja, menores que 1. Porém, ainda assim os valores obtidos indicaram soluções saturadas para todas as concentrações, conforme ilustrado na Figura 41.

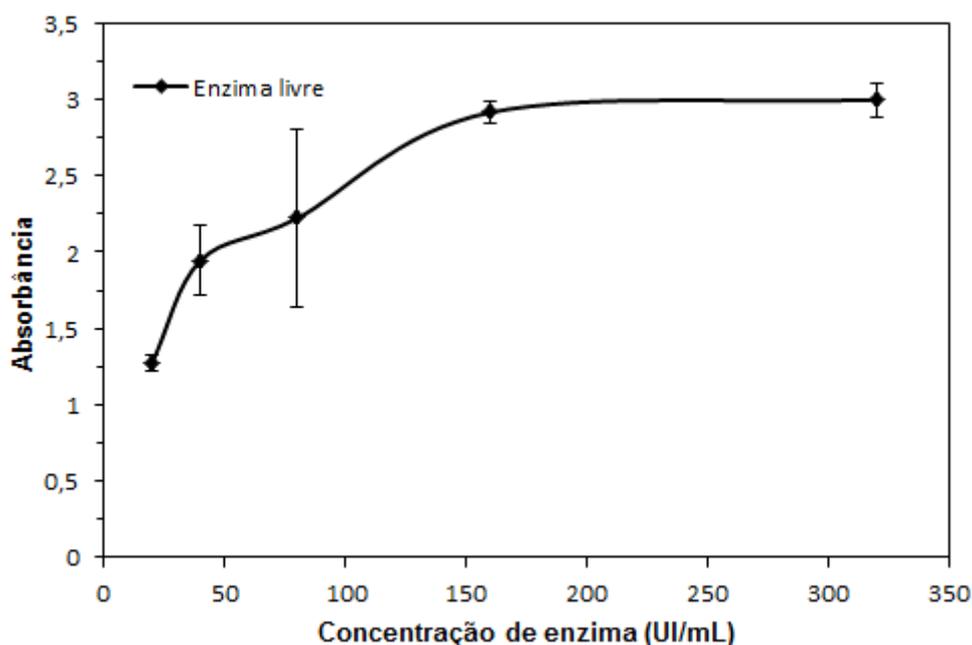


Figura 41 – Resposta espectroscópica da enzima livre, utilizando as concentrações diluídas em 10 vezes.

A partir deste resultado pode-se afirmar que houve uma grande perda da atividade enzimática ao utilizar os polímeros sintetizados como suporte. Atividades quase nulas em concentrações menores que 1600 UI/mL foram observadas após a imobilização nos PICs, enquanto que na enzima livre estes valores se encontram todos na zona de saturação.

Além do pH da solução de imobilização o qual não é o mais favorável para manter a atividade da HRP, este fato pode estar associado à presença do íon Cl^- em solução. Estudos [99] mostram que este íon parece se ligar na enzima nas mesmas posições que os íons F^- e CN^- os quais são conhecidos inibidores de atividade da HRP. Portanto, a baixa atividade da enzima após a imobilização nos PICs deve estar associada também a este fator.

5.3.2 Estudo do método da imobilização da enzima

Para estudar o método de imobilização, cada tira foi lavada com 3 soluções diferentes: PBS, PBS Tween e SDS. É importante destacar que cada tira foi lavada com apenas uma das soluções e logo após a lavagem, as leituras foram feitas.

Portanto, a tira não foi submetida a uma sequencia de três lavagens. Os resultados podem ser observados nas Figuras 42 a 44.

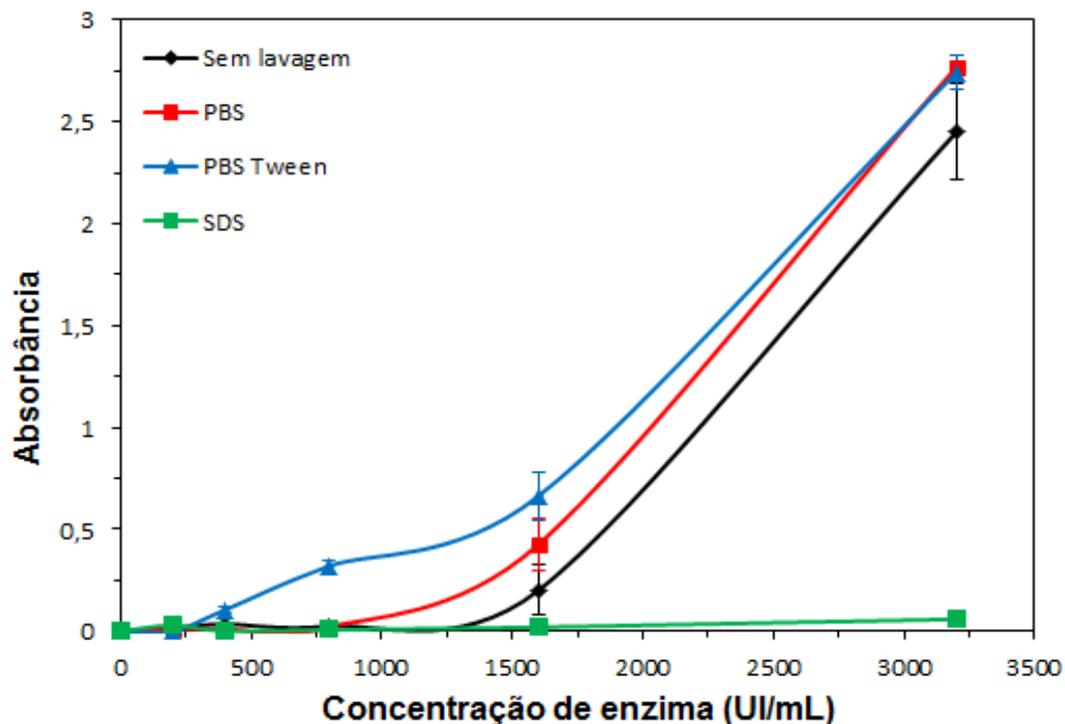


Figura 42 – Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PANi, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.

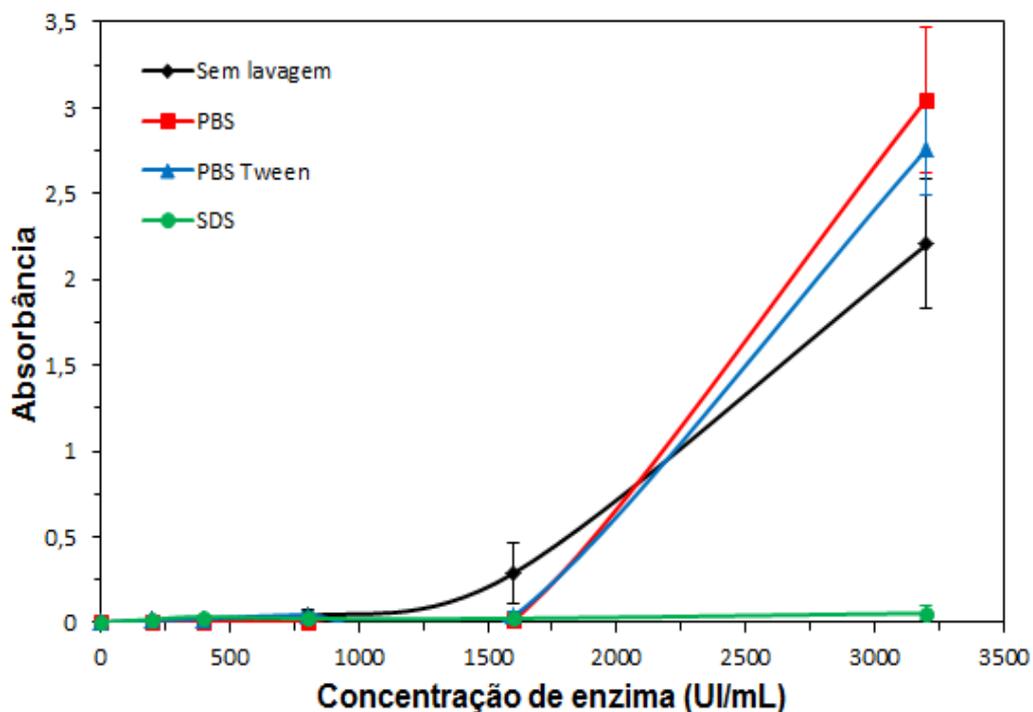


Figura 43 - Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PANi + PSS 5%, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.

