

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Rafael Furlan de Oliveira

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA A DETECÇÃO DE GLICOSE
E SACAROSE EM BEBIDAS COMERCIAIS**

SOROCABA

2010



Rafael Furlan de Oliveira

**FILMES NANOESTRUTURADOS PARA A DETECÇÃO DE GLICOSE
E SACAROSE EM BEBIDAS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Materiais Poliméricos, Híbridos e Nanoestruturais, sob a orientação da Profª. Dra. Marystela Ferreira

**SOROCABA
2010**

O51f Oliveira, Rafael Furlan de.
Filmes Nanoestruturados para a detecção de glicose e sacarose em bebidas comerciais / Rafael Furlan de Oliveira. - Presidente Prudente : [s.n], 2010
80 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Orientador: Marystela Ferreira
Banca: Débora Gonçalves, Débora Terezia Balogh
Inclui bibliografia

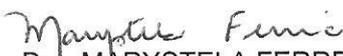
1. Filmes Nanoestruturados. 2. Biossensores. 3. Glicose e Sacarose. I. Autor. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

CDD 540

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Presidente Prudente.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de RAFAEL FURLAN DE OLIVEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 16 dias do mês de julho do ano de 2010, às 14:00 horas, no(a) Laboratório de Física - UFSCar/Sorocaba, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA do(a) Campus de Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos, Profa. Dra. DEBORA GONÇALVES do(a) Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo, Profa. Dra. DEBORA TEREZIA BALOGH do(a) Departamento de Física e Ciência dos Materiais - Instituto de Física de São Carlos / Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de RAFAEL FURLAN DE OLIVEIRA, intitulado "FILMES NANOESTRUTURADOS PARA A DETECÇÃO DE GLICOSE E SACAROSE EM BEBIDAS COMERCIAIS". Após a exposição, o discente foi argüido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA


Profa. Dra. DEBORA GONÇALVES


Profa. Dra. DEBORA TEREZIA BALOGH

“Dedico este trabalho ao meu pai Luiz Carlos e à minha mãe Regina que não pouparam esforços durante minha caminhada”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela vida, oportunidade dada e força nos momentos difíceis.

A toda minha família, especialmente aos meus pais e irmão, que sempre me apoiaram. Meu profundo agradecimento.

A minha namorada Mônica, pelo apoio, imensa paciência, por todas as vezes que me tirou do fundo do poço com suas palavras de carinho e incentivo. Obrigado meu amor!

A minha orientadora Profa. Dra. Marystela Ferreira, pela oportunidade dada, pela confiança durante a realização do trabalho, orientação e amizade.

Ao grande amigo Prof. Dr. Antonio Riul Júnior (Totó), pela gentileza em me acolher em sua casa, disponibilidade, paciência, amizade e exemplo de pessoa. Valeu Totó!

A Dra. Marli Leite de Moraes pelas valiosas sugestões no decorrer do trabalho e amizade.

A POSMAT pela oportunidade.

Ao CNPq pelo financiamento dos meus estudos.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar/Sorocaba) pelo uso da infra-estrutura.

Aos colegas Magda, Mercival, Fábio, Mônica, Marco, Gaúcho, e demais professores e funcionários do campus pelo convívio e amizade.

Aos colegas de capoeira Plínio, Cacá, Léo e Júlia.

Aos colegas e amigos do laboratório Mateus, Ane, Aline, Dani, Paulo, Celina, Laís, Cléber, Vitor, André, Walbert, Tamires, pela sincera amizade.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho ou de alguma forma fizeram parte da minha vida durante este período.

“A ciência se compõe de erros que, por sua vez, são os passos até a verdade”

(Julio Verne)

OLIVEIRA, R. F. de. **Filmes Nanoestruturados para a Detecção de Glicose e Sacarose em Bebidas Comerciais**. 2010. 80f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais)-UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia/FCT de Presidente Prudente, Sorocaba, 2010.

RESUMO

Neste trabalho, investigou-se a fabricação e caracterização de filmes ultrafinos de poli(alilamina hidrocloreada) PAH com as enzimas glicose oxidase (GOx) e invertase (INV) no desenvolvimento de biossensores amperométricos para a detecção de glicose e sacarose. Filmes nanoestruturados obtidos pela técnica *layer-by-layer* (LbL) possibilitaram estudar a imobilização de cada enzima juntamente com o polieletrólito, além de diversas arquiteturas bienzimáticas mais complexas, em eletrodos modificados com Azul da Prússia, no desenvolvimento do biossensor. O crescimento dos filmes produzidos foi acompanhado por técnicas de espectroscopia UV-vis e fluorescência; além de técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e amperometria na avaliação das propriedades e resposta do biossensor. Por fim, investigou-se o aprimoramento do biossensor e análises qualitativas preliminares na avaliação de bebidas comerciais.

Palavras-chave: glicose oxidase (GOx), invertase (INV), filmes nanoestruturados, biossensor eletroquímico, glicose, sacarose.

OLIVEIRA, R. F. de. **Filmes Nanoestruturados para a Detecção de Glicose e Sacarose em Bebidas Comerciais**. 2010. 80f. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais)-UNESP, Faculdade de Ciências e Tecnologia/FCT de Presidente Prudente, Sorocaba, 2010.

ABSTRACT

In this work, we investigated the fabrication and characterization of ultrathin films of poly(allylamine hydrochloride) PAH and the enzymes glucose oxidase (GOx) and invertase (INV) in the development of amperometric biosensors for glucose and sucrose detection. Nanostructured films obtained by layer-by-layer (LbL) technique were able to study the immobilization of each enzyme coupled with the polyelectrolyte, beyond different and more complex bienzymatic architectures, in Prussian Blue modified electrodes, for the biosensor development. The films' growth was monitored by fluorescence and UV-vis spectroscopic techniques; moreover electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and amperometry were used on the evaluation of biosensor properties and response. At last, we investigated the biosensor improvement and qualitative initial analysis on the evaluation of commercial beverages.

Keywords: glucose oxidase (GOx), invertase (INV), nanostructured films, eletrochemical biosensor, glucose, sucrose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Representação esquemática do processo de deposição do filme LbL sobre um substrato sólido. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos polieletrólitos aniônico e catiônico, respectivamente, e as etapas 2 e 4 são os procedimento de lavagem. No fim da etapa 4 tem-se a construção de um filme do tipo (A/B) _n . (B) Estrutura idealizada do filme LbL contendo as duas primeiras etapas de adsorção dos polieletrólitos. Figura extraída da referência [4].....	18
Figura 2: Elementos e componentes de um típico biossensor. Figura adaptada de Grieshaber e colaboradores [6].....	20
Figura 3: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico. Figura extraída de [29].	22
Figura 4: Transferência direta de elétron entre a enzima e o eletrodo via tunelamento. Figura extraída da referência [10].	24
Figura 5: Estrutura dos polieletrólitos PAH (polieletrólito de carga positiva) e PVS (polieletrólito de carga negativa)	29
Figura 6: Esquema de reação enzimática. Figura extraída da referência [34].	30
Figura 7: Mecanismo de catálise da glicose pela glicose oxidase (GOx).	32
Figura 8: Catálise da sacarose por INV, gerando os produtos α -glicose e β -frutose.....	33
Figura 9: Estruturas da a) glicose e b) sacarose. Figura adaptada da referência [34].	34
Figura 10: Ilustração das formas cíclicas α e β da D-glicose. Figura adaptada da referência [34].	34
Figura 11: Sequência de deposição do filme PAH/GOx.....	37
Figura 12: Sequência de deposição do filme PAH/INV.....	38
Figura 13: Sequência de deposição do filme PAH/GOx/PAH/INV.....	38
Figura 14: Sequência de deposição do filme (PAH/GOx)/(PAH/INV).	39
Figura 15: Sequência de deposição do filme PAH/GOx/INV.....	39
Figura 16: Sequência de deposição do filme PAH/(GOx + INV) pH 6,3.	40
Figura 17: Sequência de deposição do filme PAH/(GOx + INV) pH 5,3.	40
Figura 18: (A) Esquema de um espectrômetro de UV-vis: uma fonte de luz monocromática incide um feixe de intensidade I_0 . O detector recebe um feixe de intensidade I_1 . (B) Esquema de uma cubeta recebendo um feixe de intensidade I_0 , que é espalhada devido à reflexão nas paredes da cubeta e absorvida pelas moléculas, chegando um feixe de intensidade I_1 ao detector.	43
Figura 19: Representação de uma célula eletroquímica acoplada a um potenciostato. Célula convencional de três eletrodos: trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência.	45

Figura 20: Voltamograma cíclico do eletrodo ITO/PB de 0,0 V a 1,0 V (<i>vs</i> ECS) – 50 mV/s após 20 ciclos.	47
Figura 21: Espectro UV-vis da solução de GOx 2mg/mL (pH 6,3). <i>Inset</i> : Banda em 278 nm.....	48
Figura 22: Espectro UV-vis da solução de INV 0,5 mg/mL (pH 5,3). <i>Inset</i> : Banda em 280 nm.....	49
Figura 23: Espectro de fluorescência da solução GOx 2mg/mL (pH 6,3). Banda em 336 nm.	50
Figura 24: Espectro de fluorescência da solução INV 0,5 mg/mL (pH 5,3). Banda em 333 nm.	50
Figura 25: Espectro de absorção por camada do filme (PAH/GOx) ₁₀	51
Figura 26: Absorbância em função do número de bicamadas do filme (PAH/GOx) ₁₀ em $\lambda = 250$ nm.	52
Figura 27: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/GOx) ₁₀ 0,0 V <i>vs</i> ECS mediante adições de glicose.	52
Figura 28: Detecção de H ₂ O ₂ por PB em um sistema contendo GOx. Figura extraída de [15].	53
Figura 29: Cinética de crescimento na deposição PAH (3min)/ INV (tempos variáveis), para $\lambda = 280$ nm. Tempo ideal de deposição a partir de 20 min (1200 s).	54
Figura 30: Espectros UV-vis do filme (PAH/INV) ₁₀	55
Figura 31: Absorbância em função do número de bicamadas do filme (PAH/INV) ₁₀	55
Figura 32: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV) ₁₀ (0,0 V <i>vs</i> ECS) com 500 μ L de GOx em solução mediante adições sucessivas de sacarose.	56
Figura 33: Curva amperométrica de ITO/PB (0,0 V <i>vs</i> ECS) com 500 μ L de GOx 0,5 mg/mL em pH 5,3 na solução eletrolítica mediante adições de sacarose.....	57
Figura 34: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV) ₁₀ (0,0 V <i>vs</i> ECS) com 500 μ L de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução.	58
Figura 35: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV) ₁₀ (0,0 V <i>vs</i> ECS) mediante adições de tampão acetato pH 5,3 10 mmol/L.....	58
Figura 36: Curva amperométrica de ITO/PB mediante a adição de tampão acetato pH 5,3 10 mmol/L.	59
Figura 37: Espectros UV-vis do filme (PAH/GOx/PAH/INV) ₁₀	60
Figura 38: Crescimento do filme (PAH/GOx/PAH/INV) ₁₀ em $\lambda = 226$ nm.....	60
Figura 39: Espectros de fluorescência do filme PAH/GOx/PAH/INV. Banda em 330 nm.	61
Figura 40: Crescimento do filme PAH/GOx/PAH/INV analisado por espectroscopia de fluorescência.	61
Figura 41: Espectros UV-vis do filme (PAH/GOx) ₃ /(PAH/INV) ₇	62
Figura 42: Crescimento do filme (PAH/GOx) ₃ /(PAH/INV) ₇ para $\lambda = 226$ nm.....	63

Figura 43: Espectros UV-vis do filme PAH/GOx/INV.....	64
Figura 44: Crescimento do filme PAH/GOx/INV em 226 nm.....	64
Figura 45: Espectros UV-vis do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 6,3.	65
Figura 46: Crescimento do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 6,3.	66
Figura 47: Espectros UV-vis do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.	66
Figura 48: Crescimento do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.	67
Figura 49: Espectros de emissão do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3. Excitação em 280 nm e banda de emissão em 333 nm.....	67
Figura 50: Crescimento por fluorescência do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.	68
Figura 51: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV) ₁₀ em pH 6,3 mediante adições de glicose e sacarose.....	69
Figura 52: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV) ₁₀ em pH 5,3 mediante adições de glicose e sacarose.....	69
Figura 53: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV) ₁₀ em pH 5,3. Solução da mistura: GOx (5 mg/mL) e INV (1 mg/mL).....	70
Figura 54: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/PAH/(GOx + INV) ₁₀ pH 5,3 com 500 µL de MUT 0,2 mg/mL pH 7, 2 em solução. Eletrólito: Tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,2.....	71
Figura 55: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/PAH/(GOx + INV) ₁₀ pH 5,3 com 50 µL de MUT 2 mg/mL pH 7,2 em solução. Solução eletrolítica: Tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,2. .	72
Figura 56: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/(PAH/INV) ₁₀ com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução. Adições de solução de suco de uva.....	73
Figura 57: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução. Adição de solução de suco de uva.....	74
Figura 58: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB sem GOx. Adições de solução de suco de uva.	74
Figura 59: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/(PAH/INV) ₁₀ com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL em solução. Adições de solução de suco de uva <i>light</i>	75
Figura 60: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL em solução. Adições de solução de suco de uva <i>light</i>	75
Figura 61: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) ITO/PB sem GOx. Adições de solução de suco de uva <i>light</i>	76

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
APRESENTAÇÃO.....	15
OBJETIVOS.....	16
ESTRUTURA DO TRABALHO	16
CAPÍTULO 1.....	17
1. ASPECTOS TEÓRICOS.....	17
1.1. FILMES LAYER-BY-LAYER (LBL)	17
1.2. BIOSSENSORES.....	19
1.2.1. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.....	21
1.2.2. MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA EM BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS	23
1.2.2.1. GERAÇÕES DE BIOSSENSORES.....	24
1.2.3. BIOSSENSORES COMERCIAIS	26
1.3. ELETRODOS MODIFICADOS COM AZUL DA PRÚSSIA.....	27
1.4. POLIELETRÓLITOS	29
1.5. ENZIMAS.....	29
1.5.1. GLICOSE OXIDASE (GOX)	32
1.5.2. INVERTASE (INV).....	32
1.6. GLICOSE E SACAROSE	33
CAPÍTULO 2.....	35
2. ETAPA EXPERIMENTAL.....	35
2.1. MATERIAIS	35
2.1.1. ENZIMAS.....	35
2.1.2. SUBSTRATOS	35
2.2. SOLUÇÕES	36
2.2.1. TAMPÃO FOSFATO.....	36
2.2.2. TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO-ÁCIDO ACÉTICO	36
2.2.3. ANALITOS.....	36
2.3. MÉTODOS	36
2.3.1. PREPARO DOS FILMES LBL.....	36
2.3.1.1. FILMES PAH/GOX.....	37

2.3.1.2.	FILMES PAH/INV	37
2.3.1.3.	FILMES PAH/GOX/PAH/INV	38
2.3.1.4.	FILMES (PAH/GOX)/(PAH/INV)	39
2.3.1.5.	FILMES PAH/GOX/INV	39
2.3.1.6.	FILMES PAH/(GOX + INV)	40
2.3.2.	DEPOSIÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA	41

CAPÍTULO 3..... 42

3. CARACTERIZAÇÕES 42

3.1.	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	42
3.1.1.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO ULTRAVIOLETA/VISÍVEL (UV-VIS)	42
3.1.2.	ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	44
3.2.	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	45
3.2.1.	AMPEROMETRIA	45
3.2.2.	VOLTAMETRIA CÍCLICA	46

CAPÍTULO 4..... 47

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

4.1.	ESTABILIZAÇÃO DO AZUL DA PRÚSSIA	47
4.2.	ESPECTRO DE ABSORÇÃO DAS SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS	48
4.3.	ESPECTRO DE EMISSÃO DAS SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS	49
4.4.	CRESCIMENTO DOS FILMES PAH/GOX	51
4.5.	DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE GLICOSE	52
4.6.	CINÉTICA DE CRESCIMENTO DO FILME PAH/INV	53
4.7.	CRESCIMENTO DO FILME PAH/INV	54
4.8.	DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE SACAROSE	56
4.9.	CRESCIMENTO DO FILME PAH/GOX/PAH/INV	59
4.10.	CRESCIMENTO DO FILME (PAH/GOX)/(PAH/INV)	62
4.11.	CRESCIMENTO DO FILME PAH/GOX/INV	63
4.12.	CRESCIMENTO DOS FILMES PAH/(GOX + INV)	65
4.13.	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR	68
5.14	TESTE EM BEBIDAS COMERCIAIS	72

CAPÍTULO 5..... 77

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 77

5.1.	CONCLUSÕES	77
5.2.	PERSPECTIVAS	78

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

Apresentação

Constantes revoluções no cotidiano têm sido promovidas pelo incessante desenvolvimento e miniaturização da tecnologia, como celulares e computadores cada vez menores e mais funcionais. Entretanto, este tipo de tecnologia fundamentada em técnicas de fabricação do tipo *top-down*^a encontra limitações em tal miniaturização e adicionalmente surge a necessidade do uso de novos materiais e técnicas [1].

Nanociência e nanotecnologia, muito difundidas atualmente, são as ciências e tecnologias baseadas na escala de comprimento de nanômetros. O prefixo “nano” vem do grego e quer dizer essencialmente um bilionésimo de alguma coisa, logo estas envolvem fenômenos que muitas vezes não ocorrem em outras escalas de tamanho, permitindo avanços na ciência e tecnologia nunca antes vistos [2].

A pesquisa em nanoestruturas tem crescido constantemente em diversas áreas e com diferentes fins, tanto no estudo como na produção de novos materiais e novas tecnologias. A nanofabricação, através de técnicas do tipo *bottom-up*^b, surge como alternativa aos métodos tradicionais de *top-down* no desenvolvimento da tecnologia. Muitas destas estão relacionadas à fabricação de filmes ultrafinos, essencial para o desenvolvimento de diversos dispositivos, como sensores e biossensores.

Este trabalho visa à produção e caracterização de filmes ultrafinos de enzimas e polieletrólito no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção de glicose e sacarose em bebidas comerciais.

^a Desenvolvimento de estruturas menores partindo de estruturas maiores.

^b Utilização de estruturas nanométricas no desenvolvimento de sistemas ligeiramente maiores.

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um biossensor eletroquímico utilizando a técnica de LbL de fabricação de filmes nanoestruturados para a detecção de glicose e sacarose e possíveis aplicações em bebidas comerciais. Para isso os objetivos específicos foram empregados:

- Identificar as principais características e condições de trabalho das enzimas utilizadas (ponto isoelétrico, faixa de atividade, mecanismo de reação, etc.);
- Fabricar e caracterizar diferentes configurações de filmes nanoestruturados de polieletrólito e enzimas para o desenvolvimento do biossensor;
- Verificar a resposta do biossensor na determinação de glicose e sacarose para a aplicação em bebidas comerciais.

Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado em cinco (5) capítulos. O primeiro capítulo proporciona uma revisão bibliográfica da literatura acerca dos principais conceitos envolvidos. O segundo descreve as etapas experimentais para a fabricação, caracterização e desenvolvimento dos biossensores. A abordagem dos principais conceitos teóricos envolvidos acerca das técnicas de caracterização utilizadas é exibida no terceiro capítulo. O capítulo 4 apresenta os resultados obtidos e a discussão destes. Por fim, as conclusões do trabalho são apresentadas no capítulo cinco.

Capítulo 1

1. Aspectos Teóricos

1.1. Filmes Layer-by-layer (LbL)

Filmes ultrafinos são estruturas nanométricas em duas dimensões, cuja espessura pode variar entre 10 e 1000 Å, e que podem ser empregados em diversas aplicações, principalmente em dispositivos eletrônicos como sensores [3].

Várias estratégias para a preparação de filmes ultrafinos têm sido empregadas, como a técnica de Langmuir-Blodgett (LB) e de automontagem de monocamadas ou *self-assembled monolayers* (SAMs). Infelizmente, estas não são úteis para todos os tipos de aplicações, uma vez que o método LB requer instrumentação muito cara e é mais aplicado para materiais solúveis em solvente orgânico não miscíveis em água, enquanto a técnica de SAM não é apropriada para a confecção de estruturas multicamadas [1].

Comparada aos métodos tradicionais, a técnica de produção de filmes camada por camada, do inglês *layer-by-layer* (LbL), ou conhecida ainda como automontagem, *self-assembly*, permite a produção de filmes ultrafinos multicamadas de diversos tipos de materiais poliméricos, biológicos, metálicos, entre outros, de forma simples e barata.