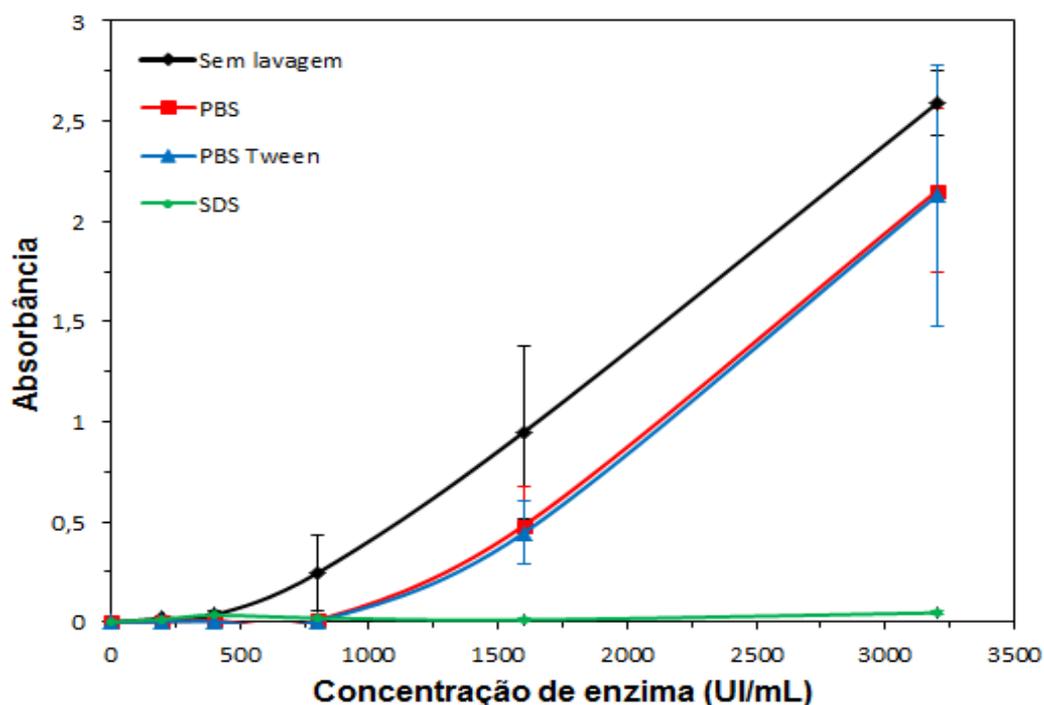


Figura 44 - Resposta espectroscópica para a enzima imobilizada em PANi + PSS 20%, sem lavagem e após lavagem em PBS, PBS Tween e SDS.

Analisando as Figuras 42 a 44 e considerando os elevados valores dos desvios padrão obtidos para as leituras de absorbância das amostras sem lavagem e com lavagem em PBS e PBS Tween, não é possível afirmar que as amostras se comportaram de diferentes maneiras em cada situação. Em geral, as amostras de PANi, PANi + PSS 5% e PANi + PSS 20% apresentaram o mesmo comportamento, ou seja, a lavagem com PBS e PBS Tween não interferiu de forma significativa nas leituras de absorbância, indicando que as moléculas de enzima não foram retiradas das tiras pelas lavagens com estas soluções.

Já a lavagem com SDS, para todos os polímeros, resultou num grande decréscimo das leituras de absorbância. Duas situações podem estar ocorrendo neste caso: praticamente a totalidade das moléculas de enzima foi removida com esta solução, ou então o SDS está desativando as moléculas de enzimas tornando-as inativas.

Analisando os resultados discutidos acima e considerando que o SDS está apenas removendo as moléculas de enzima da tira, presume-se que não há nenhum tipo de ligação forte entre a enzima e o suporte polimérico. Dois tipos de

imobilização podem estar acontecendo neste sistema: adsorção física e confinamento na matriz polimérica.

Considerando que as soluções de PBS e PBS Tween sejam capazes de remover da tira as moléculas de enzima simplesmente depositadas na superfície, sem nenhum tipo de ligação e aquelas confinadas na matriz polimérica, observa-se que após as lavagens com estas soluções, ainda há leituras altas de absorbância, indicando que ainda existe enzima ativa imobilizada no polímero. Desta forma, é possível concluir que são poucas as moléculas de enzima que estão simplesmente depositadas na superfície ou confinadas. Esta suposição pode ser confirmada após a lavagem com o SDS o qual foi eficiente para romper as ligações físicas entre a HRP e os polímeros, eliminando praticamente toda a enzima ativa da tira, diminuindo drasticamente as leituras de absorbância para todos os polímeros.

A partir destes resultados pode-se afirmar que o método predominante de imobilização da HRP nas amostras de PAni, PAni + PSS 5% e PAni + PSS 20% é a adsorção física, sendo que parte das moléculas de enzima também pode ficar depositada sobre a tira e confinada na matriz polimérica.

5.3.3 Estudo da influência da concentração de H_2O_2

Diferentes concentrações de H_2O_2 foram estudadas a fim de verificar sua influência nos ensaios colorimétricos. As concentrações de enzima foram mantidas as mesmas do ensaio anterior para fins de comparação. As Figuras 45, 46 e 47 mostram os resultados obtidos para a PAni, PAni + PSS 5% e PAni + PSS 20%, respectivamente.

Analisando estas figuras observa-se que, em geral, as amostras se comportaram de maneira semelhante, ou seja, o aumento na concentração de H_2O_2 no ensaio resultou em um decréscimo nas leituras de absorbância. Este resultado confirmou o afirmado na literatura [65] sobre a desativação da HRP em presença de excesso do seu substrato.

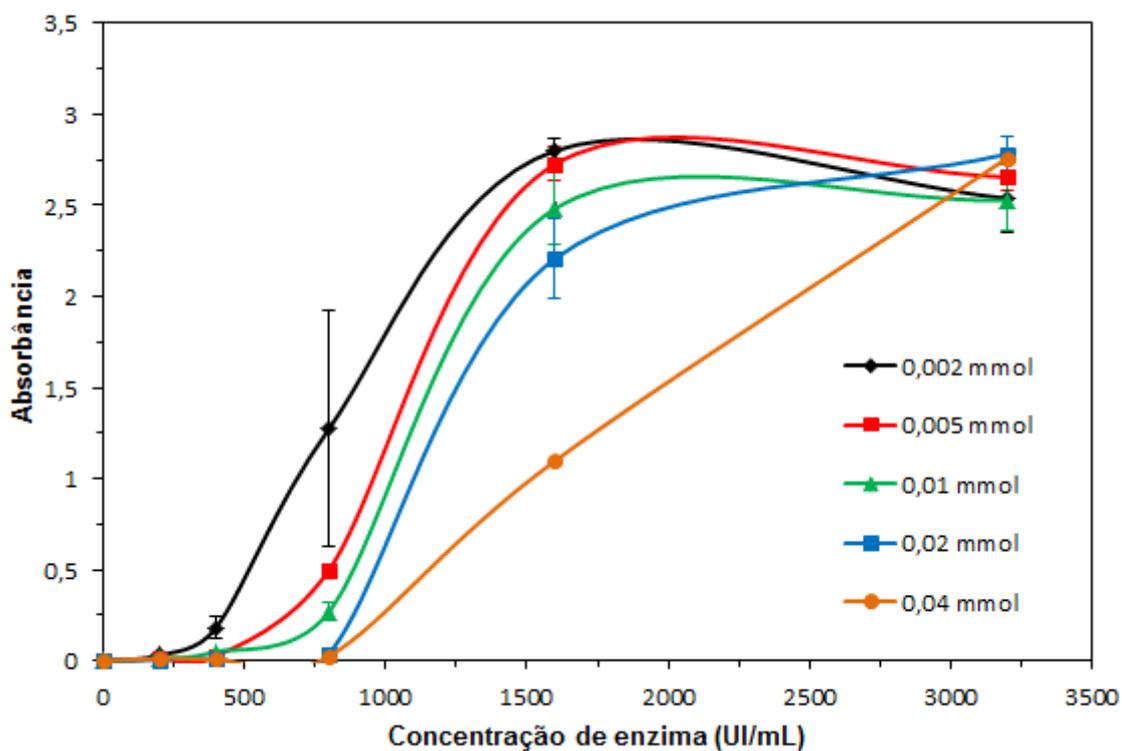


Figura 45 – Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H₂O₂ para a enzima imobilizada na amostra de PANi.

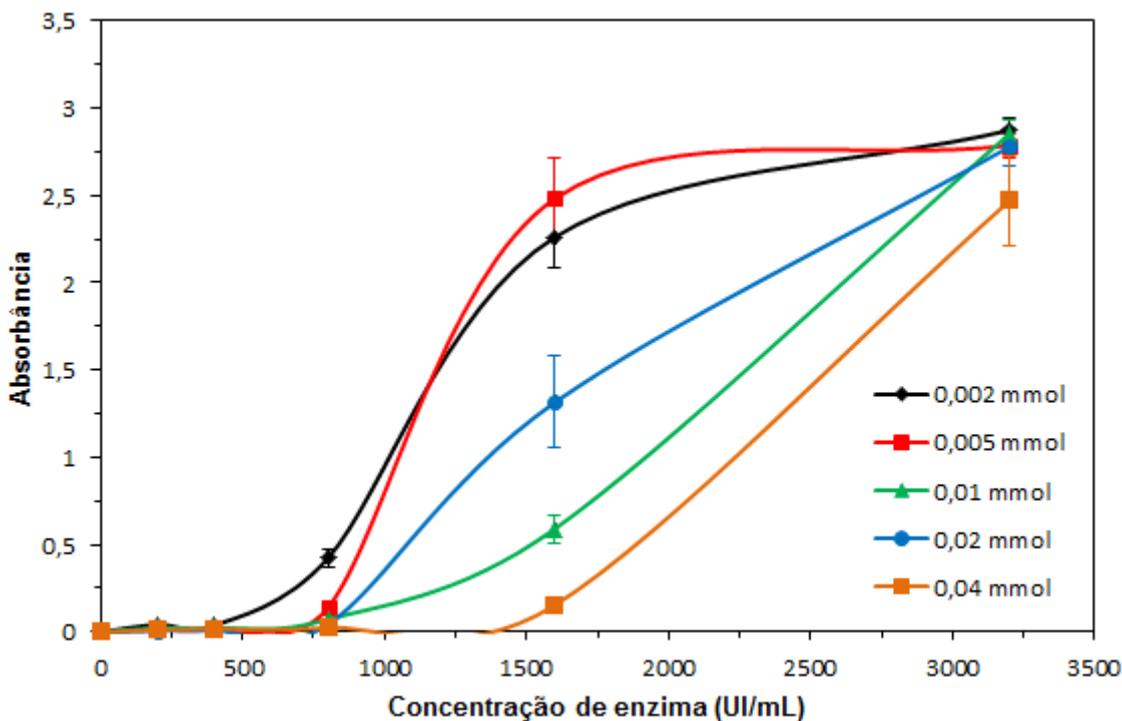


Figura 46 - Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H₂O₂ para a enzima imobilizada na amostra de PANi + PSS 5%.

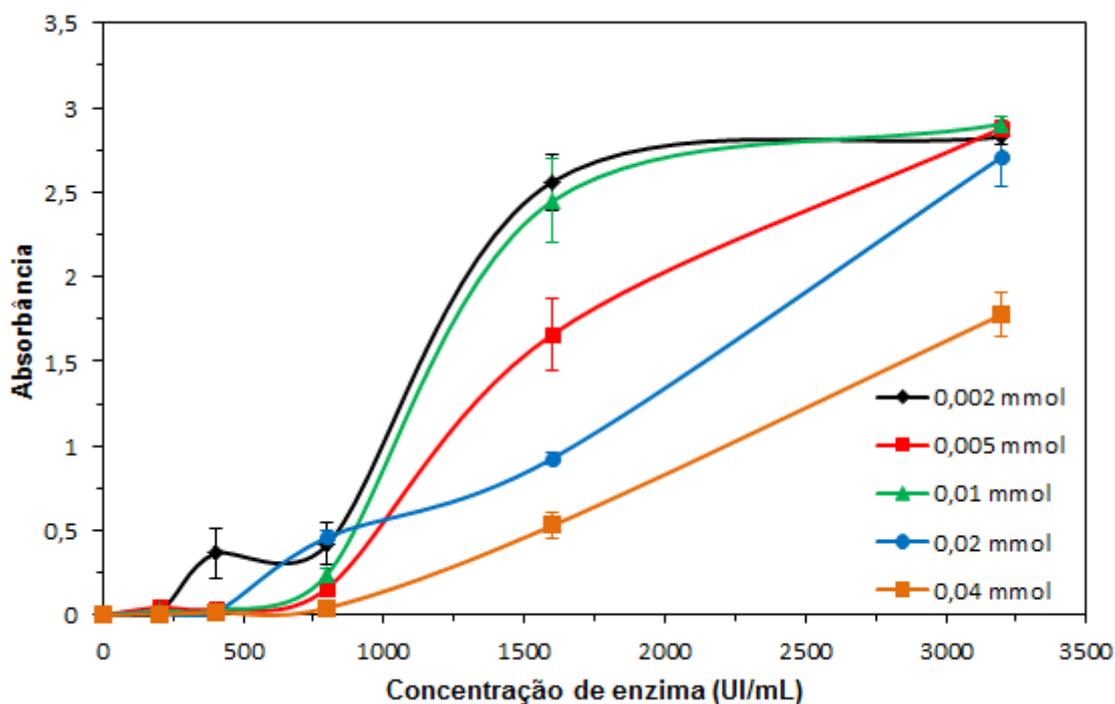


Figura 47 - Resposta espectroscópica para as várias concentrações de H_2O_2 para a enzima imobilizada na amostra de PANi + PSS 20%.