A produção de filmes LbL foi proposta pela primeira vez por Sagiv e anos mais tarde aperfeiçoada por Decher e colaboradores [3]. A técnica consiste na adsorção espontânea, química ou física, de camadas nanométricas de materiais sobre a superfície de um suporte sólido (substrato) mediante a imersão deste em diferentes soluções de polieletrólitos, nanopartículas, DNA, enzimas, entre outros [3].

A técnica de automontagem (LbL) explora a estruturação espontânea de moléculas sob a influência de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals [4].

As Figuras 1A e 1B ilustram, esquematicamente, o mecanismo de fabricação do filme LbL através da interação eletrostática entre um policátion e um poliânion e a estrutura idealizada de um filme LbL contendo uma bicamada, respectivamente. O polieletrólito aniônico é adsorvido sobre o substrato sólido de superfície positivamente carregada.

Após a adsorção do poliânion (etapa 1) a rede de cargas da superfície torna-se negativa. Em seguida, este substrato é imerso em solução de lavagem para a remoção de material fracamente adsorvido (etapa 2). Subsequentemente imerge-se o substrato em uma solução contendo o polieletrólito carregado positivamente (etapa 3) que gera uma nova rede de cargas positivas na superfície, seguida da imersão novamente em uma solução de lavagem (etapa 4). Como resultado final, obtém-se uma bicamada de polieletrólitos sobre o substrato. Este processo pode ser repetido possibilitando a fabricação de filmes com estruturas e espessuras desejadas.

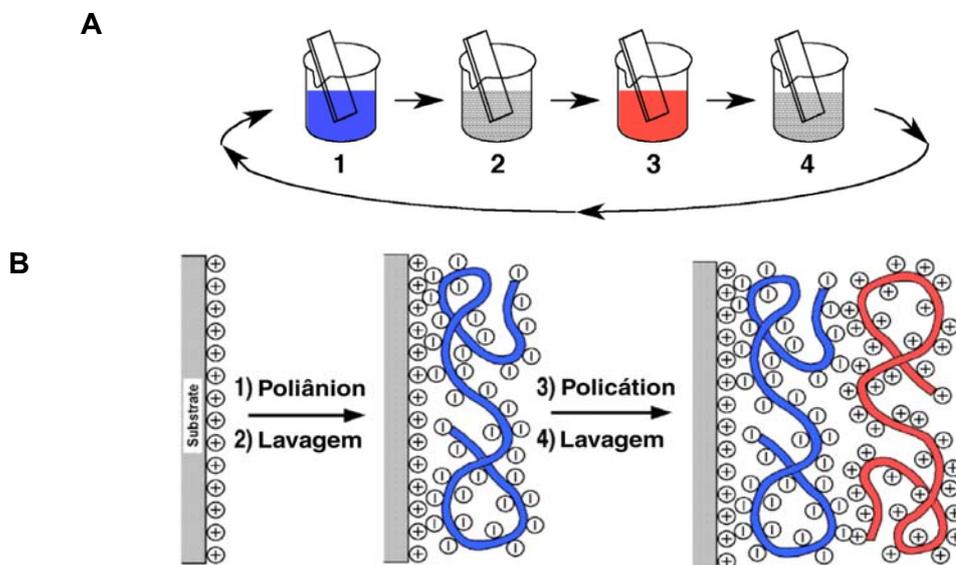


Figura 1: (A) Representação esquemática do processo de deposição do filme LbL sobre um substrato sólido. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos polieletrólitos aniônico e catiônico, respectivamente, e as etapas 2 e 4 são os procedimentos de lavagem. No fim da etapa 4 tem-se a construção de um filme do tipo (A/B)_n. (B) Estrutura idealizada do filme LbL contendo as duas primeiras etapas de adsorção dos polieletrólitos. Figura extraída da referência [4].

A ocorrência ou não da formação do filme depende da neutralização da carga precedente pela adsorção de uma dada camada e subsequente formação de uma nova, oposta e suficientemente carregada.

Filmes nanoestruturados são altamente permeáveis para pequenas moléculas e íons, tornando um sistema apropriado para funções baseadas na interação entre biomoléculas imobilizadas e substâncias livres em solução [5].

A simplicidade, versatilidade e robustez da técnica LbL, além da possibilidade do emprego de diferentes biomoléculas, levaram a um crescente interesse dos grupos de pesquisa nesta área, inclusive no desenvolvimento de biossensores.

1.2. Biossensores

Sensores químicos são dispositivos compostos por duas partes básicas, um receptor, onde ocorre um evento físico-químico cuja informação é transformada em um tipo de energia a ser medida pelo transdutor, e o próprio transdutor. Este último tem a função de converter a energia proveniente dos fenômenos ocorridos no receptor em um sinal mensurável como corrente, potencial, etc [6].

Os biossensores são um subgrupo dos sensores químicos cujo receptor é um componente biológico ativo, no qual um processo bioquímico é a fonte do sinal analítico. Dentre alguns componentes biológicos empregados em biossensores, têm-se células, tecidos, bactérias, DNA, anticorpos, enzimas, etc [7,8,9,10,11].

A descrição sistemática de um biossensor inclui cinco características: (1) o parâmetro a ser detectado ou medido, (2) o princípio de funcionamento do transdutor, (3) o modelo físico e químico/bioquímico, (4) a aplicação e (5) a tecnologia e os materiais para a fabricação [12].

O *design* de um biossensor é amplamente dependente dos materiais escolhidos, princípio de operação do transdutor, parâmetros a serem detectados e ambiente de trabalho, uma vez que estes se mostram participativos nas características analíticas e desempenho do biossensor [12]. Isto é evidenciado pela grande diferenciação nas características reportadas de biossensores baseados, por exemplo, na mesma enzima, mas que fazem uso de diferentes transdutores, membranas e técnicas de imobilização [13].

Quanto ao tipo de transdução o sensor pode ser classificado como piezelétrico, óptico, eletroquímico, calorimétrico, entre outros [11]. Todos estes tipos de biossensores apresentam alguma desvantagem ou limitação. Os biossensores eletroquímicos superam a maioria das desvantagens predominando sobre os demais [11].

A Figura 2 ilustra esquematicamente os componentes de um biossensor: a) biorreceptor que interage especificamente com o analito, b) arquitetura de interface de transdutores onde a molécula biológica interage com o analito gerando uma resposta, c) circuito amplificador, d) processador, que trata o sinal convertendo-o em parâmetros físicos que podem ser lidos em um *display* (e).

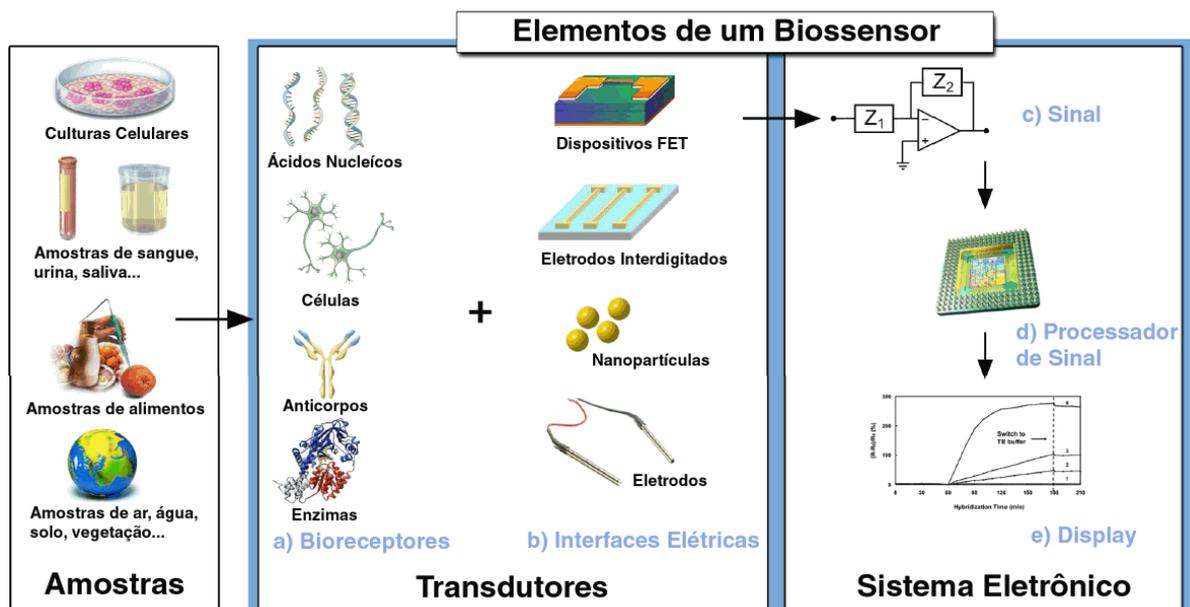


Figura 2: Elementos e componentes de um típico biossensor. Figura adaptada de Grieshaber e colaboradores [6].

Os biossensores são geralmente muito seletivos devido à possibilidade de se adequarem a interações específicas de determinados compostos biológicos através da imobilização destes sobre a superfície de um eletrodo (sensor) [6]. Dentre as moléculas de reconhecimento específico muito utilizadas estão as enzimas devido a sua alta especificidade para com seus substratos [7,8,9].

Para explorar as interações específicas através do biorreconhecimento, a arquitetura da superfície do sensor também deve suprimir qualquer interação não específica. Inúmeros esforços têm sido feitos para modificar superfícies tornando-as capazes de eliminar qualquer interação com interferentes, como o uso de membranas, polímeros e mediadores [8,11,12,14].

Para caracterizar e avaliar a qualidade de um biossensor muitos parâmetros são usados como, sensibilidade, seletividade e estabilidade [12].

Biossensores prometem baixo custo, rapidez de resposta e facilidade de operação, representando uma grande área da tecnologia emergente [11]. Aplicações típicas de biossensoriamento incluem o controle e monitoramento ambiental, emprego nas áreas de agricultura, indústria de alimentos e fármacos, e análises clínicas. Na literatura é possível encontrar uma variedade de biossensores como o de glicose [15,16,17], sacarose [18,19,20,21,22,23], frutose [24], colesterol [25], ácido úrico [26], ácido fítico [27] entre outros.

1.2.1. Biossensores Eletroquímicos

A classe mais utilizada de biossensores são os eletroquímicos [7]. Estes são fundamentados no fato de que durante um processo bioquímico, espécies eletroquímicas são consumidas ou geradas produzindo um sinal mensurável.

Um sistema de sensoriamento eletroquímico geralmente contém três eletrodos, um eletrodo de referência, um contra eletrodo e um eletrodo de trabalho. O composto a ser

analisado reage na interface do eletrodo de trabalho com a solução, onde as cargas envolvidas no processo são responsáveis pelo sinal.

Além de eletrodos, FETs são dispositivos mais complexos que também podem ser usados em biossensores eletroquímicos, como dispositivos conhecidos como ENFET (*enzyme field-effect transistor*) [12, 28].

Dependendo da propriedade eletroquímica a ser medida, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em condutimétricos, potenciométricos e amperométricos. Foquemo-nos aqui nos biossensores amperométricos, a mais difundida e numerosa classe de dispositivos comercializados [7].

A funcionalidade de um biossensor amperométrico baseia-se na medida de corrente elétrica, em função do tempo, quando o eletrodo é mantido à um potencial apropriado e constante. A mudança da corrente registrada devido ao fluxo de elétrons proveniente do processo redox sofrido pelo analito na superfície do eletrodo de trabalho é proporcional à quantidade de espécies eletro-reduzidas/oxidadas e, portanto, é proporcional à concentração do próprio analito. A Figura 3 ilustra os princípios de operação de um biossensor amperométrico [29].

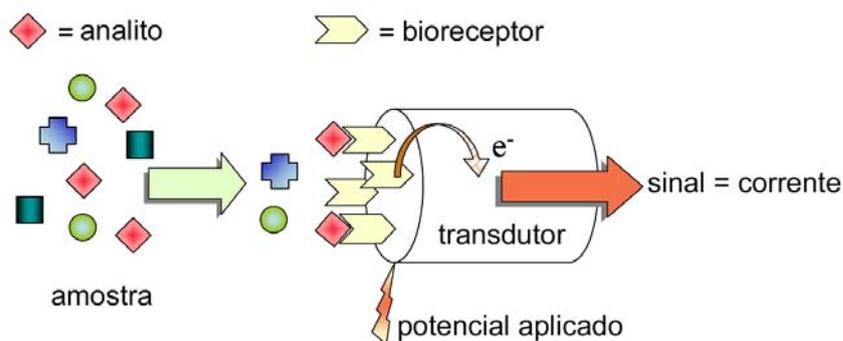


Figura 3: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico. Figura extraída de [29].

A pesquisa no campo dos biossensores, e particularmente com transdutores amperométricos, foi iniciada por Clark, em 1956, com o eletrodo de oxigênio. Baseado nestes

experimentos, em conjunto com Lyons (1962), foi proposta a adição de uma enzima, glicose oxidase, no eletrodo, introduzindo pela primeira vez, o conceito de eletrodo enzimático. Updike and Hicks mais tarde em 1967, desenvolveram esta idéia e a aplicaram em um biossensor com a enzima imobilizada, sendo também os primeiros a descrever um eletrodo enzimático específico para glicose, porém, mais simples e estável do que o eletrodo de Clark, levando a subsequente comercialização de biossensores amperométricos com o avanço da tecnologia [7, 10].

1.2.2. Mecanismos de Transferência de carga em biossensores enzimáticos

Para compreendermos melhor os mecanismos de transferência de carga e as propriedades dos biossensores eletroquímicos, vamos assumir uma reação de oxidação de um substrato, catalisada enzimaticamente. Após a catálise, a enzima torna-se inativa (forma reduzida) e sua regeneração só é possível mediante a transferência de elétrons entre seu sítio ativo e o eletrodo [10]. Em biossensores amperométricos, o sinal obtido é fruto desta transferência de elétrons.

Desta discussão é evidente que as características específicas de um biossensor são altamente dependentes da cinética deste processo de transferência, conseqüentemente, um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de dispositivos com alta sensibilidade e resposta é garantir uma transferência de elétrons eficaz entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo [10]. A primeira vista, o mecanismo mais fácil de transferência de elétrons em um biossensor seria a reciclagem eletroquímica direta da enzima na superfície do eletrodo, envolvendo o mecanismo de tunelamento de elétrons (Figura 4) [10]. Entretanto, a camada protéica que circunda o sítio ativo da enzima dificulta a transferência, tornando raro o mecanismo de transferência de elétrons por tunelamento [8,10].

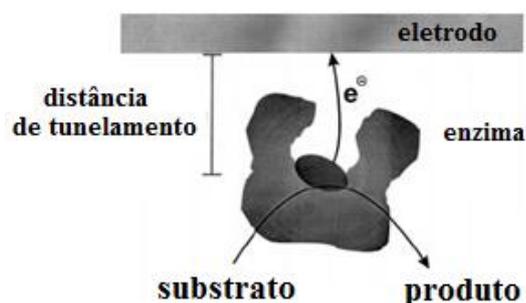


Figura 4: Transferência direta de elétron entre a enzima e o eletrodo via tunelamento. Figura extraída da referência [10].

Na natureza, o sítio ativo de muitas enzimas é reciclado por um co-substrato enzimático livremente difusional, o oxigênio molecular. Em biossensores, a transferência de elétrons pode tanto envolver O_2 quanto outros compostos conhecidos como mediadores, que podem ser também livremente difusionais ou imobilizados na superfície de um eletrodo, gerando uma grande variedade de opções no desenvolvimento de dispositivos. Desta forma, os biossensores amperométricos podem ser divididos em três classes principais ou gerações: os que não fazem uso de mediadores (primeira geração), aqueles que utilizam mediadores (segunda geração), e os baseados na transferência direta de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo (terceira geração) [7, 8].

1.2.2.1. Gerações de Biossensores

Basicamente, biossensores eletroquímicos de primeira geração são aqueles em que compostos eletroativos são consumidos ou produzidos ao longo da reação. Neste caso tem-se o consumo de O_2 e a produção de H_2O_2 , muito comuns em biossensores contendo enzimas oxidases [7]. Sensores deste tipo operam medindo o consumo de O_2 através de sua redução à aproximadamente $-0,6\text{ V}$, ou oxidação de H_2O_2 à $0,7\text{ V}^c$ sobre o eletrodo [7,11].

Como biossensores baseados em medidas da diminuição da concentração de O_2 possuem, geralmente, resposta mais lenta, e a dependência do oxigênio do meio pode

^c Potencial em relação a um eletrodo de referência de Ag/AgCl

comprometer a reprodutibilidade do dispositivo, havendo na literatura uma preferência por biossensores baseados no monitoramento de H_2O_2 , que supera os problemas de resposta lenta, mas necessita de altos potenciais de oxidação [8].

Biossensores de primeira geração sofrem com altos potenciais de trabalho que acarretam na oxidação de alguns interferentes muito comuns em amostras reais como ácido ascórbico, ácido úrico, entre outros, além de problemas de transporte das partículas do sistema, como a difusão do substrato até o sítio ativo da enzima e difusão do O_2 ou H_2O_2 até a superfície do eletrodo para a transferência de elétron [7, 8].

Para a solução dos problemas de difusão, a agitação é frequentemente usada a fim de tornar a camada difusional mais estreita, portanto diminuindo seus efeitos na resposta do sensor, enquanto que os problemas relacionados aos interferentes podem ser contornados utilizando membranas ou ainda biossensores de segunda geração [7].

Biossensores de segunda geração utilizam compostos geralmente de baixa massa molecular (mediadores) e baixo potencial de oxidação para transferir elétrons entre a enzima e o eletrodo de trabalho. Estes podem reoxidar o sítio ativo da enzima, oxidar ou reduzir um dos produtos da reação enzimática [30]. Como consequência há diminuição do sobrepotencial, possibilitando a aplicação de potenciais menores reduzindo a participação de interferentes [7, 30]. Alguns exemplos de mediadores incluem os ferrocenos e seus derivados, quinonas, ftalocianinas, Azul da Prússia, entre outros [11, 30].

As características de um mediador ideal são (1) capacidade de reagir rapidamente com a forma reduzida da enzima ou com um dado produto da reação enzimática, (2) deve exibir cinética heterogênea e reversível, (3) a voltagem aplicada não deve exceder o potencial de redução do oxigênio, (4) deve possuir forma oxidada e reduzida estáveis, (5) a forma reduzida do mediador não deve reagir com o oxigênio, (6) o mediador não deve ser influenciado pelo pH e (7) não deve ser tóxico [7,11].

Mediadores podem tanto ser adicionados à solução quanto imobilizados na superfície de eletrodos, embora a primeira opção seja mais fácil, esta não é muito tecnológica [7]. Biossensores onde todos os materiais estão imobilizados no eletrodo recebem o nome de *Reagentless Biosensors*, uma vez que não é necessária a adição de nenhum reagente e ao final do processo é possível recuperar todo o sistema, sendo preferíveis em aplicações tecnológicas [11].

Biossensores de terceira geração se baseiam na transferência direta de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo, este fenômeno é frequentemente chamado de bioeletrocatalise. A transferência direta de elétrons é muito dependente da natureza do componente biológico (somente um grupo reduzido de enzimas apresenta essa propriedade, como por exemplo, a peroxidase) e da distância e orientação entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo [7, 14].

1.2.3. Biossensores Comerciais

Biossensores amperométricos têm a vantagem de serem altamente sensíveis, apresentarem respostas rápidas, facilidade de manuseio e baixo custo, representando a classe de biossensores comercializados mais bem sucedida [7,11].

Os trabalhos de Clark e Lyons (1962), Updike e Hicks (1967), entre outros, impulsionaram o desenvolvimento da área de biossensores, refletindo na produção de diversos dispositivos comerciais [31].

O primeiro biossensor enzimático de glicose, foi desenvolvido pela *Yellow Spring Instrument Company* levando ao lançamento comercial em 1975 [7]. Desde então, várias formas de biossensores para glicose e outros analitos foram desenvolvidas.

Hoje a YSI produz o *YSI 2300 Starplus Analyzer* para a análise de glicose em soro e plasma. Vinte e cinco microlitros de amostra são requeridos, o resultado é mostrado em um

minuto, o intervalo de tempo entre as medidas é de dois minutos e não é afetado por interferentes [7, 32]. A mesma empresa desenvolve ainda o *YSI 2700 Select* para a análise de bebidas e alimentos detectando glicose e sacarose, além de outros compostos [7,32].

Até 2008, os dispositivos comerciais aplicados as análises clínicas representavam cerca de 80% da produção, sendo este o principal campo de aplicação de biossensores. Aplicações biotecnológicas e na indústria de alimentos também procedem, porém, não tão intensivamente, sendo que em alguns casos, sistemas comerciais utilizados na medicina são adaptados para o controle de produção [7].

As principais limitações da produção de dispositivos e sua aplicabilidade são a habilidade para melhorar o princípio de transdução e a falta de boa relação custo-eficácia do método de produção e materiais utilizados. A produção de biossensores bem sucedidos e a otimização destes são os desafios de diversos laboratórios de pesquisa no mundo todo, e também deste trabalho.

1.3.Eletrodos Modificados com Azul da Prússia

Eletrodos quimicamente modificados (EQM) têm sido utilizados para melhorar a estabilidade, seletividade e sensibilidade de sensores, na proteção contra a ação de impurezas, no bloqueio de interferentes e na imobilização de biomoléculas e mediadores [14].

Em relação à estabilidade e seletividade de alguns biossensores, como referido anteriormente, a detecção do H_2O_2 pode ser prejudicada pela presença de interferentes, e as maneiras de contornar esse problema são a utilização de peroxidases ou mediadores eletroquímicos. Entretanto, peroxidases possuem alto custo e baixa estabilidade, o que gerou um grande interesse no uso de mediadores eletroquímicos inorgânicos como o hexacianoferrato férrico, também conhecido como Azul da Prússia (*Prussian Blue*, PB) [30].

Após as descobertas de Neff (1978) e Itaya (1982), a primeira tentativa de se estudar o Azul da Prússia como mediador eletroquímico de H_2O_2 foi feita por Boyer e colaboradores (1990) com um eletrodo de pasta de carbono. Este experimento despertou pouco interesse até 1994, quando Karyakin e colaboradores aperfeiçoaram o processo de deposição do PB sobre um substrato sólido aumentando a capacidade catalítica para com o H_2O_2 [30].

Nas condições otimizadas de deposição eletroquímica de uma fina camada de PB, a detecção de H_2O_2 foi muito similar a obtida com uso de enzimas peroxidase. Devido à alta atividade catalítica e seletividade para com o H_2O_2 , o PB foi considerado uma “peroxidase artificial” [30].

O mecanismo de catálise do PB em relação ao H_2O_2 ainda não é claro, assim como sua estrutura cristalina, uma vez que Azul da Prússia é uma designação genérica para um material complexo de estequiometria variável. Sua estrutura, dependendo dos materiais e processos utilizados para sua cristalização, pode conter íons co-precipitados, quantidades de água indefinidas e várias vacâncias na estrutura cristalina e ainda afetar propriedades como estabilidade em função do pH [30]. Atribui-se tal habilidade catalítica à estrutura cristalina do PB que permite a passagem de moléculas de baixa massa molecular (como O_2 e H_2O_2) se alojando no centro de algumas vacâncias e cercado-se de íons de ferro, no qual pode ocorrer a redução do H_2O_2 mediante a transferência de elétrons entre este e os íons de ferro [30].

A estabilidade e capacidade catalítica do PB para com o H_2O_2 levaram a uma crescente utilização deste em diversos biossensores.

Ferreira e colaboradores [15], utilizaram filmes de poli(alilamina hidroclorada) PAH e glicose oxidase GOx, obtidos pela técnica LbL, em eletrodos de ITO modificados com Azul da Prússia na detecção amperométrica de glicose.

Haghighi e colaboradores [23], modificaram eletrodos de carbono vítreo, também com Azul da Prússia, imobilizando as enzimas invertase (INV), mutarrotase (MUT) e glicose

oxidase (GOx) através de *cross-linking*, na detecção de sacarose por análise de injeção em fluxo (FIA).

1.4. Polieletrólitos

Polieletrólitos são polímeros com repetidos grupos que se dissociam em água deixando o polímero carregado.

A aplicação da técnica LbL em polímeros é uma resposta à atual necessidade de novos métodos que permitam a fabricação de filmes com organização molecular definida, algo considerado essencial para dispositivos eletrônicos mais sofisticados do que os atuais.

Em biossensores, polímeros podem ser usados para se imobilizar o material biológico e mediadores, e ainda como membrana para reduzir a presença de interferentes, além de que muitas moléculas biológicas, como enzimas e proteínas, são polímeros de aminoácidos.

Os polímeros utilizados como polieletrólitos neste trabalho, são a poli(alilamina hidrocloreto) PAH e o poli(vinil sulfonato de sódio) PVS, cujas fórmulas estruturais estão ilustradas na figura abaixo.



Figura 5: Estrutura dos polieletrólitos PAH (policátion) e PVS (poliânion).

1.5. Enzimas

Quase todas as enzimas são proteínas, ou seja, são polímeros naturais formados por milhares de aminoácidos diferentes ligados uns aos outros por ligações peptídicas^d em sequências bem definidas. A função que uma dada proteína exerce em um organismo depende

^d Ligações covalentes específicas entre os resíduos de aminoácidos

de sua estrutura tridimensional que, por sua vez, depende da sequência de aminoácidos que a compõe [33,34].

As enzimas são o centro de todo processo biológico, pois catalisam centenas de reações no organismo e são responsáveis pela conservação e geração de energia através das moléculas de nutrientes [33]. Além disto, possuem extraordinária atividade catalítica e alto grau de especificidade para com seus substratos e são classificadas pelas reações que catalisam em seu sítio ativo, como oxidorreduções, hidrolases, isomerases, entre outros [33]. Uma reação enzimática pode basicamente ser representada da seguinte forma:



Figura 6: Esquema de reação enzimática. Figura extraída da referência [33].

Onde E, S e P são respectivamente, enzima, substrato e produto e ES e EP são complexos intermediários da enzima com o substrato e com o produto.

A atividade enzimática depende de alguns fatores, tais como temperatura e pH, necessitando de certo controle para a aplicação em biossensores, tanto no que diz respeito a otimização de condições de trabalho, quanto a precaução em relação a desnaturação, processo no qual a proteína perde sua conformação tridimensional resultando na perda de suas funções.

O mecanismo de perda de atividade enzimática envolve mudanças na estrutura tridimensional da proteína desarranjando o sítio ativo da enzima. Tais mudanças quebram o delicado balanço de ligações não covalentes que mantém a conformação nativa. Mudanças na conformação de uma proteína podem se originar da (a) desnaturação térmica, (b) degradação proteolítica, (c) oxidação metálica catalisada não específica, como também mudanças no pH, força iônica e adição de detergente [13].

Alguns biossensores utilizam enzimas em solução, o que não é tecnologicamente prático uma vez que não é possível recuperar a enzima após o seu uso, e torna sua aplicação

economicamente inviável, realçando a forte tendência na utilização de *Reagentless Biosensors* [11].

As técnicas mais comuns de imobilização de enzimas para a aplicação em biossensores são as baseadas em ligações não covalentes (*entrapment*) com polieletrólitos e por ligações covalentes em superfícies sólidas, com polímeros ou outras proteínas (*cross-linking*) [13].

A imobilização é vantajosa, pois permite (1) a extensão da estabilidade da enzima protegendo-a da desnaturação, (2) o reuso, (3) redução no custo de operação e (4) recuperação da enzima [35]. As maiores desvantagens na imobilização de enzimas são (1) perda ou diminuição da atividade durante a imobilização, (2) resistência difusional para o transporte do substrato ou produto entre o meio reacional e o sítio ativo da enzima imobilizada [35].

A imobilização de enzimas através do método LbL é interessante, uma vez que este método utiliza menos material biológico comparado aos demais, pode ser realizada em condições adequadas de pH e temperatura, além de possibilitar o uso de soluções aquosas, minimizando a possibilidade de desnaturação da enzima [16].

Ponto isoelétrico^e, faixa de atividade, pH ótimo e temperatura são características enzimáticas determinantes para a confecção de biossensores. Ressalta-se que enzimas iguais originadas de microorganismos diferentes terão tais características desiguais, como por exemplo, a enzima glicose oxidase obtida de *Aspergillus Niger* e *Penicillium Amagasakiense* que exibem ótimo de atividade entre pH 3,5 – 6,5 e pH 4,0 – 5,5 respectivamente [36].

Reações enzimáticas são excelentes para determinar glicose, sacarose, frutose, ácido fítico, entre outros. Para as oxidases, o produto é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que pode ser monitorado eletroquimicamente.

^e pH característico onde a carga líquida da proteína é nula.

1.5.1. Glicose Oxidase (GOx)

Glicose Oxidase (β -D-glicose: oxigênio 1-oxidorreductase) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação de β -D-glicose para glucono- δ -lactona que é espontaneamente hidrolisado para ácido glucônico, utilizando oxigênio molecular como aceitador de elétrons e produzindo peróxido de hidrogênio, fundamentais na operação de biossensores eletroquímicos [36, 37].

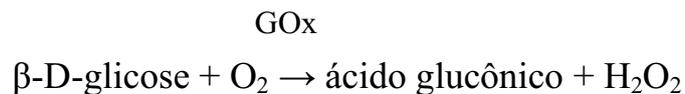


Figura 7: Mecanismo de catálise da glicose pela glicose oxidase (GOx).

No mecanismo de reação, GOx oxida seu substrato, e neste processo, o cofator FAD (flavina adenina dinucleotídeo) da enzima é reduzido para FADH₂. Através da transferência de elétron para o oxigênio molecular, a enzima é reoxidada para sua forma ativa [36].

Embora com atividade enzimática menor, outros açúcares e derivados também são substratos para GOx, como 2-deoxi-D-glicose (25 – 30 %) ^f, 6-deoxi-D-glicose (10 %), α -D-glicose (0,64 %), galactose (0,08 %), entre outros [37].

A glicose oxidase possui diferentes aplicações comerciais, e tem sido utilizada para aumentar a cor e o sabor de produtos alimentícios, na remoção de oxigênio em sucos de frutas e bebidas enlatadas, e principalmente, na produção de biossensores clínicos e portáteis para o monitoramento de glicose em sangue [36].

1.5.2. Invertase (INV)

A invertase (β -fructofuranosidase) é a enzima responsável pela hidrólise da sacarose, que produz uma mistura equimolar de glicose e frutose. Uma das importantes aplicações da invertase reside na produção de calda de açúcar não cristalizável a partir da sacarose [38]. A

^f Porcentagem relativa, considerando a atividade de GOx para com β – D- glicose como 100%.

invertase também é utilizada sempre que substratos contendo sacarose são submetidos à fermentação, como na produção de bebidas alcoólicas, ácido láctico, etc [38]. Segue abaixo, a reação da sacarose na presença de sua respectiva enzima, a invertase (INV) [22].

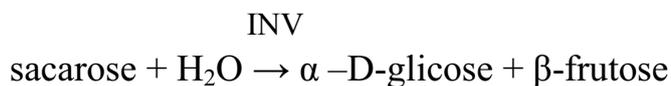


Figura 8: Catálise da sacarose por INV, gerando os produtos α -glicose e β -frutose.

Um dos produtos da reação da sacarose é glicose (α -D-glicose), que pode ser utilizada em sistemas contendo GOx, produzindo H_2O_2 eletroquimicamente detectável em biossensores. Biossensores de sacarose podem ser baseados em sistemas bienzimáticos (GOx e INV) ou trienzimáticos (GOx, INV, MUT). Neste último, a enzima mutarrotase (MUT) é utilizada para converter o isômero α -D-glicose em β -D-glicose.

Neste trabalho, propõe-se um sistema bienzimático na imobilização de GOx e INV no desenvolvimento de um biossensor para o sensoriamento de glicose e sacarose, discutindo ainda a possibilidade no emprego da mutarrotase para maior eficiência do sensor.

1.6. Glicose e Sacarose

Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na face da Terra e são divididos de acordo com o seu tamanho, como monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos (a palavra “sacarídeo” é derivada do grego *sakcharon* e significa “açúcar”) [33].

O monossacarídeo mais abundante na natureza é um açúcar com seis átomos de carbono na molécula, a D-glicose. Os monossacarídeos são sólidos cristalinos e naturalmente solúveis em água. A sacarose é um dissacarídeo, formada por duas unidades de monossacarídeos, a D-glicose e a D-frutose [33].

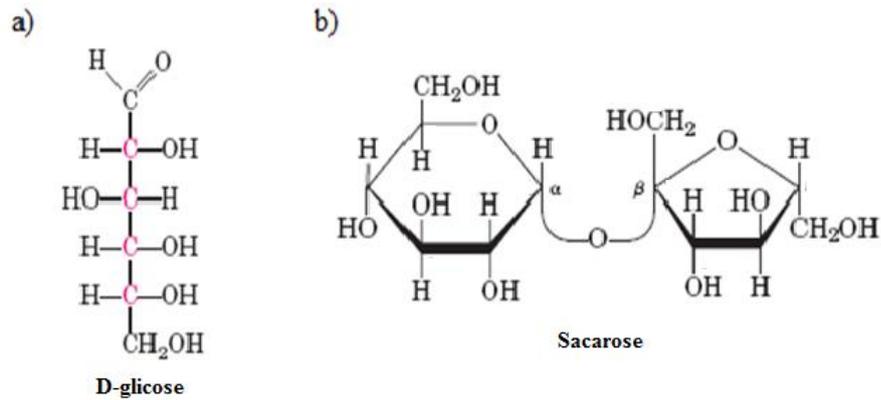


Figura 9: Estruturas da a) glicose e b) sacarose. Figura adaptada da referência [33].

Quando em soluções aquosas, os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono na cadeia ocorrem, predominantemente, como estruturas cíclicas, como a D-glicose que pode se apresentar sob estas circunstâncias os isômeros α e β . A interconversão entre α e β é chamada mutarrotação [33].

A mutarrotação é um processo espontâneo que pode ser acelerado pela adição de íons fosfato na solução por um dado período de tempo ou ainda pelo uso da mutarrotase [20].

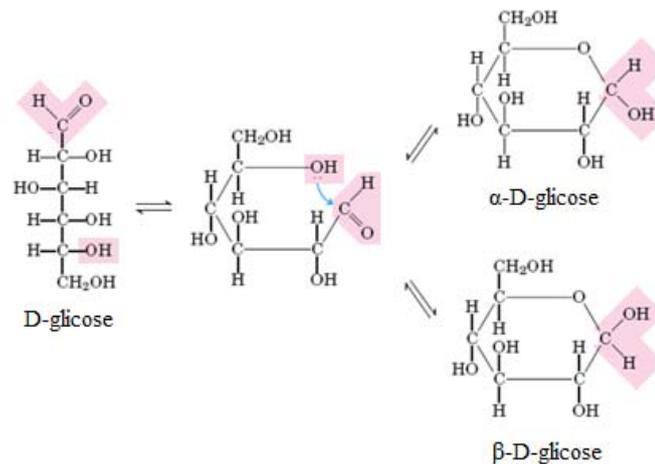


Figura 10: Ilustração das formas cíclicas α e β da D-glicose. Figura adaptada da referência [33].

A determinação de glicose e sacarose é de extrema importância para a indústria de alimentos e bebidas, no monitoramento de doenças como diabetes, além de outras aplicações de biotecnologia.

Capítulo 2

2. Etapa Experimental

2.1. Materiais

2.1.1. Enzimas

Glicose oxidase (GOx) de *Aspergillus Níger* (E.C 1.1.3.4)[§], 225 U/mg, marca Fluka, ponto isoelétrico (pI) de 4,2 [16,20], e ótimo de atividade entre pH 3,5 – 6,5 [36].

Invertase (INV) de *Saccharomices Cerevisiae* ou *Baker's Yeast*, Grau VII (E.C. 3.2.1.26), 401 U/mg, com pI de aproximadamente 4,5 [39,40], ótimo de temperatura 35 °C - 45 °C [35,39] e faixa de atividade entre pH 4,0 e 8,0 [39].

Mutarrotase (MUT) de *Porcine Kidney* (E.C. 5.1.3.3), 2200 U/mg, marca Calzyme, pI 5,0 – 5,5 [33], ótimo de atividade em aproximadamente pH 7,4 [33].

2.1.2. Substratos

Para a caracterização espectroscópica dos filmes, foram usados substratos de quartzo, devidamente hidrofílicos. Para isso estes foram imersos em uma solução básica NH₄OH:H₂O₂:H₂O com 1:1:5 (v/v) por 10 minutos à temperatura de 70°C e então lavados com água ultrapura, cuja resistividade é 18,2 MΩ·cm, fornecida por um sistema Milli-Q. Em seguida, os substratos foram imersos em solução ácida HCl:H₂O₂:H₂O com 1:1:6 (v/v) por mais 10 minutos a 70°C e novamente lavados com água ultrapura.

Para as análises eletroquímicas foram utilizados substratos de vidro recobertos com óxido de estanho dopado com índio (*indium tin oxide*, ITO) e ITO modificado com Azul da Prússia quando necessário.

[§] Classificação numérica das enzimas - *Enzyme Commission Number* (E.C.).

2.2.Soluções

2.2.1. Tampão Fosfato

Para a obtenção de uma solução de 10 mmol/L de tampão fosfato, foi utilizado fosfato de sódio monobásico (marca VETEC) em água Milli-Q e o pH foi ajustado para 6,3 usando fosfato de sódio dibásico (marca VETEC). Este tampão foi utilizado principalmente nos sistemas contendo GOx e no preparo dos analitos.

2.2.2. Tampão Acetato de sódio-Ácido acético

Foi preparada uma solução de 10 mmol/L de tampão acetato fazendo uso de acetato de sódio (marca VETEC) em água Milli-Q e o pH foi ajustado para 5,3 com o uso de ácido acético. Este tampão foi utilizado principalmente em soluções nos sistemas contendo INV e ainda no preparo dos analitos.

2.2.3. Analitos

Preparam-se soluções de glicose e sacarose (Sigma-Aldrich) em concentração de 10 mmol/L e 50 mmol/L em tampão fosfato ou acetato, dependendo do tipo de arquitetura LbL empregada na avaliação da resposta eletroquímica do biossensor.

2.3.Métodos

2.3.1. Preparo dos Filmes LbL

Para o desenvolvimento do biossensor, inicialmente imobilizou-se as enzimas individualmente com o polieletrólito a fim de investigar o crescimento destes filmes pela técnica LbL. Posteriormente, diversas configurações LbL com as duas enzimas imobilizadas foram testadas. Esta seção descreve as condições de imobilização de cada sistema.

Para todos os sistemas em que os filmes foram estudados por espectroscopia, previamente à deposição do filme, foram depositadas duas bicamadas de PAH/PVS como bicamada precursora, em tempos de 3 minutos cada, a fim de minimizar possíveis imperfeições do substrato [41].

Adotou-se ainda, 10 bicamadas como espessura ideal dos filmes, uma vez que poucas camadas podem não conter quantidades muito significativas de material para a geração da resposta do biossensor, e filmes espessos podem dificultar a difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo.

2.3.1.1. Filmes PAH/GOx

Os filmes de PAH/GOx foram produzidos utilizando tempos de 4 min em PAH com pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 1 min em uma solução de lavagem de água Milli-Q com pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 4 min em GOx pH 6,3 (em tampão fosfato) e 1 min em uma solução de lavagem de tampão fosfato pH 6,3. Foram utilizadas as concentrações de 0,5 mg/mL de PAH e 10 mg/mL de GOx.

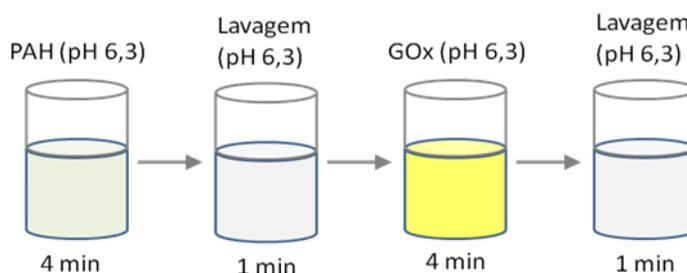


Figura 11: Sequência de deposição do filme PAH/GOx.

2.3.1.2. Filmes PAH/INV

Para os filmes de PAH/INV, os tempos de deposição foram de 4 min em PAH pH 5,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 1 min de lavagem em Milli-Q pH 5,3 (corrigido com HCl 10 mmol/L), 20 min em invertase pH 5,3 (em tampão acetato) à 40 °C e 1 min em lavagem de

tampão acetato pH 5,3, onde o tempo de deposição de invertase foi obtido através de cinética de crescimento. Utilizou-se concentração de 0,5 mg/mL para PAH e INV.