Observa-se que para a HRP imobilizada nos polímeros sintetizados neste trabalho e sob as condições empregadas, uma concentração de 0,04 mmol de H_2O_2 já é suficiente para provocar uma diminuição da atividade enzimática. É claro que, analisando os valores de absorbância, mesmo com a diminuição da atividade, ainda se obtém valores aceitáveis e até saturados de absorbância para as concentrações de 1600 UI/mL e 3200 UI/mL, porém o decréscimo é visível e significativo.

A partir deste ensaio determinou-se que ao expor a enzima a concentrações de H_2O_2 maiores que 0,04 mmol, pode-se ter como resultado uma perda da atividade enzimática devido à desativação do centro ativo de algumas moléculas de enzima. Obviamente este resultado não pode ser generalizado para todas as condições de análise tendo em vista que se está trabalhando com um sistema biológico, o qual é influenciado por diversos fatores além da concentração de seu substrato no meio.

5.3.4 Estudo da sensibilidade do biossensor ao H_2O_2

Analisando os resultados, observou-se que a concentração de 1600 UI/mL de HRP apresentou os melhores valores nos testes colorimétricos, independente da concentração de H_2O_2 utilizada e do polímero. Desta forma, os ensaios de cronoamperometria serão realizados apenas para esta concentração de enzima imobilizada nas amostras de PANi, PANi + PSS 5% e PANi + PSS 20%. As curvas de corrente *versus* tempo podem ser observadas na Figura 48.

A primeira alíquota de H_2O_2 foi adicionada após um período de estabilização da corrente de aproximadamente 450 segundos para todas as amostras. A partir daí, as adições ocorreram com intervalos de 2 minutos. Quanto maiores os níveis de corrente atingidos para cada adição, mais sensível é o biossensor.

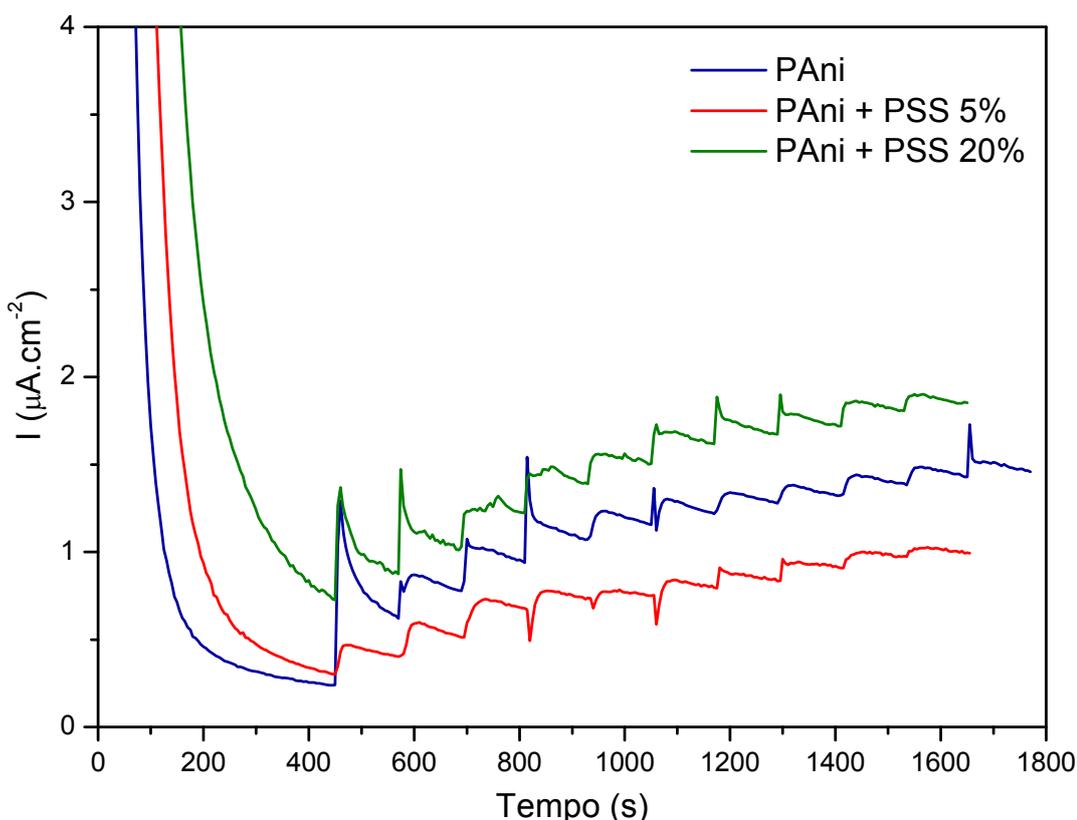


Figura 48 – Cronoamperometrias obtidas pela aplicação de um potencial constante de 0,6 V e adições sucessivas de 10 μ L (0,14 mmol) de H_2O_2 a cada 2 minutos.

Pela Figura 48 observa-se que a cada adição de H_2O_2 , um pico de corrente é gerado sendo que estes são mais intensos nas primeiras adições. A partir da quinta adição o aumento nos valores de corrente já não é tão considerável e um nível de saturação parece ter sido atingido. Isto significa que para estes valores de concentração de H_2O_2 o biossensor não apresenta mais sensibilidade, pois entre uma concentração e outra, pouca variação na corrente pode ser detectada.

A Figura 49 relaciona o valor da corrente (medida na metade do tempo entre as adições) com a concentração de H_2O_2 . Neste tipo de gráfico espera-se uma relação linear entre corrente e concentração na maior faixa possível de concentrações.

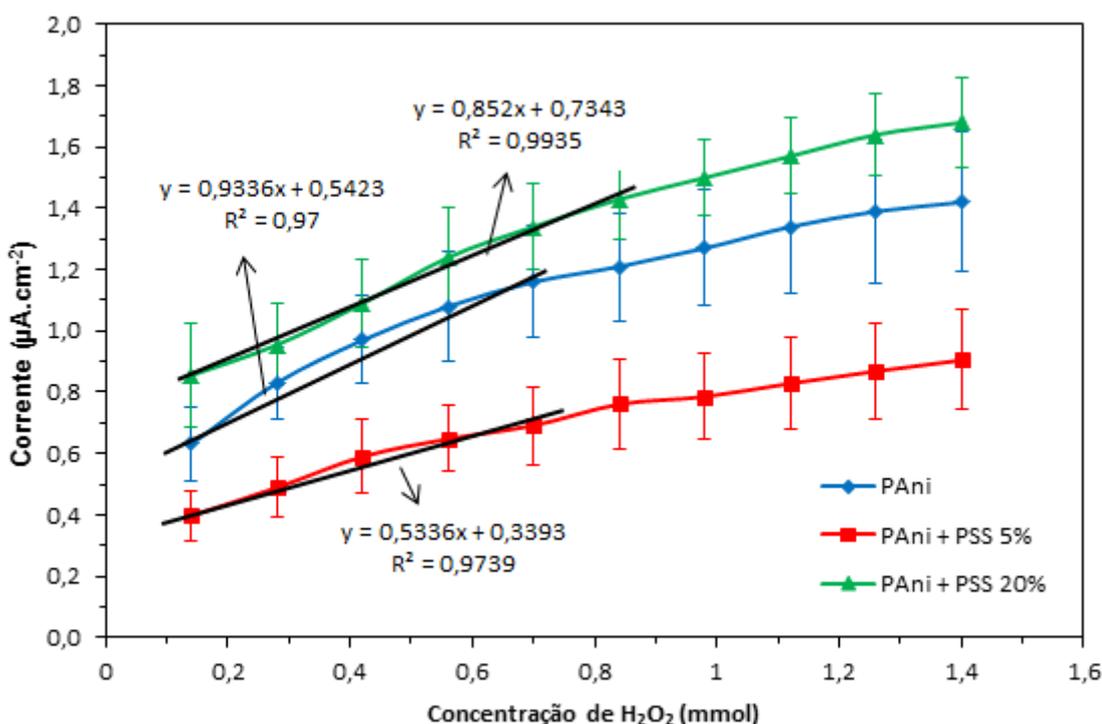


Figura 49 – Corrente versus concentração de H_2O_2 obtidas a partir da Figura 48.