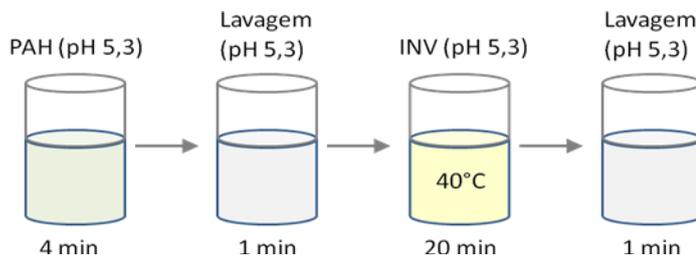


Figura 12: Sequência de deposição do filme PAH/INV.

2.3.1.3. Filmes PAH/GOx/PAH/INV

Na montagem PAH/GOx/PAH/INV as enzimas foram imobilizadas intercaladas com o PAH. Os tempos de deposição foram 4 min de PAH pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 1min de lavagem em Milli-Q pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 4 min de GOx pH 6,3 (em tampão fosfato), 1 min de lavagem em tampão fosfato pH 6,3. Imersão em PAH pH 5,3 (corrigido NaOH 10 mmol/L) durante 4 min, 1 min de lavagem em Milli-Q (corrigido com HCl 10 mmol/L), 20 min de INV pH 5,3 (tampão acetato) à 40°C e por fim lavagem de 1 min em tampão acetato pH 5,3.

As concentrações utilizadas foram de 0,5 mg/mL de PAH, 10 mg/mL de GOx e 0,5 mg/mL de INV.

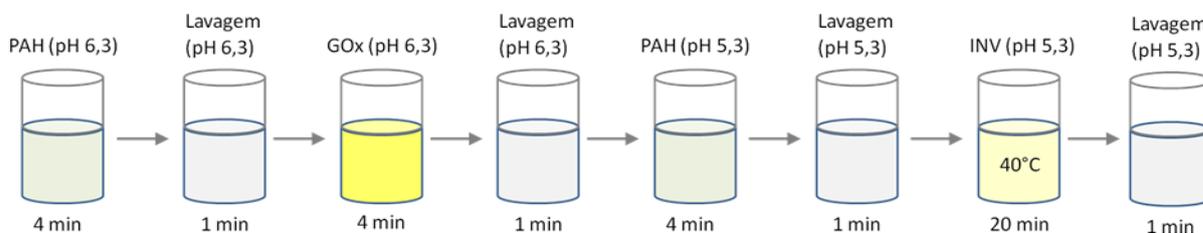


Figura 13: Sequência de deposição do filme PAH/GOx/PAH/INV.

2.3.1.4. Filmes (PAH/GOx)/(PAH/INV)

Neste tipo de configuração o filme foi produzido depositando 3 camadas de PAH/GOx -1ª etapa - e em seguida 7 camadas de PAH/INV – 2ª etapa. As condições de tempo e concentrações das soluções utilizadas foram as mesmas da montagem anteriormente descrita.

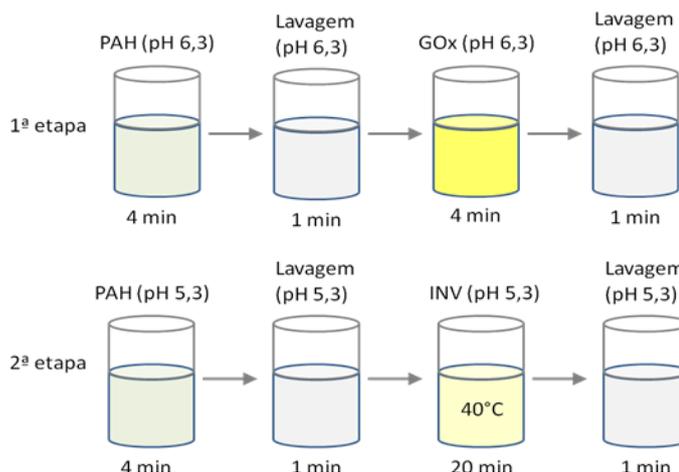


Figura 14: Sequência de deposição do filme (PAH/GOx)/(PAH/INV).

2.3.1.5. Filmes PAH/GOx/INV

Para a confecção deste tipo de montagem utilizaram-se os seguintes tempos de montagem: 4 min em PAH pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 1min de lavagem em Milli-Q pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 4 min em GOx pH 6,3 (tampão fosfato), 1 min de lavagem em tampão fosfato pH 6,3, 20 min em INV (tampão acetato) à 40°C e 1 min de lavagem em tampão acetato pH 5,3. As concentrações utilizadas foram de 0,5 mg/mL, 10 mg/mL e 0,5 mg/mL de PAH, GOx e INV respectivamente.

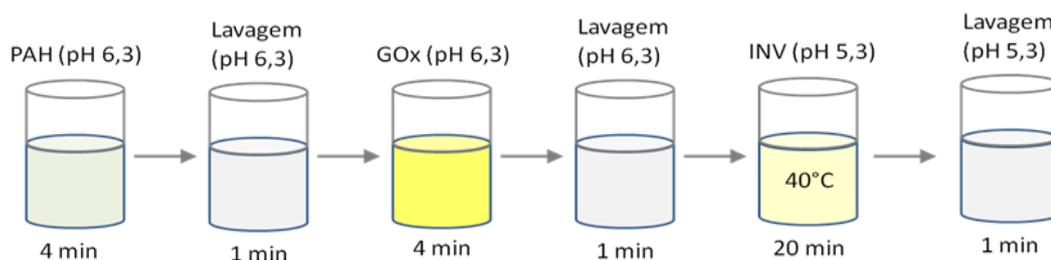


Figura 15: Sequência de deposição do filme PAH/GOx/INV.

2.3.1.6. Filmes PAH/(GOx + INV)

Neste tipo de configuração, as soluções de GOx e INV foram misturadas para a imobilização em conjunto com PAH. Para isto duas montagens diferentes do mesmo sistema foram propostas, empregando misturas de GOx e INV solubilizadas em tampão fosfato pH 6,3 e misturas em tampão acetato pH 5,3. Em ambas configurações as concentrações de PAH, GOx e INV foram 0,5 mg/mL, 10 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente.

Na montagem inicial foram utilizados tempos de 4 min em PAH pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 1 min de lavagem em Milli-Q pH 6,3 (corrigido com NaOH 10 mmol/L), 20 min na mistura enzimática pH 6,3 à 20°C e 1 min de lavagem em tampão fosfato.

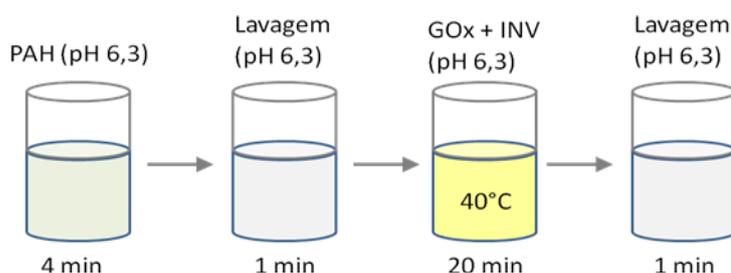


Figura 16: Sequência de deposição do filme PAH/(GOx + INV) pH 6,3.

Para a segunda montagem, foram utilizados os mesmos tempos e condições, porém as soluções foram preparadas em pH 5,3.

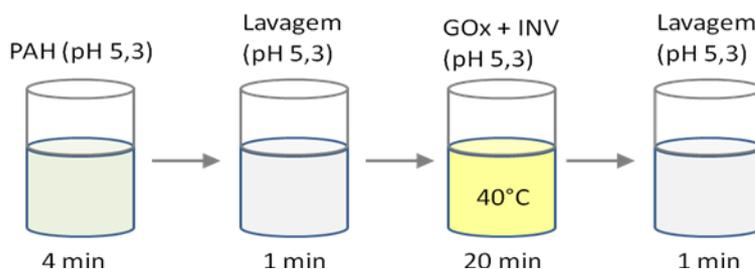


Figura 17: Sequência de deposição do filme PAH/(GOx + INV) pH 5,3.

2.3.2. Deposição do Azul da Prússia

Inicialmente, as seguintes soluções foram preparadas: KCl 0,1 mol/L, HCl 10 mmol/L, 2 mmol/L de ferricianeto de potássio $K_3[Fe(CN)_6]$ em KCl 0,1 mol/L, e também 2 mmol/L de tricloreto férrico $FeCl_3$ em HCl 10 mmol/L.

Para a deposição do Azul da Prússia (PB), aplicou-se 0,4 V, durante 400 s de amperometria, em eletrodos de ITO devidamente limpos, utilizando como solução eletrolítica para a eletrodeposição uma mistura 1:1 (v/v) de ferricianeto de potássio 2 mmol/L e tricloreto férrico 2 mmol/L.

Capítulo 3

3. Caracterizações

3.1. Caracterização Espectroscópica

A técnica de espectroscopia consiste na irradiação da amostra com fótons de luz em um espectro de frequências definido coletando as intensidades refletidas, transmitidas, ou emitidas dependendo da aplicação. Para tal, utilizaram os espectrofotômetros das marcas genesys 6 e Hitachi modelo FL 4500, para medidas de espectroscopia na região UV-vis e de fluorescência respectivamente.

3.1.1. Espectroscopia de Absorção na região Ultravioleta/Visível (UV-vis)

De acordo com a mecânica quântica, os elétrons de um dado átomo estão dispostos em níveis de energia bem definidos e em um sólido ou moléculas, estes níveis de energia compõe uma banda de energia, com estados quânticos rotacionais, vibracionais e eletrônicos [42].

Para um elétron passar de um nível de energia mais baixo para outro mais alto, ele deve absorver uma quantidade de energia igual ao *gap* (diferença de energia) entre esses dois níveis, sendo que para os elétrons mais externos dos átomos as energias necessárias para transições eletrônicas correspondem a fótons com frequência na região do ultravioleta/visível.

As bandas de energia formadas se devem a inúmeras interações nos sólidos ou moléculas, como interação entre elétrons vizinhos, entre elétrons e núcleos vizinhos, entre elétrons e seus próprios núcleos. A banda de um dado material possui valores de energia muito particulares a cada material, logo as absorções de fótons de luz em determinadas frequências também são muito particulares, sendo o espectro de absorção de um material, característica deste.

Quando um feixe monocromático de radiação incide com intensidade I_0 em uma amostra de faces paralelas, diversos fenômenos podem ocorrer, mas aqui o interesse está focado nas quantidades da radiação transmitida e absorvida pelo meio, entretanto há também quantidades refletidas e espalhadas pelo sistema (Figura 18).

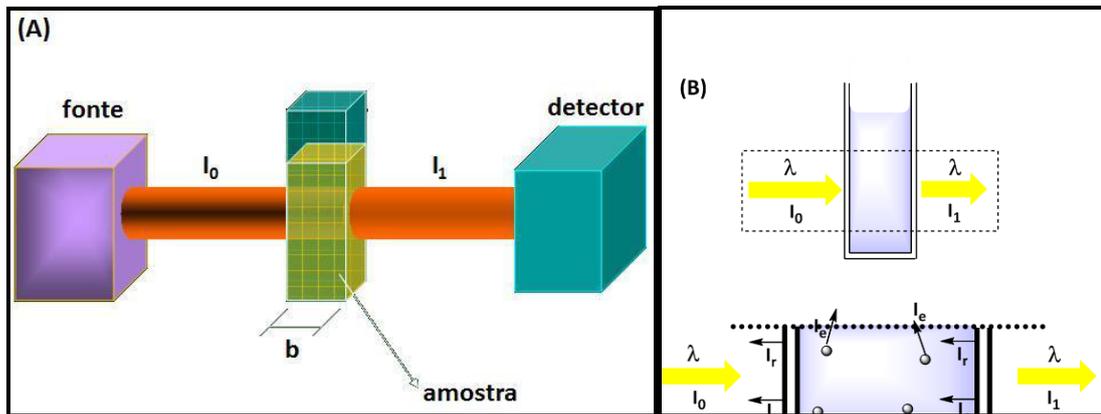


Figura 18: (A) Esquema de um espectrômetro de UV-vis: uma fonte de luz monocromática incide um feixe de intensidade I_0 . O detector recebe um feixe de intensidade I_1 . (B) Esquema de uma cubeta recebendo um feixe de intensidade I_0 , que é espalhada devido à reflexão nas paredes da cubeta e absorvida pelas moléculas, chegando um feixe de intensidade I_1 ao detector.

A fração do feixe que atravessa a amostra é denominada transmitância (T) e é dada pela equação:

$$T = \frac{I_1}{I_0}$$

onde $0 \leq T \leq 1$. O logaritmo do inverso da transmitância é denominado absorvância (A):

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$$

A absorvância (A) é proporcional à quantidade de luz absorvida pelo material, e pode ser aplicada também na caracterização de filmes, onde cada camada depositada é proporcional à quantidade de material adsorvido obedecendo a Lei de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

onde ε é a absorvidade molar, b é o caminho ótico e c a concentração da espécie absorvente.

3.1.2. Espectroscopia de Fluorescência

A luminescência molecular é a emissão de radiação eletromagnética, na região do ultravioleta e visível próximo, proveniente de moléculas que foram excitadas, retornando ao seu estado fundamental e pode se apresentar na forma de fluorescência e fosforescência.

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo estrutural de macromoléculas, como proteínas e polímeros [43]. As proteínas em geral, possuem aminoácidos participativos no processo de fluorescência, como o triptofano, tirosina e fenilalanina denominados fluoróforos [43].

Ressalta-se ainda que mudanças conformacionais nestes fluoróforos, em particular, induzem mudanças no espectro de fluorescência da amostra. Outros aspectos que influenciam mudanças no espectro de fluorescência são o solvente, a temperatura e o pH [43,44].

Em medidas de fluorescência pode-se obter dois tipos de espectros, de fluorescência ou emissão e o espectro de excitação. O primeiro consiste em obter informações sobre a emissão de fluorescência em função do comprimento de onda mediante a excitação da amostra em um comprimento de onda fixo, enquanto no espectro de excitação pode-se registrar emissões que ocorram num dado comprimento de onda fixo, mediante a variação do comprimento de onda de excitação da amostra [42].

Neste trabalho, utilizaram-se medidas de fluorescência, fixando o comprimento de onda de excitação em $\lambda = 280 \text{ nm}^h$, para obter os espectros das enzimas em solução assim como acompanhar o crescimento de alguns filmes.

^h O triptofano apresenta absorção por volta de 280 nm e emissão por volta de 340 nm e é importante no estudo de proteínas devido ao fato de sua emissão ser muito sensível ao ambiente em que se encontra localizado ou aos grupos que se encontram ligados [44].

3.2. Caracterização Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab modelo PGSTAT 30. A célula eletroquímica era do tipo convencional de três eletrodos: referência, contra eletrodo e trabalho (Figura 19). O eletrodo de referência era de calomelano saturado (ECS) $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$, uma lâmina de platina de 1 cm^2 foi usada como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo e o eletrodo de trabalho utilizado foi o filme LbL depositado sobre o substrato de ITO.

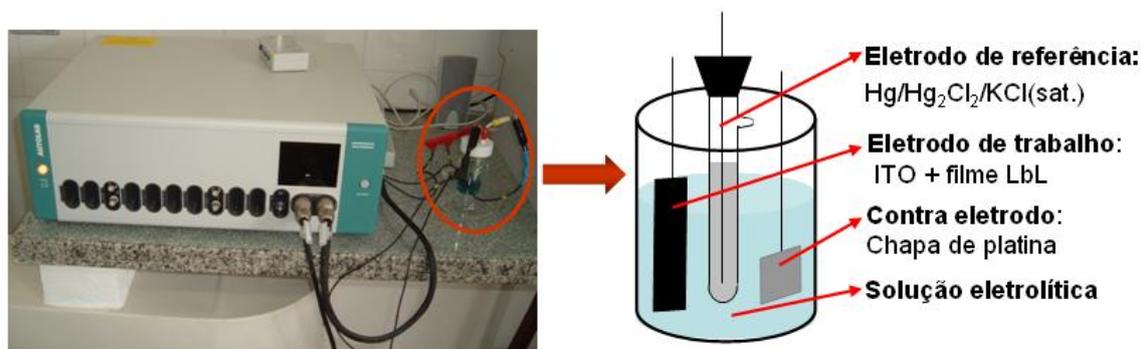


Figura 19: Representação de uma célula eletroquímica acoplada a um potenciostato. Célula convencional de três eletrodos: trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência.

3.2.1. Amperometria

A amperometria, ou cronoamperometria, é uma técnica eletroquímica na qual um potencial constante e apropriado, normalmente de oxidação ou redução de uma dada espécie em solução, é aplicado entre os eletrodos de trabalho e referência, e a corrente elétrica entre os eletrodos de trabalho e auxiliar é medida em função do tempo.

A utilização da técnica é muito comum na avaliação da resposta de biossensores, mediante titulações de um dado analito, no sentido de obter informações a respeito da oxidação ou redução de um dado produto enzimático na superfície do eletrodo.

Neste trabalho, empregou-se a técnica de amperometria na titulação de glicose e sacarose para a determinação da resposta de eletrodos modificados com Azul da Prússia contendo as enzimas imobilizadas.

3.2.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica que consiste em aplicar entre os eletrodos de trabalho e referência um intervalo de potencial que varie continuamente com o tempo, crescente e decrescentemente; ocasionando reações de oxidação e redução nas espécies eletroativas imersas em solução ou na superfície do eletrodo. As informações sobre estas espécies são representadas em uma curva de corrente-potencial chamado de voltamograma [45].

A varredura de potencial é cíclica e normalmente escolhida de modo a compreender a oxidação ou redução do composto analisado, onde os picos de corrente podem fornecer informações quantitativas ou qualitativas do sistema.

A voltametria é também uma técnica muito útil para estudar as propriedades de um mediador ajudando a selecionar o mais adequado para o biossensor [11]. Neste trabalho, usou-se VC para caracterizar os eletrodos de ITO modificados com Azul da Prússia.

Capítulo 4

4. Resultados e Discussão

4.1. Estabilização do Azul da Prússia

Para se obter a resposta eletroquímica do biossensor contendo um filme LbL com uma dada arquitetura de polieletrólito e enzimas sobre um eletrodo de ITO modificado com Azul da Prússia, foi necessária inicialmente a estabilização do mesmo, utilizando como solução eletrolítica 1:1 (v/v) de KCl 0,1 mol/L e HCl 10 mmol/L e aplicando-se uma varredura de potencial de 0,0 V a 1,0 V (*vs* ECS) a 50 mV/s até 20 ciclos.

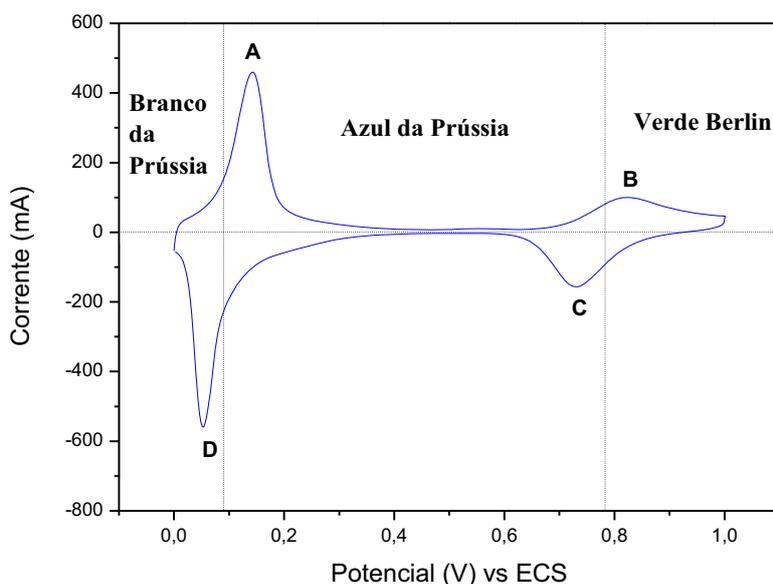


Figura 20: Voltamograma cíclico do eletrodo ITO/PB de 0,0 V a 1,0 V (*vs* ECS) – 50 mV/s após 20 ciclos.

Após vários ciclos, o Azul da Prússia depositado apresentou boa estabilidade eletroquímica sendo viável para uso como eletrodo modificado no desenvolvimento do biossensor.

O voltamograma cíclico do eletrodo (Figura 20) apresenta dois pares redox identificados de A-D com as regiões onde o Azul da Prússia (*Prussian Blue*, PB), sua forma reduzida Branco da Prússia (*Prussian White*, PW) e sua forma oxidada Verde Berlim (*Berlin Green*, BG) predominam. As reações de interconversão estão ilustradas abaixo:



A forma reduzida do PB, PW é a responsável pelo efeito eletrocatalítico sobre o H_2O_2 [23, 30]. Portanto, para operação do biossensor deve-se utilizar como potencial de trabalho valores em torno de 0,0 V.