Observa-se na Figura 49 que, para as amostras de PANi e PANi + PSS 5%, uma relação linear entre corrente e concentração é obtida com um bom coeficiente linear apenas nos 5 primeiros pontos da curva. Após este ponto, a variação da concentração de H_2O_2 não gera alterações significativas na corrente produzida, confirmando a diminuição da sensibilidade do biossensor. Já para a amostra de HRP

imobilizada em PAni + PSS 20%, uma resposta linear com um coeficiente de linearidade de 0,995 foi obtida para as 6 primeiras adições de H₂O₂.

Considerando que a amostra de PAni + PSS 20% obteve a melhor resposta amperométrica, determina-se a partir da sua curva que o biossensor produzido utilizando este polímero como suporte apresenta resposta linear na faixa de análise de 0,14 a 0,84 mmol de H₂O₂ segundo a seguinte equação:

$$C = \frac{I - 0,7323}{0,852} \quad (9)$$

onde C corresponde à concentração de H₂O₂ e I corresponde à corrente produzida.

Além da faixa de análise, pode-se determinar também por cronoamperometria, o tempo de resposta do biossensor. A Figura 50 mostra o primeiro pico de adição do H₂O₂ para as três amostras analisadas.

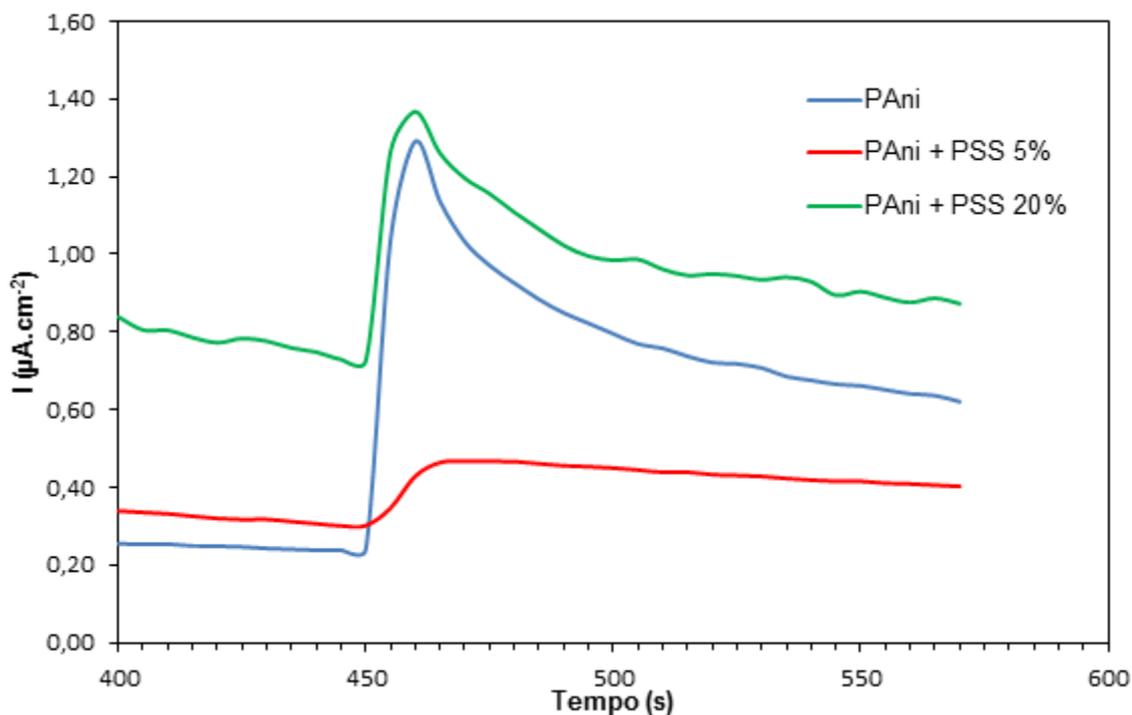


Figura 50 – Resposta dos biossensores amperométricos em função do tempo.

Considerando que a primeira adição ocorreu no tempo de 450 segundos, o tempo que os biossensores levaram para atingir o pico máximo de corrente, o qual é definido como o tempo de resposta do biossensor, foi de 10 segundos para as

amostras de PAni e PAni + PSS 20% e de 15 segundos para a amostra de PAni + PSS 5%.

Ao comparar este ensaio de cronoamperometria com os ensaios colorimétricos, observou-se que as alíquotas de H_2O_2 aqui adicionadas são muito mais concentradas do que aquelas utilizadas no ensaio colorimétrico. Primeiramente deve-se considerar o volume das soluções utilizadas em cada teste. No teste colorimétrico, o H_2O_2 foi diluído no volume do poço da microplaca (250 μ L) enquanto que no ensaio amperométrico, a diluição ocorreu em uma célula de 1500 μ L. Mesmo considerando estas diluições, observa-se que as alíquotas do teste amperométrico caracterizariam, segundo os testes colorimétricos, um excesso de H_2O_2 , o qual resultaria em desnaturação da enzima. Porém, isto não foi observado neste ensaio.

De acordo com a literatura [100], são esperadas respostas diferentes entre os ensaios colorimétricos e amperométricos, tendo em vista que a mudança de sinal que caracteriza o ensaio é totalmente diferente para os dois testes. No ensaio colorimétrico a difusão das moléculas de H_2O_2 na matriz polimérica é o fator determinante na resposta, enquanto que no ensaio amperométrico a difusão de elétrons é responsável pela geração da resposta.

Considerando estes fatores, é difícil obter uma relação direta entre as respostas dos dois ensaios em relação a concentrações limites de H_2O_2 . Porém, pode-se considerar que o ensaio colorimétrico foi satisfatório para a determinação da atividade e da concentração ótima de HRP imobilizada nos polímeros, enquanto que o ensaio amperométrico permitiu determinar uma faixa de análise em que o biossensor é sensível a diferentes concentrações de H_2O_2 , além de indicar o polímero que apresentou o melhor desempenho como suporte para a imobilização da HRP.

6 CONCLUSÕES

Em relação à:

- **Síntese dos polímeros:**

O método de síntese por adição rápida dos reagentes permitiu obter PANi e PANi dopada com 5, 10 e 20% em massa de PSS. Análises por espectroscopia infravermelho mostraram que os polímeros encontram-se num estado parcialmente oxidado. A condutividade das amostras é inversamente proporcional à quantidade de PSS. Micrografias MET mostraram a formação de PANi e PANi + PSS 5% com morfologia de nanofibras e de nanopartículas irregulares para PANi + PSS 10 e 20%.

A amostra de PANi + PSS 10% mostrou maior eletroatividade do que as outras amostras em HCl (pH 1) enquanto que em KCl (pH 5) e PBS (pH 7) as amostras de PANi + PSS 5 e 10% foram as mais eletroativas.

- **Produção das tiras teste:**

As amostras de PANi e PANi com 5 e 20% em massa de PSS foram as mais adequadas a serem usadas na construção das tiras teste pois cobriram com maior qualidade as trilhas de pasta de carbono, como foi confirmado por MO. A microestrutura nanofibrilar e nanoparticulada dos polímeros foi igualmente constatada por MEV.

A amostra de PANi + PSS 20% aplicada sobre as tiras teste apresentou a maior eletroatividade por voltametria cíclica nos meios KCl e PBS.

- **Imobilização da enzima e caracterização do biossensor:**

Os testes realizados mostraram as amostras de PANi, PANi + PSS 5% e 20% como as mais adequadas para a imobilização da HRP. A atividade enzimática após imobilização foi melhor com a amostra PANi + PSS 20%, conforme testes colorimétricos.

Apenas a lavagem das tiras-teste com a solução de SDS, ao contrário das soluções de PBS e PBS Tween, foi capaz de remover a enzima, indicando que a imobilização predominante é do tipo adsorção física.

Finalmente, foi a amostra PAni + PSS 20% que apresentou a melhor resposta nos ensaios amperométricos, com muito boa linearidade no intervalo 0,14 a 0,84 mmol de H₂O₂ e tempo de resposta da tira teste de 10 segundos.

Em geral, a metodologia proposta neste trabalho foi eficiente na produção de biossensores amperométricos enzimáticos. A produção das tiras pelo método de *silk-screen* mostrou ser de fácil aplicação e reprodutibilidade, apesar de ser um método manual. Por outro lado, o método de imobilização da enzima no polímero em solução, apesar de simples e prático, apresentou algumas dificuldades quanto à aplicação da solução final polímero/enzima sobre a tira. A grande vantagem do método proposto neste trabalho é a facilidade de caracterização deste dispositivo através da simples utilização das conexões do tipo USB, possibilitando sua futura produção em escala.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar novas sínteses poliméricas que facilitem a imobilização da enzima, mantendo o máximo possível de sua atividade;
- Produzir as tiras teste através de meios automáticos;
- Estudar novas formas de aplicação do polímero sobre a tira teste a fim de permitir a reprodutibilidade da metodologia;
- Estudar a imobilização na matriz polimérica de outras enzimas da classe das oxidoredutases.
- Produzir o aparelho que realizará a leitura dos biossensores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E.; MACDIARMID, A. G.; CHIANG, C. K.; HEEGER, A. J. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers – Halogen Derivates of Polyacetylene, ((CH)_x). **Journal of the Chemical Society-Chemical Communications**, 16 (1977) 578-580.
- 2 CHIANG, C. K.; FINCHER, C. R.; PARK, Y. W.; HEEGER, A. J.; SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; GAU, S. C.; MACDIARMID, A. G. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. **Physical Review Letters**, 39 (1977) 1098-1101.
- 3 MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**, 19 (1996) 388-399.
- 4 MAIA, D. J.; DE PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; ZARBIN, A. J. G.; NEVES, S. Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras. **Química Nova**, 23 (2000) 204-215.
- 5 BURROUGHES, J. H.; BRADLEY, D. D. C.; BROWN, A. R.; MARKS, R. N.; MACKAY, K.; FRIEND, R. H.; BURN, P. L.; HOLMES, A. B. Light-emitting Diodes Based on Conjugated Polymers. **Nature**, 347 (1990) 539–541.
- 6 BURROUGHES, J. H.; JONES, C. A.; FRIEND, R. H. New Semiconductor - Device Physics in Polymer Diodes and Transistors. **Nature**, 335, (1988) 137–141.
- 7 GAZOTTI JR., W. A.; CASALBORE-MICELI, G.; GERI, A.; DE PAOLI, M. A. A Solid-State Electrochromic Device Based on Two Optically Complementary Conducting Polymers. **Advanced Materials**, 10 (1998) 60-64.
- 8 CONWAY, B. E. Transition from Supercapacitor to Battery Behavior in Electrochemical Energy-Storage. **Journal of the Electrochemical Society**, 138 (1991) 1539-1548.
- 9 OTERO, T.F.; SANSIÑENA, J. M. Artificial Muscles Based on Conducting Polymers. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 38 (1995) 411-414.
- 10 GONÇALVES, G. S.; BALDISSERA, A. F.; RODRIGUES JR., L. F.; MARTINI, E. M. A.; FERREIRA, C. A. Alkyd Coatings Containing Polyanilines for Corrosion Protection of Mild Steel. **Synthetic Metals**, 161 (2011) 313-323.
- 11 WEI, D.; IVASKA, A. Electrochemical Biosensors Based on Polyaniline. **Chem. Anal.**, 51 (2006) 839-852.
- 12 AYAD, M. M.; SALAHUDDIN, N. A.; ALGHAYSH, M. O.; ISSA, R.M. Phosphoric Acid and pH Sensors Based on Polyaniline Films. **Current Applied Physics**, 10 (2010) 235-240.

-
- 13 VIRJI, S.; HUANG, J.; KANER, R. B.; WEILLER, B. H. Polyaniline Nanofiber Gas Sensors: Examination of Response Mechanisms. **Nano Letters**, 4 (2004) 491-496.
- 14 HEEGER, A. J. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials. **Synthetic Metals**, 125 (2002) 25-42.
- 15 LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N. V.; MIRSKY, V. M. Conducting Polymers in Chemical Sensors and Arrays. **Analytica Chimica Acta**, 614 (2008) 1-26.
- 16 MÜLLER, F. Utilização de Polianilina em Matriz de Polímero Convencional para a Produção de Membranas Catiônicas: Síntese, Caracterização e Aplicação. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Porto Alegre (2009) UFRGS.
- 17 GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting Polymers in Biomedical Engineering. **Progress in Polymer Science**, 32 (2007) 876-921.
- 18 FAEZ, R.; REIS, C.; DE FREITAS, P. S.; KOSIMA, O. K.; RUGGERI, G.; DE PAOLI, M. A. Polímeros Condutores. **Química Nova**, 11 (2000) 13-18.
- 19 Kungl. Vetenskapsakademien. The Nobel Prize in Chemistry, 2000: Conductive Polymers. Disponível em <http://www.kva.se>, acessado em 02/04/2011.
- 20 FREUND, M. S.; DEORE, B. A. Self-Doped Conducting Polymers. New York: John Wiley & Sons, 1991.
- 21 SCROSATI, B. Applications of Electroactive Polymers. London: Chapman and Hall, 1993.
- 22 BRÉDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, Bipolarons, and Solitons in Conducting Polymers. **Accounts of Chemical Research**, 18 (1985) 309-315.
- 23 MATVEEVA, E. S. Residual Water as a Factor Influence the Electrical Properties of Polyaniline: The Role of Hydrogen Bonding of the Polymer With Solvent Molecules in the Formation of a Conductive Polymeric Network. **Synthetic Metals**, 79 (1996) 127-139.
- 24 ENGERT, C.; UMAPATHY S.; KIEFER, W.; HAMAGUCHI, H. Dynamic Structure of Charge Carrier in Polyaniline by Near-Infrared Excited Resonance Raman Spectroscopy. **Chemical Physics Letters**, 218 (1994) 87-92.
- 25 KUMAR, D.; SHARMA, R. C. Advances in Conductive Polymers. **European Polymer Journal**, 34 (1998) 1053-1060.
- 26 SUN, Q.; PARK, M-C; DENG, Y. Dendritic Superstructure Formation of Polyaniline Prepared Using a Water-Soluble Polyelectrolyte Copolymer as the Support Matrix. **Materials Letters**, 61 (2007) 3052-3055.