4.2. Espectro de absorção das soluções enzimáticas

Para a obtenção dos espectros de absorção das enzimas GOx e INV (Figuras 21 e 22) foi utilizada uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e soluções de 2 mg/mL de GOx e de 0,5 mg/mL de INV sendo estas preparadas em tampão fosfato 10 mmol/L pH 6,3 e tampão acetato 10 mmol/L pH 5,3 respectivamente. Estas mesmas soluções tampão foram utilizadas para a obtenção da linha de base da respectiva enzima.

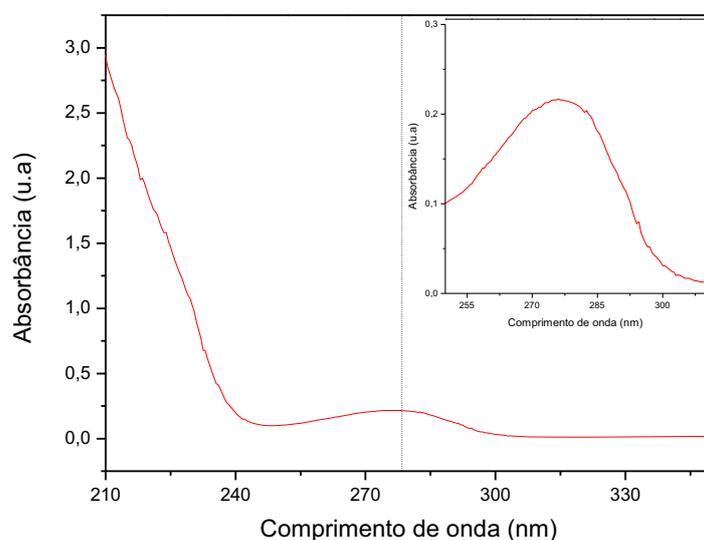


Figura 21: Espectro UV-vis da solução de GOx 2mg/mL (pH 6,3). *Inset*: Banda em 278 nm.

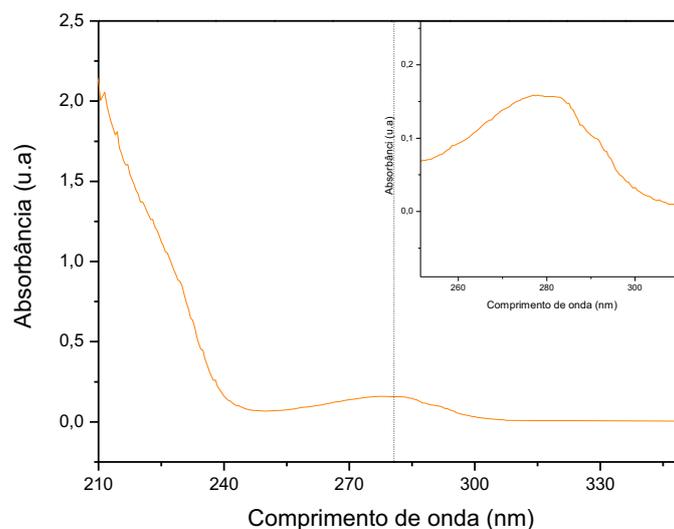


Figura 22: Espectro UV-vis da solução de INV 0,5 mg/mL (pH 5,3). *Inset*: Banda em 280 nm.

A banda observada por volta de 280 nm para ambas as enzimas pode ser atribuída à absorção de alguns aminoácidos neste comprimento de onda, tais como o triptofano e tirosina [33].

4.3. Espectro de emissão das soluções enzimáticas

Espectros de fluorescência foram obtidos para as soluções de GOx (2mg/mL) e INV (0,5 mg/mL) preparadas respectivamente em pH 6,3 e pH 5,3. Para isto, utilizou-se uma cubeta com 1 cm de caminho ótico e excitação em 280 nm, como ilustrado nas Figuras 23 e 24.

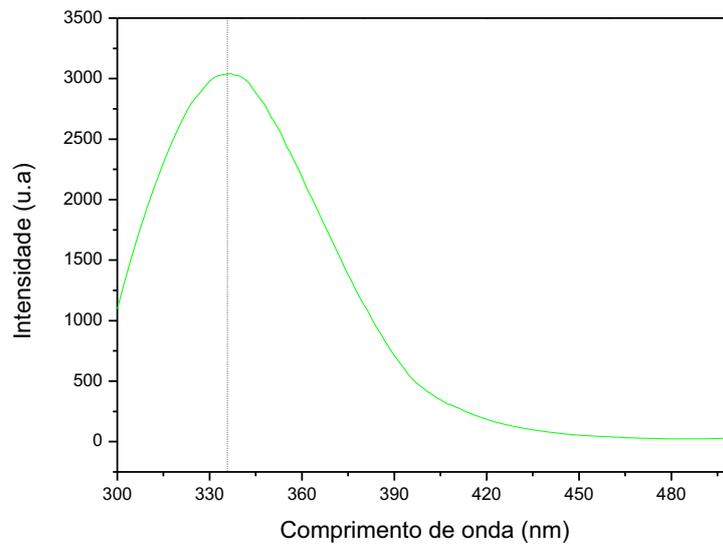


Figura 23: Espectro de fluorescência da solução GOx 2mg/mL (pH 6,3). Banda em 336 nm.

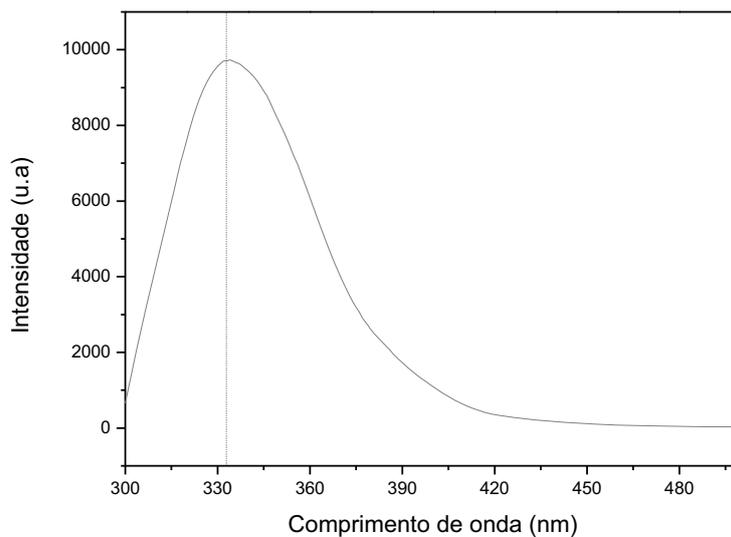


Figura 24: Espectro de fluorescência da solução INV 0,5 mg/mL (pH 5,3). Banda em 333 nm.

Os principais aminoácidos responsáveis pela emissão fluorescente são denominados fluoróforos, como por exemplo, o triptofano, que exibe emissão em 340 nm. Como já referido, mudanças conformacionais de tais fluoróforos, pH, solvente, dentre outros, podem influenciar as características do espectro de emissão das enzimas.

4.4.Crescimento dos Filmes PAH/GOx

Inicialmente, imobilizou-se cada enzima junto com o polieletrólito para, posteriormente, desenvolver arquiteturas mais complexas no desenvolvimento do biossensor. A seguir são apresentados os resultados referentes ao crescimento dos filmes (PAH/GOx)₁₀ⁱ preparado como já mencionado sob a deposição prévia do filme precursor de PAH/PVS. Bandas na região do ultravioleta no espectro de filmes contendo enzimas devem-se a transições eletrônicas principalmente nos aminoácidos triptofano e tirosina, assim como em solução, por volta de 280 nm. Entretanto, a interação da enzima com o polímero e a configuração do filme pode deslocar tal banda, como observado em 250 nm na Figura 25.

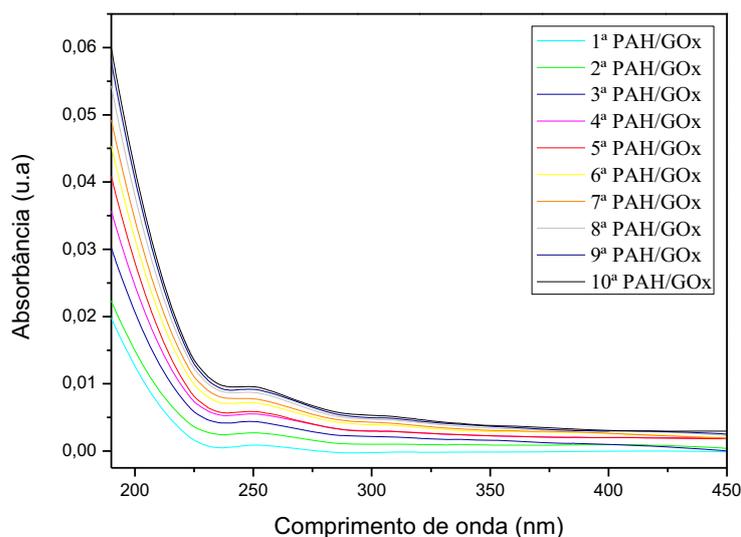


Figura 25: Espectro de absorção por camada do filme (PAH/GOx)₁₀.

Tomando a absorbância de cada bicamada para o comprimento de onda de 250 nm, é possível observar um perfil exponencial no crescimento do filme indicando que uma tendência à saturação a partir da décima bicamada, como ilustrado na Figura 26.

ⁱ Os números posteriores ao nome do filme indicam o número de bi, tri ou até mesmo tetra camadas de polieletrólito e enzima.

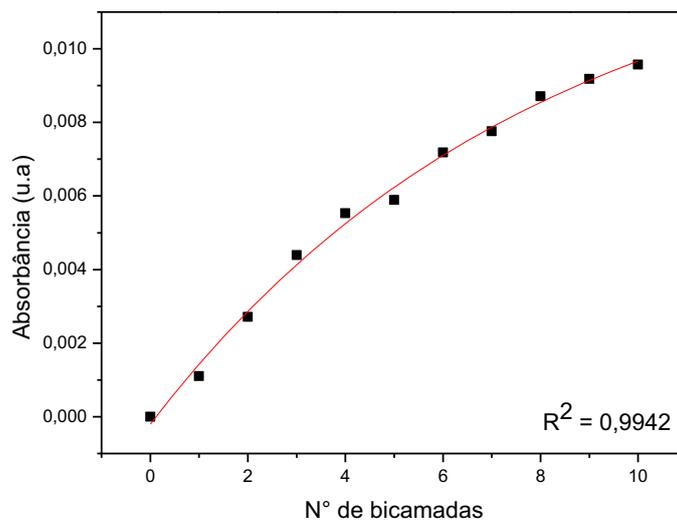


Figura 26: Absorbância em função do número de bicamadas do filme (PAH/GOx)₁₀ em $\lambda = 250$ nm.

4.5. Detecção amperométrica de glicose

Para a detecção de glicose foi utilizado um filme (PAH/GOx)₁₀ sobre ITO modificado com Azul da Prússia. Utilizou-se como solução eletrolítica tampão fosfato 10 mmol/L pH 6,3 e potencial de 0,0 V durante 200 s vs ECS. Após a estabilização da corrente elétrica, foram feitas adições de 100 μ L de glicose 10 mmol/L sob leve agitação, como mostra a Figura 27.

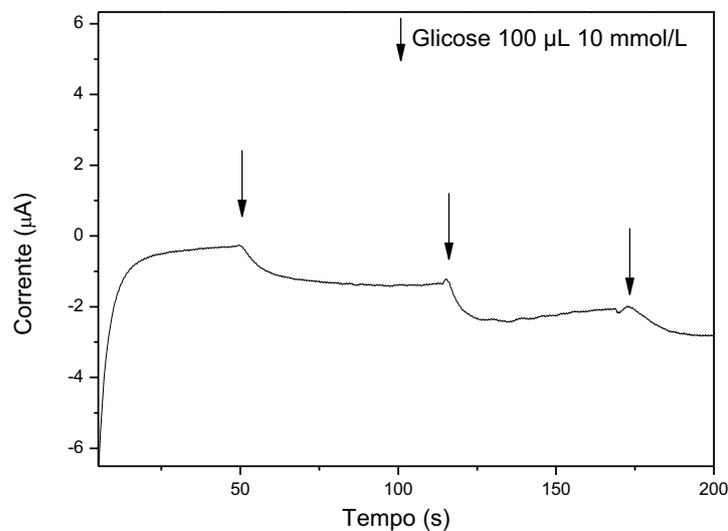


Figura 27: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/GOx)₁₀ 0,0 V vs ECS mediante adições de glicose.

O filme de Azul da Prússia reduz eletrocataliticamente H_2O_2 atuando como um mediador na transferência de elétron através de sua forma reduzida PW. O esquema abaixo ilustra um filme de Azul da Prússia eletrocatalisando H_2O_2 gerado por GOx. As variações de corrente elétrica da Figura 27 estão relacionadas à redução de H_2O_2 formado na reação enzimática entre a GOx e a glicose (Figura 28), o que permite afirmar que a GOx imobilizada na estrutura de filme possui considerável atividade enzimática mediante a adição do analito e o Azul da Prússia está apto a reduzir H_2O_2 .

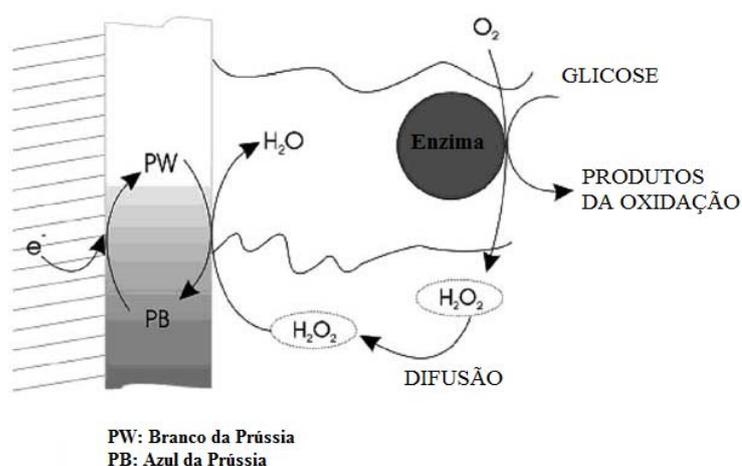


Figura 28: Detecção de H_2O_2 por PB em um sistema contendo GOx. Figura extraída de [15].

4.6. Cinética de crescimento do filme PAH/INV

Para o emprego da INV no desenvolvimento do biossensor, foram feitos filmes de PAH/INV. Os próximos resultados mostram a cinética de crescimento e adsorção deste filme. Para isso, foram depositadas inicialmente 2 bicamadas de PAH/PVS, como anteriormente descrito, seguida da deposição alternada de PAH/INV. Neste filme, variou-se o tempo de deposição da INV, inicialmente a cada 10 s, posteriormente de minuto a minuto, e em seguida a cada 3 min. A Figura 29 ilustra a cinética de crescimento do filme PAH/INV.

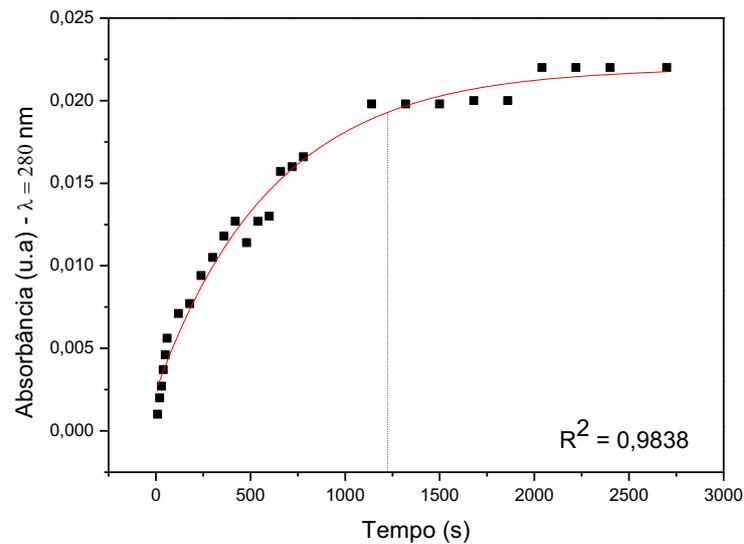


Figura 29: Cinética de crescimento na deposição PAH (3min)/ INV (tempos variáveis), para $\lambda = 280$ nm. Tempo ideal de deposição a partir de 20 min (1200 s).

Na Figura 29, é possível observar que a absorbância tende a valores constantes, ou seja, o crescimento atinge a saturação a partir de 20 min (1200s), sendo este tempo o ideal para a obtenção do filme PAH/INV.

4.7.Crescimento do filme PAH/INV

Empregando o tempo de 20 min obtido pela cinética descrita anteriormente, filmes de (PAH/INV)₁₀ foram preparados e os resultados do crescimento são mostrados nas Figuras 30 e 31. Para o filme PAH/INV, ilustrado a seguir, é possível observar uma banda em aproximadamente 226 nm.

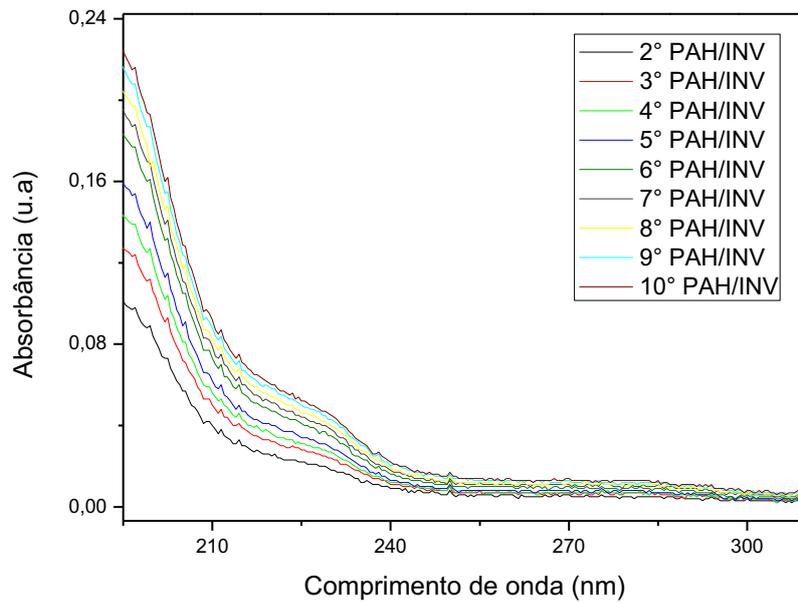


Figura 30: Espectros UV-vis do filme (PAH/INV)₁₀

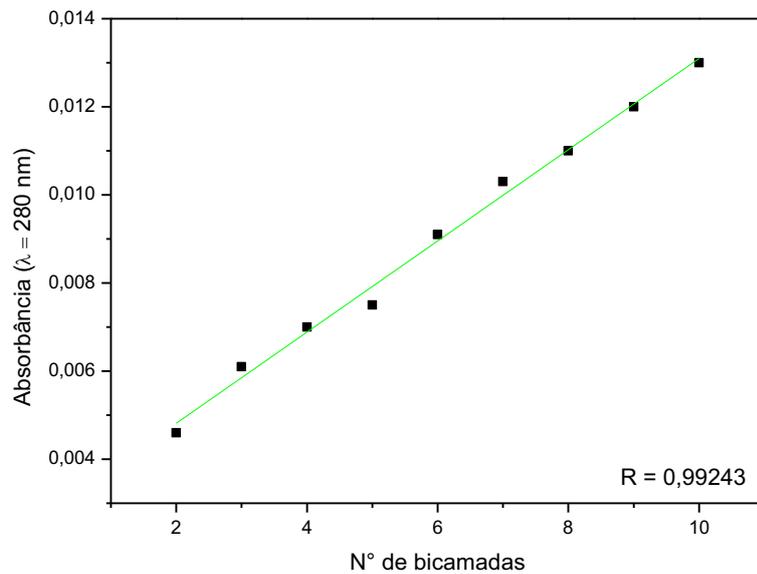


Figura 31: Absorbância em função do número de bicamadas do filme (PAH/INV)₁₀

Da Figura 31 observa-se um perfil linear de crescimento também para o filme PAH/INV, sugerindo que quantidades semelhantes de material são depositadas a cada etapa.