-
- 27 HOPKINS, A. R.; SAWALL, D. D.; VILLAHERMOSA, R. M.; LIPELES, R. A. Interfacial Synthesis of Electrically Conducting Polyaniline Nanofiber Composites. **Thin Solid Films**, 469-470 (2004) 304-308.
- 28 SALVATIERRA, R. V. Nanocompósitos de Polianilina e Nanotubos de Carbono Obtidos por Polimerização Interfacial. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Paraná (2010) UFPR.
- 29 NALWA, H. S. Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers: Vol. 2 Conductive Polymers: Synthesis and Electrical Properties. 1997.
- 30 RAY, A.; RICHTER, A. F.; MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Polyaniline: Protonation/Deprotonation of Amine and Imine Sites. **Synthetic Metals**, 29 (1989) 151-156.
- 31 SILVA, K. F. F. Imobilização de Horseradish Peroxidase em Diferentes Polianilinas: Aplicações Analíticas. Tese de doutorado. Campinas (2000) Unicamp.
- 32 MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J. Secondary Doping in Polyaniline. **Synthetic Metals**, 69 (1995) 85-92.
- 33 GENIES, E. M.; BOYLE, A.; LAPKOWSKI, M.; TSINTAVIS, C. Polyaniline: A Historical Survey. **Synthetic Metals**, 36 (1990) 139-182.
- 34 DHAND, C.; DAS, M.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent Advances in Polyaniline Based Biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, 26 (2011) 2811-2821.
- 35 BHADRA, S.; KHASTGIR, D.; SINGHA, N. K.; LEE, J. H. Progress in Preparation, Processing and Applications of Polyaniline. **Progress in Polymer Science**, 34 (2009) 783-810.
- 36 HUANG, J. Synthesis and Applications of Conducting Polymer Polyaniline Nanofibers. **Pure and Applied Chemistry**, 78 (2006) 15-27.
- 37 HUANG, J.; VIRJI, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Nanostructured Polyaniline Sensors. **Chemistry**, 10 (2004) 1314-1319.
- 38 LI, D.; HUANG, J.; KANER, R. B. Polyaniline Nanofibers: A Unique Polymer Nanostructure for Versatile Applications. **Accounts of Chemical Research**, 42 (2001) 135-145.
- 39 HUANG, J.; VIRJI, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Polyaniline Nanofibers: Facile Synthesis and Chemical Sensors. **Journal of the American Chemical Society**, 125 (2003) 314-315.

-
- 40 LI, D.; KANER, R. B. Processable Stabilizer-Free Polyaniline Nanofiber Aqueous Colloids. **Chemical Communications**, 26 (2005) 3286-3288.
- 41 CREAM, C.; LAHIFF, E.; GILMARTIN, N.; DIAMOND, D.; O'KENNEDY, R. Polyaniline Nanofibres as Templates for the Covalent Immobilization of Biomolecules **Synthetic Metals**, 161 (2011) 285-292.
- 42 XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting Polymer Nanostructures and Their Application in Biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 341 (2009) 1-11.
- 43 SARAVANAN, C.; PALANIAPPAN, S.; CHANDEZON, F. Synthesis of Nanoporous Conducting Polyaniline Using Ternary Surfactant. **Materials Letters**, 62 (2008) 882-885.
- 44 THANPITCHA, T.; SIRIVAT, A.; JAMIESON, A. M.; RUJIRAVANIT, R. Synthesis of Polyaniline Nanofibrils Using an *in situ* Seeding Technique. **Synthetic Metals**, 158 (2008) 695-703.
- 45 HUANG, J.; KANER, R. B. Nanofiber Formation in the Chemical Polymerization of Aniline: A Mechanistic Study. **Angewandte Chemie International Edition**, 43 (2004) 5817-5821.
- 46 DE FREITAS, P. S. Síntese da Polianilina em Escala Piloto e Seu Processamento. Tese de Doutorado. Campinas (2000) Unicamp.
- 47 WALLACE, G. G.; TEASDALE, P. R.; SPINKS, G. M.; KANE-MAQUIRE, L. A. P. Conductive Electroactive Polymers. Intelligent Polymer Systems. 3ª Edição. New York: Taylor & Francis Group, 2009.
- 48 GUPTA, B.; PRAKASH, R. Processable Polyacid Doped Polyaniline Composites: Application for Charge Storage Devices. **Materials Science and Engineering**, C 29 (2009) 1746-1751.
- 49 MIRMOHSENI, A.; WALLACE, G. G. Preparation and Characterization of Processable Electroactive Polyaniline-Polyvinyl Alcohol Composite. **Polymer**, 44 (2003) 3523-3528.
- 50 ARAÚJO, P. L. B.; ARAÚJO, E. S.; SANTOS, R. F. S.; PACHECO, A. P. L. Synthesis and Morphological Characterization of PMMA/Polyaniline Nanofiber Composites. **Microelectronics Journal**, 36 (2005) 1055-1057.
- 51 BARTLETT, P. N.; SIMON, E. Poly(aniline) – Poly(acrylate) Composite Film as Modified Electrodes for the Oxidation of NADH. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 2 (2000) 2599-2606.

-
- 52 KUO, C.; WEN, T. Dispersible Polyaniline Nanoparticles in Aqueous Poly(styrenesulfonic acid) Via Interfacial Polymerization Route. **European Polymer Journal**, 44 (2008) 3393–3401.
- 53 DE CIRNE E PATACAS, R. Desenvolvimento, Caracterização e Otimização de um Biossensor Amperométrico para a Determinação de Nitrato Baseado em Microinterfaces Gelificadas. Dissertação de Mestrado. (2007) Faculdade de Ciências Universidade do Porto.
- 54 LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 2ª Edição. São Paulo: Sarvier. 1995.
- 55 KIELING, D. D. Enzimas: Aspectos Gerais. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2002.
- 56 VIEIRA, N. C. S. Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes Finos de $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais. Itajubá (2006) UNIFEI.
- 57 MARTINS, M. Biossensores de Colesterol Baseados no Sistema Poli(álcool vinílico)/Ftalocianina. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia. Itajubá (2006) UNIFEI.
- 58 FURIGO JUNIOR, A. Enzimas e Suas Aplicações: Cinética Enzimática. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2001.
- 59 COPELAND, R. A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. 2ª Edição. New York: John Wiley & Sons, 2000.
- 60 VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um Paradigma da Química Medicinal: A Flexibilidade dos Ligantes e Receptores. **Química Nova**, 28 (2005) 95-102.
- 61 DA SILVA, J. S. Biossensor Amperométrico à Base de Peroxidase em Matriz de Bastão de Grafite Comercial: Estudos Preliminares. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro (2010) UFRJ.
- 62 BANCI, L. Structural Properties of Peroxidases. **Journal of Biotechnology**, 53 (1997) 253 – 263.
- 63 HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potencial Applications of Peroxidases. **Food Chemistry**, 115 (2009) 1177 – 1186.