4.8. Detecção amperométrica de sacarose

A catálise enzimática da sacarose pela INV não gera nenhum produto eletroativo e necessita a utilização conjunta de GOx no desenvolvimento do biossensor. Todavia, como medida preliminar, empregou-se o sistema ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ como eletrodo de trabalho, tampão acetato 10 mmol/L pH 5,3 como solução eletrolítica e adicionou-se ao sistema 500 μ L de solução de GOx (0,5 mg/mL) no mesmo tampão para a produção de H₂O₂ para verificar a atividade enzimática da INV imobilizada.

A Figura 32 ilustra a curva amperométrica obtida a 0,0 V (*vs* ECS) para o sistema ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ com GOx presente no meio. Adições de 100 μ L de sacarose 10 mmol/L foram feitas, sob leve agitação, conforme indicam as setas. Ressalta-se que há uma diminuição no valor da corrente em relação ao valor inicial.

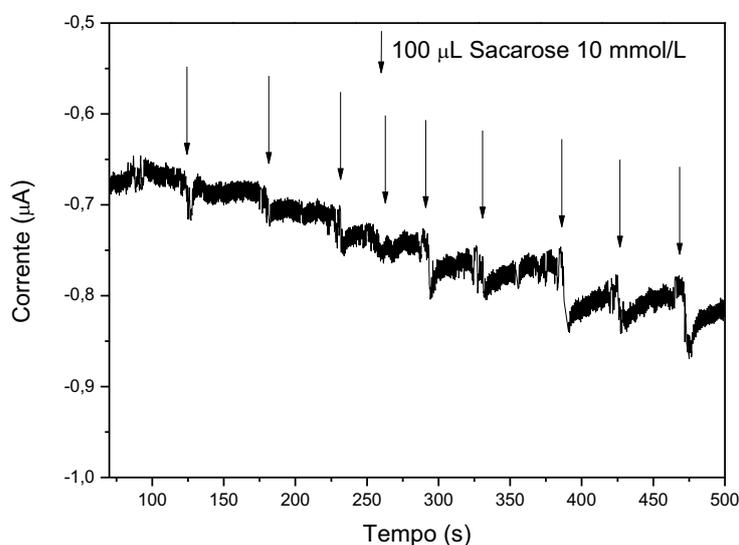


Figura 32: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ (0,0 V *vs* ECS) com 500 μ L de GOx em solução mediante adições sucessivas de sacarose.

A Figura 33 ilustra adições de sacarose em um sistema ITO/PB (ausente do filme PAH/INV), contendo GOx em solução, nas mesmas condições do resultado anterior. Não se observa mudança do valor de corrente elétrica, o que corrobora a explicação antes

mencionada que tal alteração se deva a catálise de sacarose pela INV, gerando α -D-glicose, seguida da catálise desta por GOx, produzindo o H_2O_2 .

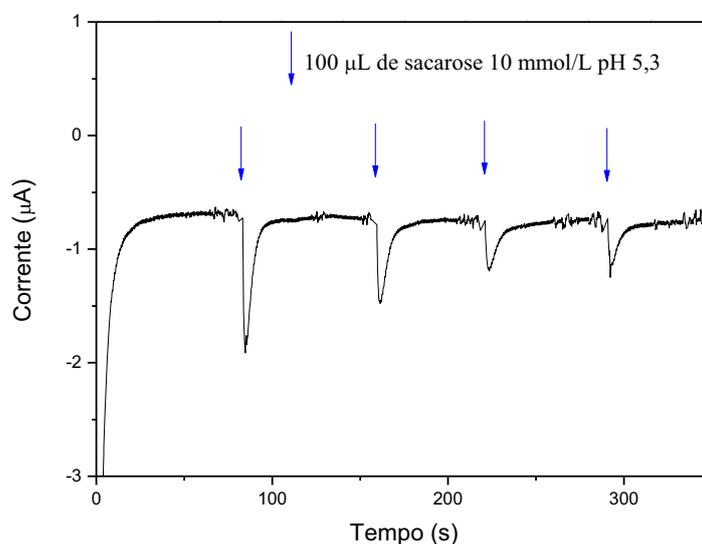


Figura 33: Curva amperométrica de ITO/PB (0,0 V vs ECS) com 500 μ L de GOx 0,5 mg/mL em pH 5,3 na solução eletrolítica mediante adições de sacarose.

A fim de comprovar que a resposta obtida na Figura 32 era devida apenas à presença de sacarose e não do tampão, este foi adicionado aos sistemas ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ com e sem GOx em solução, além do sistema contendo apenas o eletrodo modificado ITO/PB. As Figuras 34, 35 e 36 ilustram estes procedimentos.

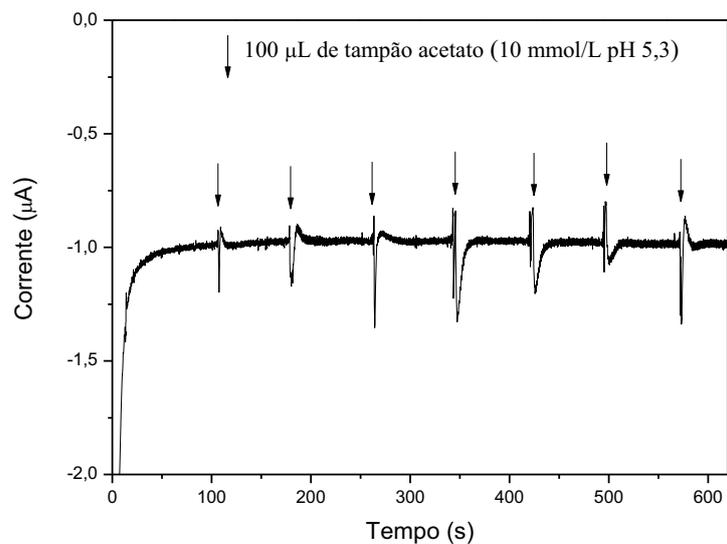


Figura 34: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ (0,0 V vs ECS) com 500 μL de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução.

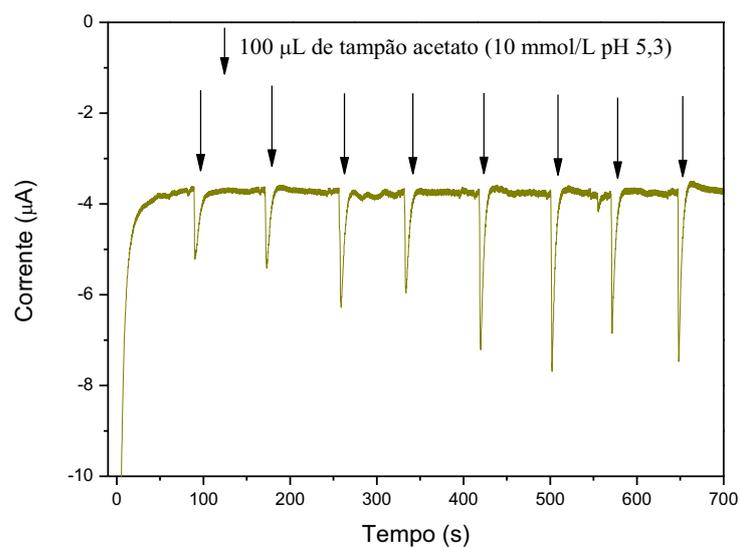


Figura 35: Curva amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ (0,0 V vs ECS) mediante adições de tampão acetato pH 5,3 10 mmol/L

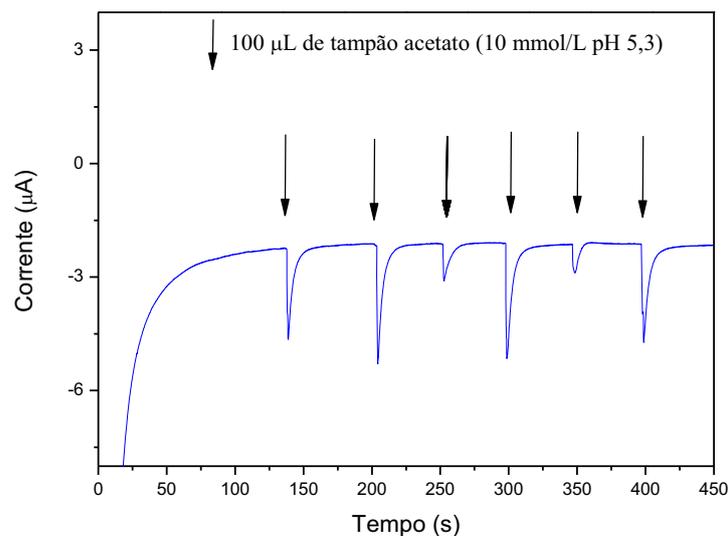


Figura 36: Curva amperométrica de ITO/PB mediante a adição de tampão acetato pH 5,3 10 mmol/L.

Dos resultados obtidos, acredita-se que os picos não estão relacionados às interações entre o tampão e o filme, mas sim a uma provável perturbação do meio de detecção, como rearranjo da dupla camada elétrica na interface do eletrodo, uma vez que o volume da célula eletroquímica é muito pequena (5-7 mL).

4.9.Crescimento do filme PAH/GOX/PAH/INV

Comprovada as atividades de GOx e INV quando imobilizadas com o polieletrólito, diversas montagens com ambas as enzimas foram estudadas a fim de determinar a melhor configuração dos filmes para a otimização do biossensor.

O primeiro sistema consistia de filmes de PAH/GOx/PAH/INV com 10 tetracamadas sob as condições de deposição já mencionadas. Os próximos resultados (Figuras 37 a 40) correspondem ao estudo do crescimento destes filmes acompanhados por espectroscopia UV-vis e fluorescência.

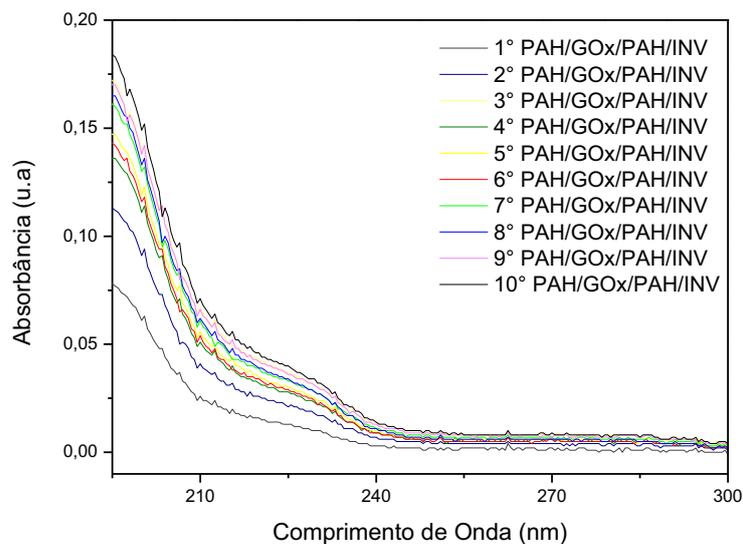


Figura 37: Espectros UV-vis do filme (PAH/GOx/PAH/INV)₁₀.

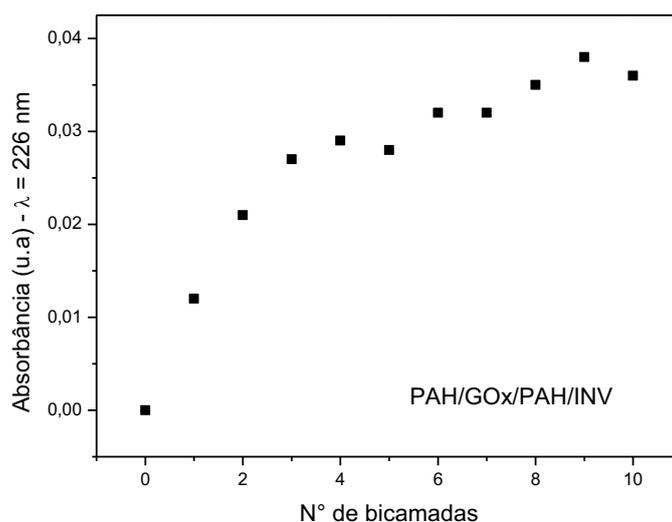


Figura 38: Crescimento do filme (PAH/GOx/PAH/INV)₁₀ em $\lambda = 226$ nm.

As Figuras 37 e 38, mostradas anteriormente, indicam um perfil de crescimento não muito satisfatório para esta configuração de filme. Logo, acompanhou-se o crescimento também por medidas de fluorescência.

As Figuras 39 e 40 ilustram os espectros de fluorescência e a curva de crescimento obtidos para o sistema PAH/GOx/PAH/INV.

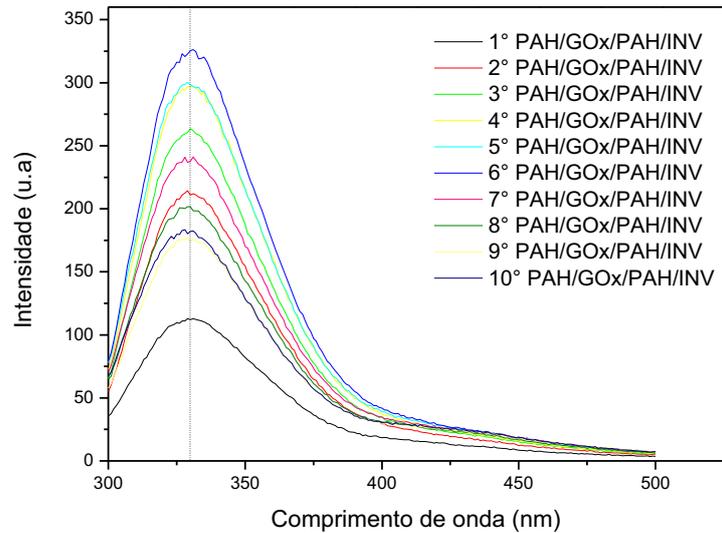


Figura 39: Espectros de fluorescência do filme PAH/GOx/PAH/INV. Banda em 330 nm.

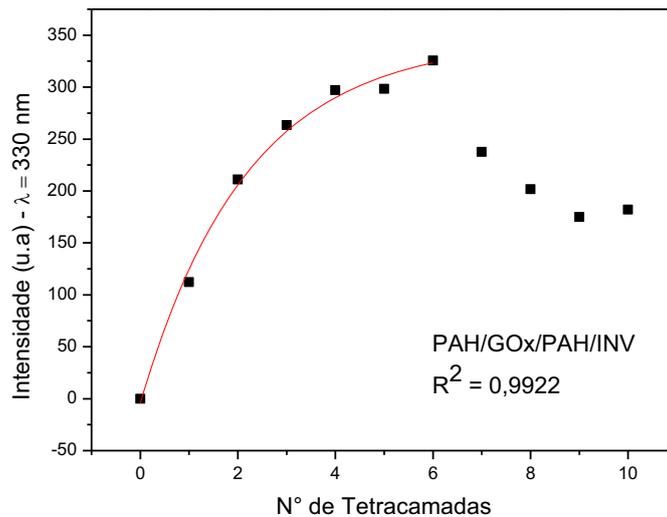


Figura 40: Crescimento do filme PAH/GOx/PAH/INV analisado por espectroscopia de fluorescência.

Na Figura 40 é possível observar um perfil exponencial da intensidade radiante até a sexta tetracamada seguida de uma queda nos valores. Este resultado mostra que processos de desorção podem ocorrer a partir deste ponto, uma vez que, nesta configuração um filme em sua sexta etapa de deposição possui muitas camadas de materiais antecessoras, diminuindo a interação das camadas posteriores (7ª adiante) com o substrato devido ao aumento da distância entre estes. Logo, através das técnicas de espectroscopia UV-vis e fluorescência, não

foi possível obter bons resultados acerca do crescimento destes filmes, levando a investigações de outras arquiteturas.

4.10. Crescimento do filme (PAH/GOx)/(PAH/INV)

Nesta configuração, 3 bicamadas de PAH/GOx iniciais e 7 bicamadas de PAH/INV posteriores foram immobilizadas na obtenção da arquitetura final (PAH/GOx)₃/(PAH/INV)₇. As proporções foram escolhidas totalizando 10 bicamadas e de modo a possuir mais invertase do que glicose oxidase uma vez que o substrato de GOx será a glicose produzida na catálise da sacarose pela INV. A Figura 41 ilustra os espectros UV-vis do filme (PAH/GOx)₃/(PAH/INV)₇.

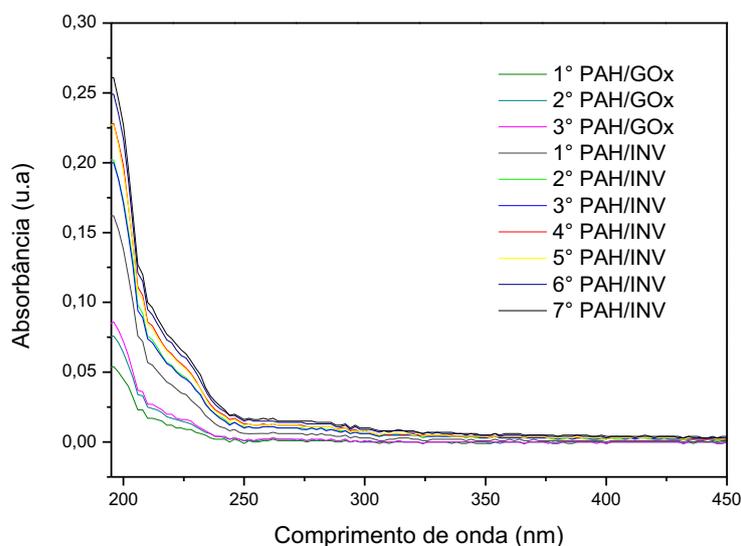


Figura 41: Espectros UV-vis do filme (PAH/GOx)₃/(PAH/INV)₇.

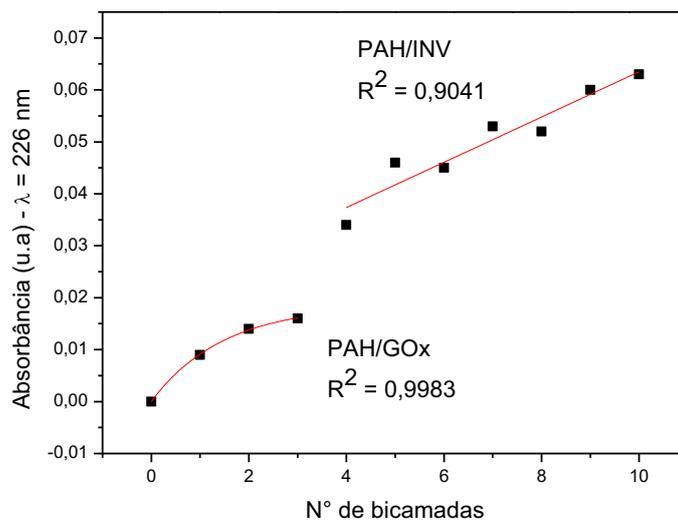


Figura 42: Crescimento do filme (PAH/GOx)₃/(PAH/INV)₇ para $\lambda = 226$ nm.

Na figura 42, observa-se perfis exponencial e linear para o filmes PAH/GOx e PAH/INV respectivamente. Nota-se uma diferença na absorvância da última bicamada de PAH/GOx para a primeira bicamada PAH/INV, indicando maior absorção de luz por INV.

4.11. Crescimento do filme PAH/GOX/INV

As Figuras 43 e 44 ilustram, respectivamente, o espectro UV-vis e o crescimento do filme PAH/GOx/INV, produzido nas condições já mencionadas.

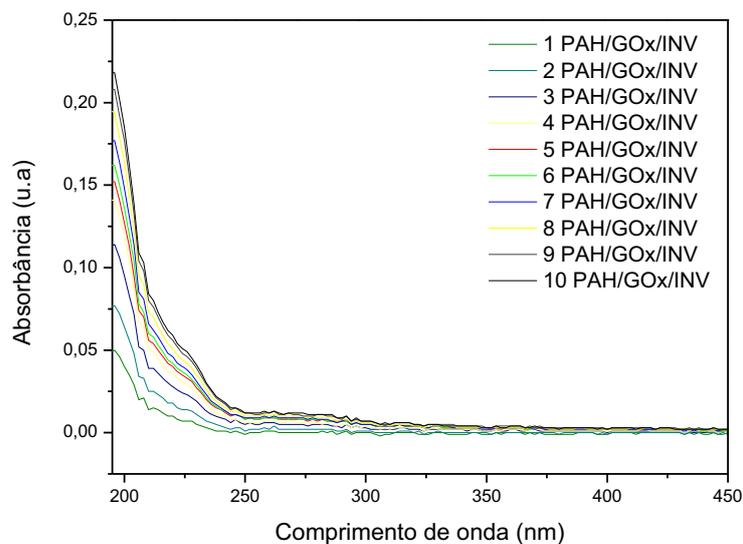


Figura 43: Espectros UV-vis do filme PAH/GOx/INV.

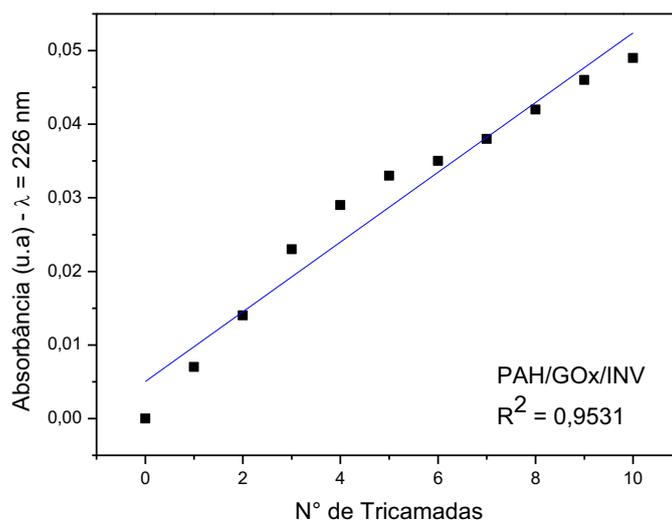


Figura 44: Crescimento do filme PAH/GOx/INV em 226 nm.

Nas condições de deposição, acima do ponto isoelétrico, as enzimas possuem carga negativa, logo o crescimento deste filme em relação à adsorção de INV sobre GOx não se baseia em interação eletrostática. O crescimento desta camada pode estar sendo regido por meio de ligações secundárias destacando as ligações de hidrogênio entre as enzimas. Observa-

se ainda que entre as tricamadas 3 e 5 há um desvio da curva, indicando possível rearranjo da organização do filme.

4.12. Crescimento dos filmes PAH/(GOX + INV)

Misturas das soluções de GOx e INV, em pH 6,3 e 5,3, foram feitas a fim de investigar a possibilidade de imobilizar ambas, juntamente com o PAH, em uma arquitetura diferente. A seguir, as Figuras 45 e 47 ilustram o espectro de absorção de filmes PAH/(GOx + INV) preparados nas condições pH 6,3 e pH 5,3 respectivamente. O crescimento de cada um destes filmes está ilustrado nas Figuras 46 e 48.

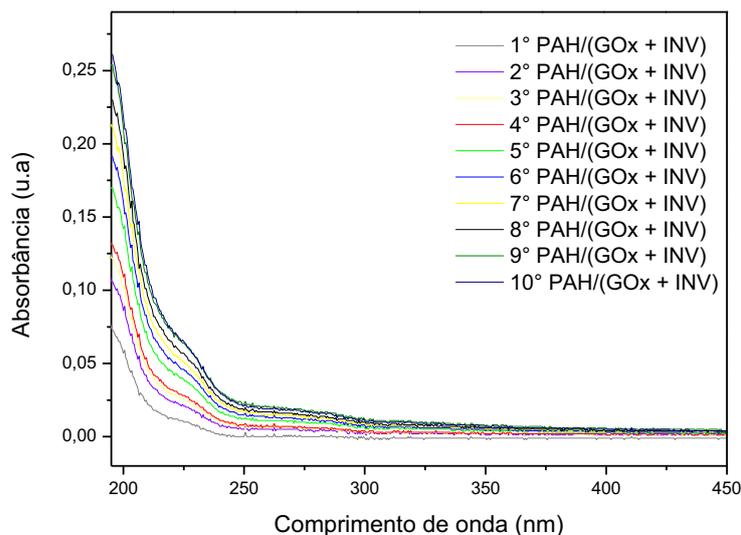


Figura 45: Espectros UV-vis do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 6,3.

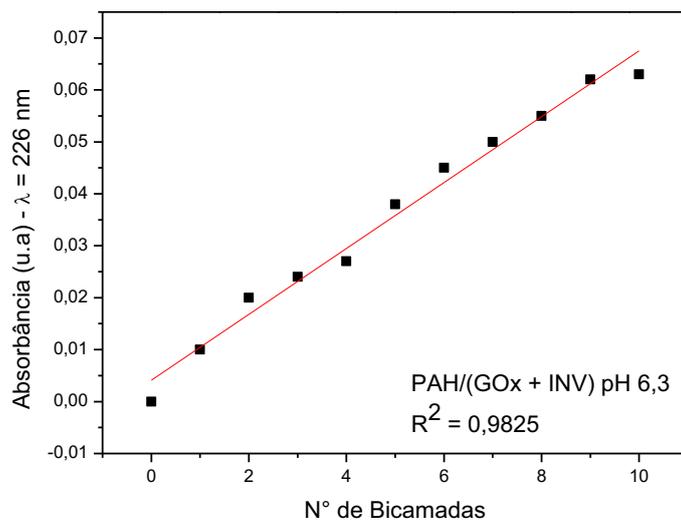


Figura 46: Crescimento do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 6,3.

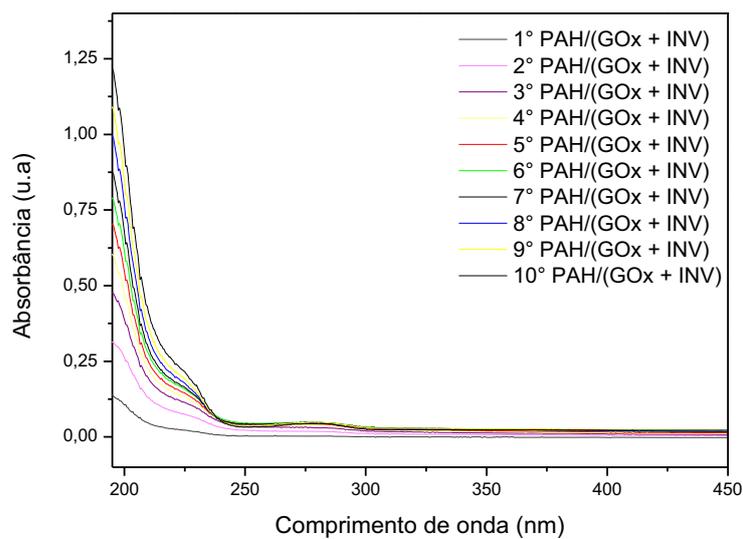


Figura 47: Espectros UV-vis do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.

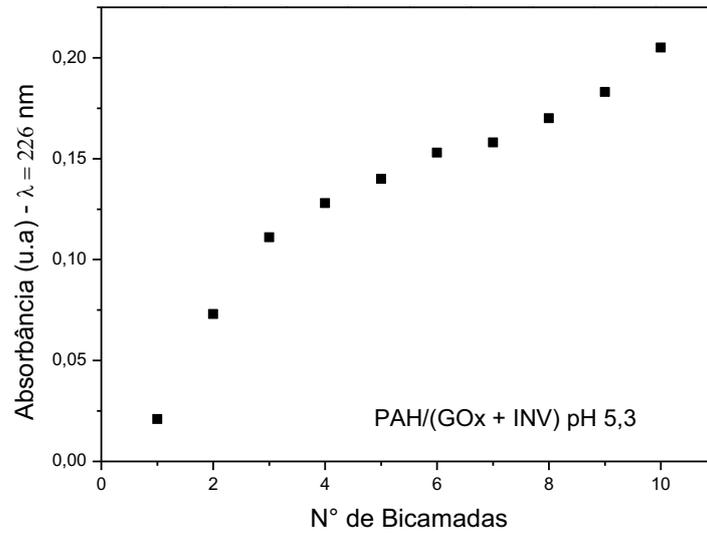


Figura 48: Crescimento do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.

Os filmes PAH/(GOx + INV) foram analisados também por espectroscopia de fluorescência, e os resultados estão ilustrados pelas Figuras 49 e 50 abaixo.

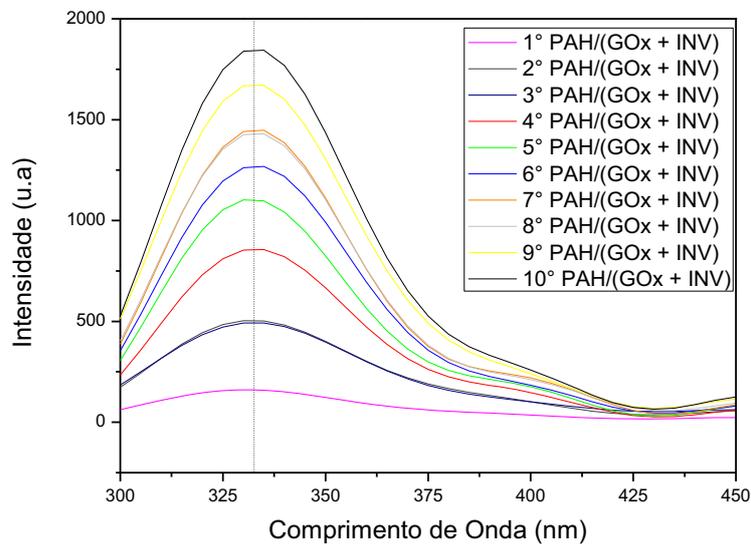


Figura 49: Espectros de emissão do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3. Excitação em 280 nm e banda de emissão em 333 nm.

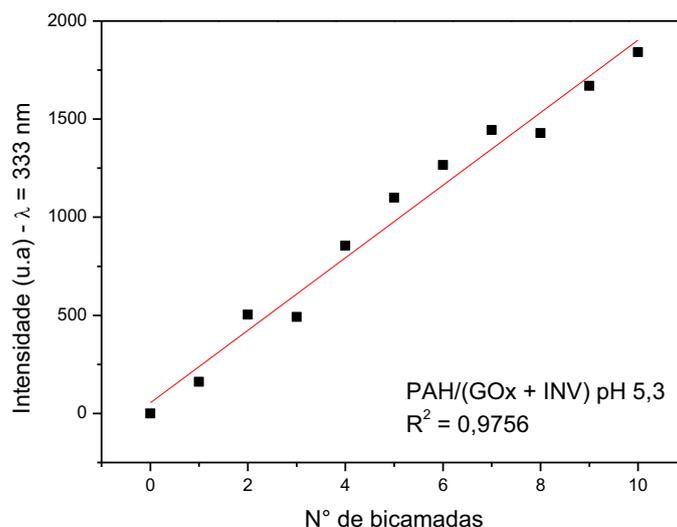


Figura 50: Crescimento por fluorescência do filme PAH/(GOx + INV) preparado em pH 5,3.

Através dos gráficos de crescimento (Figuras 46 e 48) pôde-se observar que os filmes apresentaram bom crescimento podendo ser empregados no biossensor. O filme preparado em pH 5,3 exibe uma curva de crescimento onde acredita-se haver também um rearranjo das camadas do filme (Figura 48).

Observou-se ainda um bom crescimento do filme preparado em pH 5,3 por espectroscopia de fluorescência (Figuras 49 e 50), o que não foi possível para o filme preparado em pH 6,3 (resultado não mostrado).

4.13. Avaliação da resposta do biossensor

Após investigados os crescimentos de filmes com diferentes arquiteturas, empregou-se algumas destas na produção do biossensor para a avaliação da resposta deste mediante adições de glicose e sacarose.

Dentre as arquiteturas investigadas, as que apresentaram os filmes contendo misturas das soluções enzimáticas se mostraram os mais interessantes pelo bom crescimento apresentado, principalmente aquela preparada em pH 5,3, sendo assim, preferidos.

Os gráficos a seguir são da resposta amperométrica dos biossensores ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 6,3 e ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 mediante adições de glicose e sacarose, sob leve agitação.

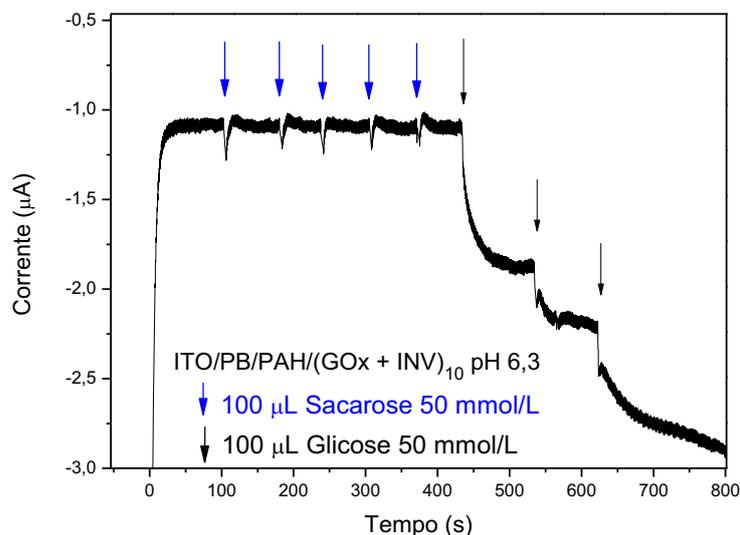


Figura 51: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 6,3 mediante adições de glicose e sacarose.

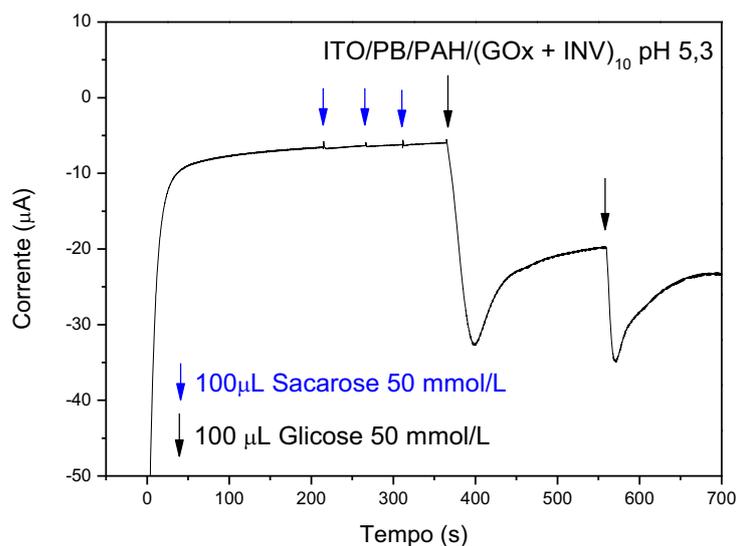


Figura 52: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 mediante adições de glicose e sacarose.

Os sistemas produzidos em pH 6,3 e pH 5,3 (Figuras 51 e 52) mostraram-se sensíveis apenas a adição de glicose. Para tentar solucionar o problema e garantir uma maior quantidade de INV em relação à GOx testou-se o sistema com a mistura das soluções em pH 5,3 nas concentrações de 5 mg/mL de GOx e 1 mg/mL de INV na construção do filme, como ilustra a figura abaixo.

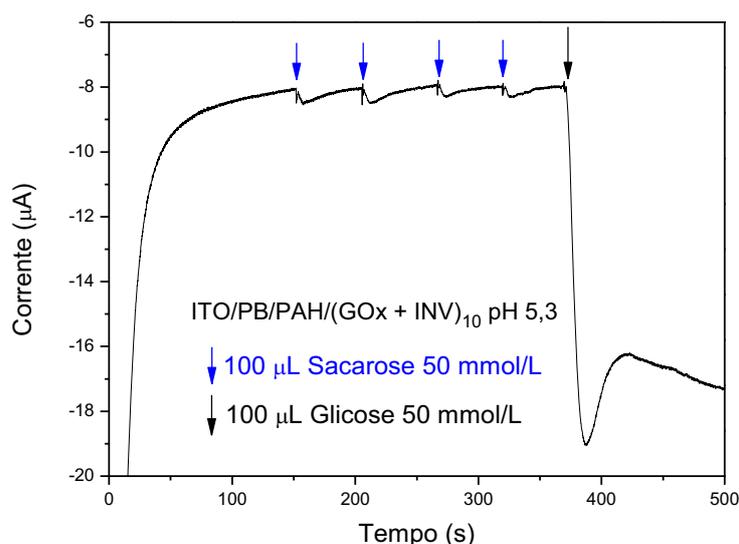


Figura 53: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) do sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3. Solução da mistura: GOx (5 mg/mL) e INV (1 mg/mL).

Como se pode observar, os sistemas ITO/PB/PAH(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 e pH 6,3 não respondem às adições de sacarose, apenas a adições de glicose. Podem ser consideradas as seguintes possibilidades: de que a INV esteja sofrendo mudanças conformacionais quando imobilizada junto com GOx e, portanto, perde a atividade, não gerando α -glicose para a seguinte catálise de GOx; de que, sabida que a atividade de GOx para α -D-glicose é muito menor do que para a β -D-glicose, quando imobilizada nesta configuração a atividade de GOx é perdida para com esta^j; ou ainda, uma vez que tal atividade é baixa, assim como a quantidade de GOx que é imobilizada, o sinal produzido pode ser muito pequeno, estando

^j No teste de atividade de GOx para com α -D-glicose, a enzima estava “livre”, sendo que em condições de temperatura e pH, a enzima livre possui 100% de atividade para com seu substrato.

abaixo da capacidade de detecção da técnica. Logo, a fim de solucionar os possíveis problemas, investigou-se o emprego da enzima mutarrotase (MUT).

Os resultados que se seguem são acerca da utilização da enzima mutarrotase (MUT) para a detecção de glicose e sacarose, no sentido de contornar o problema referente a baixa atividade de GOx para α -D-glicose. Entretanto, no decorrer do trabalho, a quantidade de glicose oxidase se esgotou, e segundo o fornecedor, não era mais comercializada com a mesma quantidade de unidades por miligrama. Utilizou-se então, para os resultados que se seguem, glicose oxidase da marca Fluka 118 U/mg.

No que diz respeito aos testes envolvendo a enzima mutarrotase, testou-se o sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 envolvendo MUT em solução, preparadas em tampão fosfato 10 mmol/L e pH 7,2, uma vez que o ótimo de atividade da mutarrotase está próximo a pH 7,4. Duas concentrações distintas de MUT (0,2 mg/mL e 2 mg/mL) foram testadas e os resultados estão ilustrados nas Figuras 54 e 55.

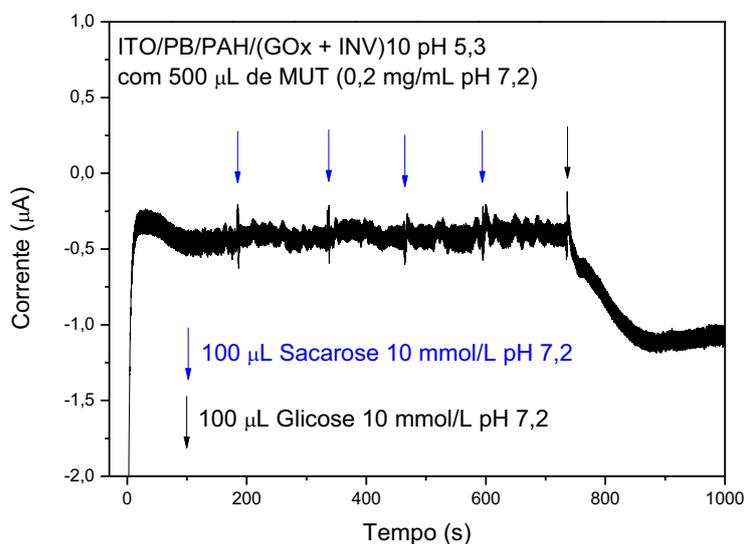


Figura 54: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ pH 5,3 com 500 µL de MUT 0,2 mg/mL pH 7, 2 em solução. Eletrólito: Tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,2.