- 64 NAVES, A. F. Estudo da Adsorção de Horseradish Peroxidase (HRP) Sobre Superfícies Planas e de sua Atividade Catalítica. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. São Paulo (2008) USP.
- 65 VALDERRAMA, B.; AYALA, M.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. **Chemistry & Biology**, 9 (2002) 555 – 565.
- 66 MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; KHOSRANEH, M.; MOHAJERANI, B.; KELAY, V.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Can Amino Acids Protect Horseradish Peroxidase Against Its Suicide-Peroxide Substrate? **Enzyme and Microbial Technology**, 43 (2008) 329 – 335.
- 67 AHUJA, T.; MIR, I. A.; KUMAR, D.; RAJESH. Biomolecular Immobilization on Conducting Polymers for Biosensing Applications. **Biomaterials**, 28 (2007) 791 – 805.
- 68 DE ANDRADE, V. M. Confecção de Biossensores Através da Imobilização de Biocomponentes por Eletropolimerização de Pirrol. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais. Porto Alegre (2006) UFRGS.
- 69 GERARD, M.; CHAUBEY A.; MALHOTRA, B. D. Application of Conducting Polymers to Biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, 17 (2002) 345 – 359.
- 70 BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells. New Jersey: Humana Press Inc, 1997.
- 71 GERARD, M.; MALHOTRA, B. D. Application of Polyaniline as Enzyme Based Biosensor. **Current Applied Physics**, 5 (2005) 174 – 177.
- 72 PEREIRA, A. C.; DE SANTANA SANTOS, A.; KUBOTA, L. T. Tendências em Modificação de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroanalíticas. **Química Nova**, 25 (2002) 1012-1021.
- 73 JIN, X.; XI, F.; LV, D.; WU, Q.; LIN, X. The Effect of the Chitosan Membrane Properties on the Enzyme Adsorption and Performance for the Construction of Horseradish Peroxidase Biosensors. **Carbohydrate Polymers**, 85 (2011) 786-791.
- 74 SHIN, Y. J.; KIM, S. H.; YANG, D. H.; KWON, H.; SHIN, J. S. Amperometric Glucose Biosensor by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption onto Polyaniline-Coated Polyester Films. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 16 (2010) 380-384.
- 75 CARAMORI, S. S.; FERNANDES, K. F. Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Poly(ethylene terephthalate) – Poly(aniline) composite. **Process Biochemistry**, 39 (2004) 883-888.

- 76 CARAMORI, S. S.; DE FARIA, F. N.; VIANA, M. P.; FERNANDES, K. F.; CARVALHO JR., L. B. Trypsin Immobilization on Discs of Polyvinyl Alcohol Glutaraldehyde/Polyaniline Composites. **Materials Science and Engineering**, 31 (2011) 252-257.
- 77 FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of Horseradish Peroxidase Immobilises onto Polyaniline. **Process Biochemistry**, 39 (2004) 957-962.
- 78 FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; PINHO, H.; COLLINS, C. H. Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Polyaniline Polymers. **Process Biochemistry**, 38 (2003) 1379-1384.
- 79 MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of Conducting Polymers in Biosensors. **Analytica Chimica Acta**, 578 (2006) 59-74.
- 80 BOHUNICKY, B.; MOUSA, S. A. Biosensors: The New Wave in Cancer Diagnosis. **Nanotechnology, Science and Applications**, 4 (2011) 1-10.
- 81 Disponível em <http://yildizuludag.wordpress.com/2009/06/04/what-is-a-biosensor/>, acessado em 02/08/2011
- 82 NARANG, J.; CHAUHAN, N.; SINGH, A.; PUNDIR, C. S. A Nylon Membrane Bases Amperometric Biosensor for Polyphenol determination. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Manuscrito aceito. (2011).
- 83 NARANG, J.; PUNDIR, C. S. Construction of a Triglyceride Amperometric Biosensor Based on Chitosan-ZnO Nanocomposite Film. **International Journal of Biological Macromolecules**. Manuscrito aceito. (2011).
- 84 FANG, C.; HE, J.; CHEN, Z. A Disposable Amperometric Biosensor for Determining Total Cholesterol in Whole Blood. **Sensors and Actuators B**, 155 (2011) 545-550.
- 85 CHAUHAN, N.; PUNDIR, C. S. An Amperometric Uric Acid Biosensor Based on Multiwalled Carbon Nanotube-Gold Nanoparticle Composite. **Analytical Biochemistry**, 413 (2011) 97-103.
- 86 CHIRIZZI, D.; MALITESTA, C. Potentiometric Urea Biosensor Based on Urease Immobilized by na Electrosynthesized Poly(o-phenylenediamine) Film With Buffering Capability. **Sensors and Actuators B**, 157 (2011) 211-215.
- 87 MAHADEVA, S. K.; KIM, J. Conductometric Glucose Biosensor Made With Cellulose and Tin Oxide Hybrid Nanocomposite. **Sensors and Actuators B**, 157 (2011) 177-182.

-
- 88 ISRAR, M. Q.; SADAF, J. R.; ASIF, M. H.; NUR, O.; WILLANDER, M.; DANIELSSON, B. Potentiometric Cholesterol Biosensor Based on ZnO Nanorods Chemically Grown on Ag Wire. **Thin Solid Films**, 519 (2010) 1106-1109.
- 89 GALÁN-VIDAL, C. A.; MUÑOZ, J.; DOMÍNGUEZ, C.; ALEGRET, S. Chemical Sensors, Biosensors and Thick-Film Technology. **Trends in Analytical Chemistry**, 14 (1995) 225-231.
- 90 GALÁN-VIDAL, C. A.; MUÑOZ, J.; DOMÍNGUEZ, C.; ALEGRET, S. Glucose Biosensor Strip in a Three Electrode Configuration Based on Composite and Biocomposite Materials Applied by Planar Thick Film Technology. **Sensors and Actuators B**, 52 (1998) 257-263.
- 91 NASCIMENTO, V. B. Eletrodos Fabricados por "Silk-Screen". **Química Nova**, 21 (1998) 614-629.
- 92 ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Configurations Used in the Design of Screen-Printed Enzymatic Biosensors. A Review. **Sensors and Actuators B**, 69 (2000) 153-163.
- 93 GIROTTO, E. M.; SANTOS, I. A. Medidas de Resistividade Elétrica DC em Sólidos: Como Efetuá-las Corretamente. **Química Nova**, 25 (2002) 639-647.
- 94 LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the Electrochemical Concepts and techniques to Amperometric Biosensor Devices. **J. Electroceram.**, 16 (2006) 79-91.
- 95 KOZAN, J. V. B. Microssensor Para Glicose Integrado a Catéter. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. São Paulo (2007) USP.
- 96 TANG, Y.; PAN, K.; WANG, X.; LIU, C.; LUO, S. Enhancing Electrochemical and Electrocatalytic Activities of Polyaniline Via Co-doping with Poly(styrene sulfonate) and Gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 639 (2010) 123-129.
- 97 GOSPODINOVA, N.; TERLEMEZYAN, L. Conducting Polymers Prepared by Oxidative Polymerization: Polyaniline. **Prog. Polym. Sci.**, 23 (1998) 1443-1484.
- 98 COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte-protein Complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10 (2005) 52-78.
- 99 ARAISO, T.; DUNFORD, H. B. Horseradish Peroxidase. Complex Formation with Anions and Hydrocyanic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (1981) 10099 – 10104.
- 100 MORRIN, A.; GUZMAN, A.; KILLARD, A. J.; PINGARRON, J. M.; SMYTH, M. R. Characterisation of Horseradish Peroxidase Immobilisation on an Electrochemical

Biosensor By Colorimetric and Amperometric Techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, 18 (2003) 715-720.