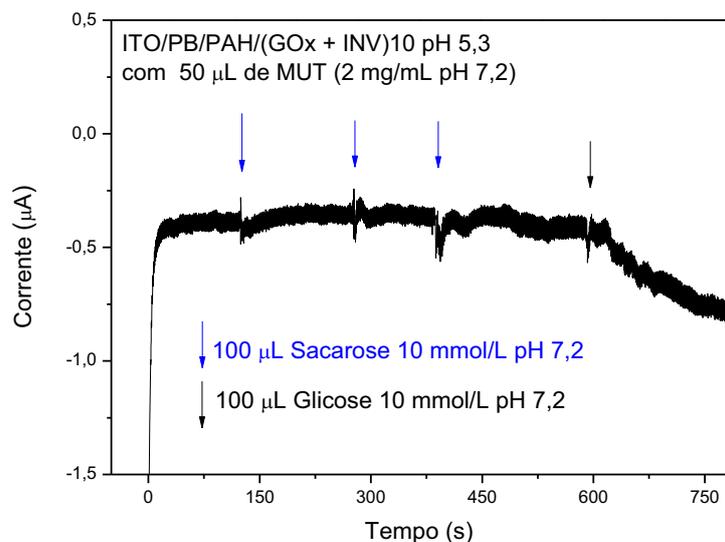


Figura 55: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ pH 5,3 com 50 µL de MUT 2 mg/mL pH 7,2 em solução. Solução eletrolítica: Tampão fosfato 10 mmol/L pH 7,2.

Dos resultados mostrados nas Figuras 54 e 55, não se observa mudanças de corrente devido a adições de sacarose ao sistema contendo escolhido ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 e mutarrotase em solução. É possível que a velocidade do processo de mutarrotação seja lenta de tal maneira que não é possível observar mudanças de corrente no intervalo de tempo investigado.

5.14 Teste em bebidas comerciais

Devido o sistema escolhido como configuração do biossensor ITO/PB/PAH/(GOx + INV)₁₀ em pH 5,3 não apresentar resposta mediante a adição de sacarose, optou-se por testar a adição de alíquotas de sucos comerciais, utilizando o filme PAH/INV com GOx presente na solução eletrolítica, uma vez que está foi a única configuração que apresentou mudanças de corrente elétrica decorrentes da adição de sacarose (Figura 32). Para isso utilizou-se o filme referido com 10 bicamadas e 500 µL de GOx a 0,5 mg/mL em pH 5,3 junto a solução eletrolítica de tampão acetato 10 mmol/L pH 5,3.

Utilizaram-se sucos comerciais de dois sabores uva e uva *light* de uma dada marca. Através de amperometria a 0,0 V em relação ao ECS, foram feitas adições de 100 μL de uma solução de suco diluída. Para tal, fora diluído 100 μL de suco puro em 900 μL de tampão acetato 10 mmol/L e pH 5,3.

As figuras a seguir ilustram respectivamente a resposta amperométrica de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ e ITO/PB com e sem GOx em solução, mediante adições de solução de suco de uva.

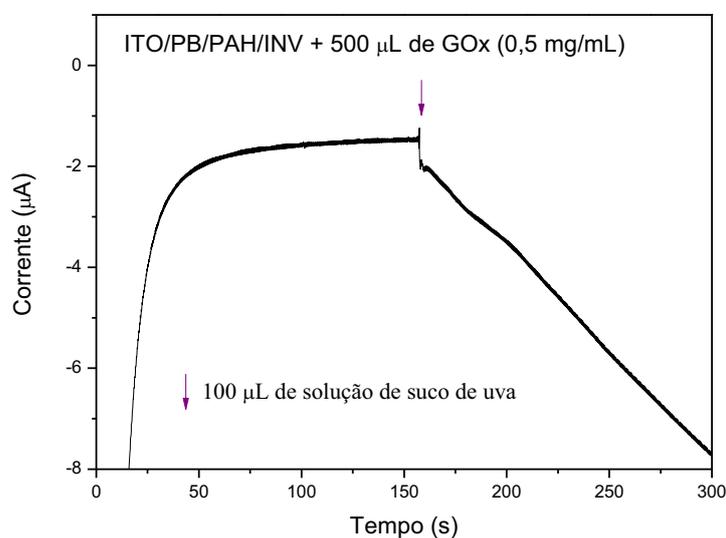


Figura 56: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ com 500 μL de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução. Adições de solução de suco de uva.

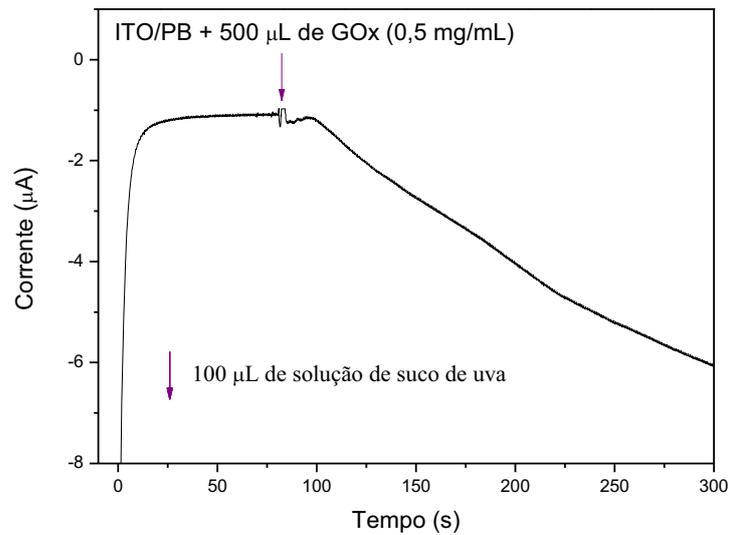


Figura 57: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB com 500 μL de GOx 0,5 mg/mL pH 5,3 em solução. Adição de solução de suco de uva.

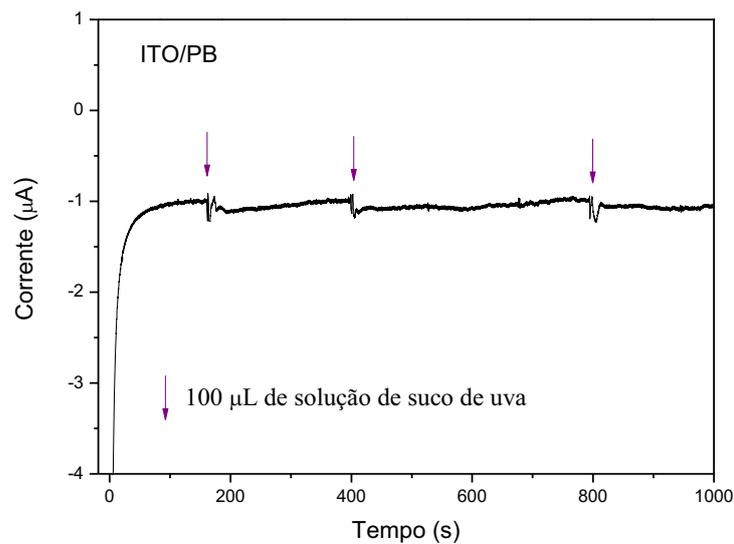


Figura 58: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB sem GOx. Adições de solução de suco de uva.

Destes resultados nota-se que nos sistemas contendo GOx em solução, independente da presença de INV ou não, uma grande queda de corrente é verificada, o que não acontece para o sistema contendo apenas o eletrodo modificado (Figura 58). Uma vez que o principal substrato de GOx é a glicose, acredita-se que queda de corrente registrada deva-se a uma grande presença de glicose no suco de uva desta marca.

Para esta mesma marca, testou-se ainda o suco de uva *light*, onde as Figuras 59, 60 e 61, ilustram os resultados obtidos.

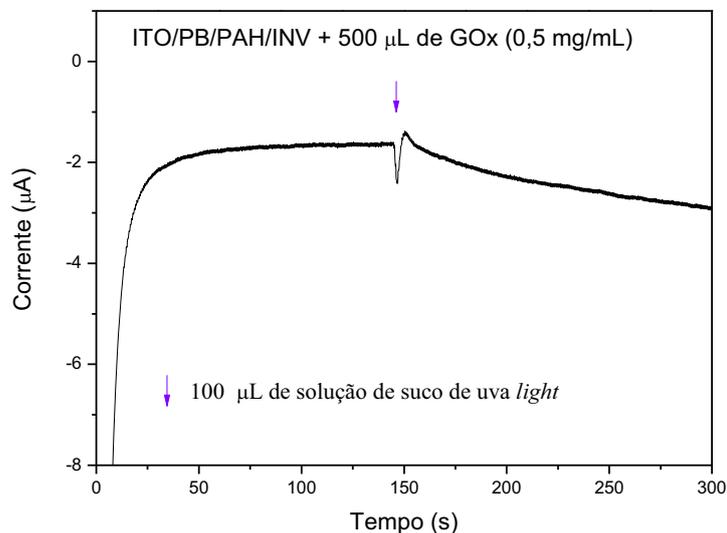


Figura 59: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL em solução. Adições de solução de suco de uva *light*.

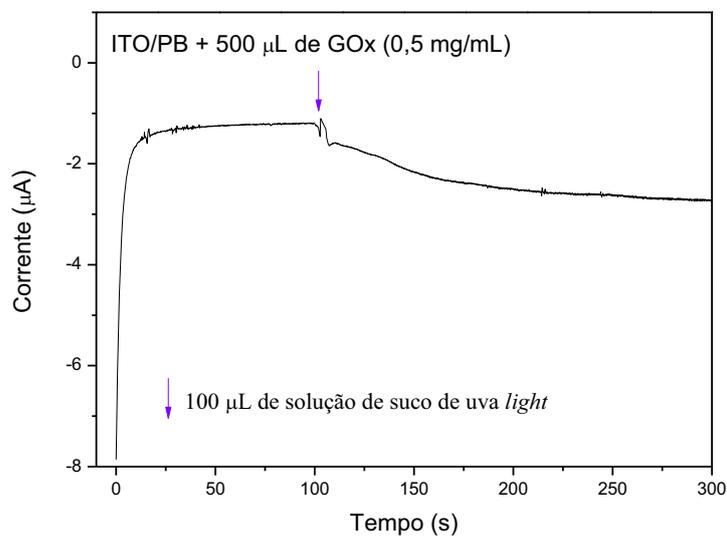


Figura 60: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) de ITO/PB com 500 µL de GOx 0,5 mg/mL em solução. Adições de solução de suco de uva *light*.

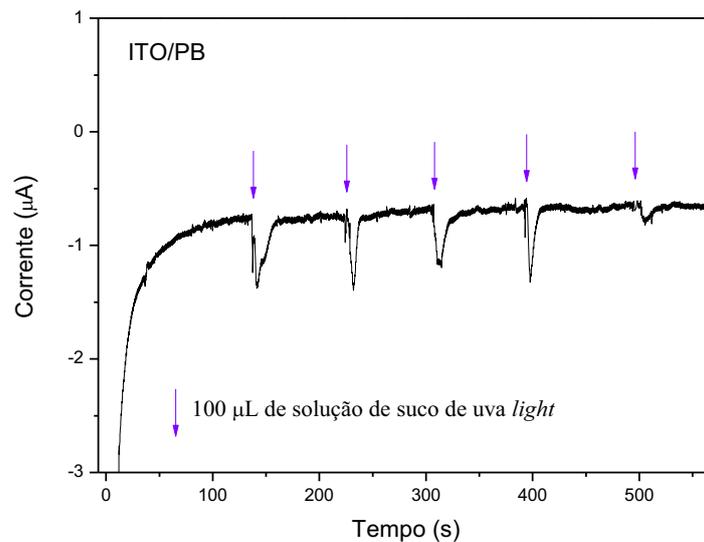


Figura 61: Resposta amperométrica (0,0 V vs ECS) ITO/PB sem GOx. Adições de solução de suco de uva *light*.

Da mesma forma como para adições de suco de uva, para o suco de uva *light*, há uma grande queda de corrente apenas para os sistemas que contem GOx em solução, logo se atribui tal resposta a uma forte presença de glicose em sua composição.

Uma rápida comparação entre as Figuras 56 e 59, que consistem respectivamente de amperometrias contendo o sistema ITO/PB/(PAH/INV)₁₀ com GOx em solução mediante adições de suco de uva convencional e *light*, tem-se para um intervalo qualquer de medida, uma variação de corrente maior para o suco convencional. Como discutido anteriormente, se a queda de corrente observada para estes dois tipos de suco estiver relacionada principalmente à presença de glicose, a diferença de corrente mencionada indica uma menor presença de glicose no suco de uva *light*, o que lhe confere tal característica.

Por fim, conclui-se, que uma análise mais elaborada da concentração de glicose e sacarose em bebidas comerciais é um tanto complexo, uma vez que estes sucos possuem diversos componentes em sua composição, inclusive possíveis interferentes.

Capítulo 5

5. Considerações Finais

5.1. Conclusões

Através dos resultados apresentados, conclui-se que é possível construir filmes LbL de maneira efetiva, de PAH junto com as enzimas GOx e INV em diversas arquiteturas visando o desenvolvimento do biossensor. Conclui-se ainda que as enzimas exibem atividade quando imobilizadas individualmente e utilizando eletrodos modificados com Azul da Prússia é possível detectar amperometricamente glicose e sacarose.

A melhor configuração de biossensor é o sistema ITO/PB/PAH/(GOx + INV) preparado com a mistura das enzimas em pH 5,3, pois o filme apresenta um bom crescimento e altos índices de absorbância, sugerindo que ambas enzimas estão imobilizadas; entretanto, nesta configuração o sistema responde apenas à glicose. A ausência de resposta em relação à sacarose pode estar relacionada à perda de atividade de INV quando imobilizada junto a GOx, à baixa atividade de GOx para α -D-glicose, gerada na catálise de sacarose, reduzindo-se ainda mais quando imobilizada na forma de filme, ou ainda, do fato desta mesma baixa atividade de GOx não produzir resposta suficientemente detectável, uma vez que a quantidade de enzima que é imobilizada em filme é muito pequena.

Para os testes envolvendo amostras reais, isto é sucos, utilizou-se o sistema ITO/PB/PAH/INV com GOx em solução, uma vez que este fora o único sistema apto a detectar a presença de sacarose.

Estes testes sugerem fortemente a presença de glicose, devido as grandes variações de corrente elétrica observadas, comportamento observado em todos os sistema no qual fora adicionada glicose, uma vez que esta é o principal substrato para glicose oxidase. Entretanto,

sua quantificação, nesse momento é difícil, uma vez que os sucos são amostras complexas podendo possuir uma série de compostos interferentes a este tipo de medida.

Por fim, muitos dos objetivos deste trabalho foram alcançados, principalmente em relação a fabricação e caracterização de filmes contendo glicose oxidase e invertase, além do emprego destes filmes na detecção de glicose e sacarose, embora não simultânea.

5.2.Perspectivas

Diversos métodos ou materiais podem ser empregados no aprimoramento do biossensor aqui descrito. Como o desenvolvimento de novas arquiteturas, ou até mesmo a utilização de outro polieletrólito, como o poli(etileno imina) PEI, na fabricação dos filmes. Ressalta-se ainda a possibilidade de realizar medidas amperométricas em fluxo. Destaca-se também a possibilidade de incorporar as enzimas em camadas lipídicas, para maior conservação da atividade enzimática, para o desenvolvimento do biossensor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ariga, K.; Hill, J. P.; Ji, Q. M., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007**, 9 (19), 2319-2340.
- [2] Schulz, P. A. B., *Física na Escola* **2005**, 6 (1), 58-62.
- [3] Duran, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. *Nanotecnologia*, São Paulo, Artiber Editor, **2006**.
- [4] Decher, G., *Science* **1997**, 277 (5330), 1232-1237.
- [5] Tang, Z. Y.; Wang, Y.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A., *Advanced Materials* **2006**, 18 (24), 3203-3224.
- [6] Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Voros, J.; Reimhult, E., *Sensors* **2008**, 8 (3), 1400-1458.
- [7] Dzyadevych, S. V.; Arkhypova, V. N.; Soldatkin, A. P.; El'skaya, A. V.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N., *Irbm* **2008**, 29 (2-3), 171-180.
- [8] Davis, J.; Vaughan, D. H.; Cardosi, M. F., *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, 17 (12), 1030-1035.
- [9] Ziegler, C.; Gopel, W., *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, 2 (5), 585-591.
- [10] Habermuller, L.; Mosbach, M.; Schuhmann, W., *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 366 (6-7), 560-568.
- [11] Chaubey, A.; Malhotra, B. D., *Biosensors & Bioelectronics* **2002**, 17 (6-7), 441-456.
- [12] Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y., *Biosensors & Bioelectronics* **2000**, 15 (5-6), 273-282.
- [13] Chaniotakis, N. A., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, 378 (1), 89-95.
- [14] Pereira, A. C.; Santos, A. D.; Kubota, L. T., *Química Nova* **2002**, 25 (6A), 1012-1021.
- [15] Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira, O. N.; de Torresi, S. I. C., *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 19 (12), 1611-1615.
- [16] Zou, Y. J.; Xian, C. L.; Sun, L. X.; Xu, F., *Electrochimica Acta* **2008**, 53 (12), 4089-4095.
- [17] Wu, B. Y.; Hou, S. H.; Yin, F.; Zhao, Z. X.; Wang, Y. Y.; Wang, X. S.; Chen, Q., *Biosensors & Bioelectronics* **2007**, 22 (12), 2854-2860.
- [18] Mohammadi, H.; Amine, A.; Cosnier, S.; Mousty, C., *Analytica Chimica Acta* **2005**, 543 (1-2), 143-149.
- [19] Mizutani, F.; Yabuki, S., *Biosensors & Bioelectronics* **1997**, 12 (9-10), 1013-1020.
- [20] Gulce, H.; Celebi, S. S.; Ozyoruk, H.; Yildiz, A., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995**, 397 (1-2), 217-223.
- [21] Surareungchai, W.; Worasing, S.; Sritongkum, P.; Tanticharoen, M.; Kirtikara, K., *Analytica Chimica Acta* **1999**, 380 (1), 7-15.
- [22] Majer-Baranyi, K.; Adanyi, N.; Varadi, M., *European Food Research and Technology* **2008**, 228 (1), 139-144.
- [23] Haghghi, B.; Varma, S.; Alizadeh, F. M.; Yigzaw, Y.; Gorton, L., *Talanta* **2004**, 64 (1), 3-12.
- [24] Trivedi, U. B.; Lakshminarayana, D.; Kothari, I. L.; Patel, P. B.; Panchal, C. J., *Sensors and Actuators B-Chemical* **2009**, 136 (1), 45-51.
- [25] Arya, S. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D., *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, 23 (7), 1083-1100.
- [26] Moraes, M. L.; Rodrigues, U. P.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M., *Journal of Solid State Electrochemistry* **2007**, 11 (11), 1489-1495.
- [27] Mak, W. C.; Ng, Y. M.; Chan, C. Y.; Kwong, W. K.; Renneberg, R., *Biosensors & Bioelectronics* **2004**, 19 (9), 1029-1035.
- [28] Zhao, W.; Xu, J. J.; Chen, H. Y., *Electroanalysis* **2006**, 18 (18), 1737-1748.
- [29] Belluzo, M. S.; Ribone, M. E.; Lagier, C. M., *Sensors* **2008**, 8 (3), 1366-1399.
- [30] Ricci, F.; Palleschi, G., *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 21 (3), 389-407.
- [31] Luong, J. H. T.; Male, K. B.; Glennon, J. D., *Biotechnology Advances* **2008**, 26 (5), 492-500.
- [32] Yellow Spring Instruments <<http://www.ysilifesciences.com>> Acesado em 19 de Janeiro de 2010.
- [33] White, J. S.; *Source Book of Enzymes*, 1ª Ed, Editora CRC, **1997**.
- [34] Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*. 4ªEd, São Paulo, Sarvier Editora, **2006**.
- [35] Bayramoglu, G.; Akgol, S.; Bulut, A.; Denizli, A.; Arica, M. Y., *Biochemical Engineering Journal* **2003**, 14 (2), 117-126.
- [36] Bankar, S. B.; Bule, M. V.; Singhal, R. S.; Ananthanarayan, L., *Biotechnology Advances* **2009**, 27 (4), 489-501.
- [37] Leskovac, V.; Trivic, S.; Wohlfahrt, G.; Kandrak, J.; Pericin, D., *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2005**, 37 (4), 731-750.
- [38] Kotwal, S. M.; Shankar, V., *Biotechnology Advances* **2009**, 27 (4), 311-322.
- [39] Arica, M. Y.; Bayramoglu, G., *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2006**, 38 (3-6), 131-138.
- [40] Sigma Product Information – product number I 4504. <<http://www.sigma-aldrich.com>> Acessado em Janeiro de 2009.

-
- [41] Lobo, R. F. M.; Pereira-da-Silva, M. A.; Raposo, M.; Faria, R. M.; Oliveira, O. N., *Nanotechnology* **2003**, *14* (1), 101-108.
- [42] Bassi, A. B. M. S.; *Conceitos Fundamentais em Espectroscopia*. **2001**. Artigo didático obtido em <<http://www.chemkeys.com.br>>Acessado em 29 de Janeiro 2010.
- [43] Moraes, M. L.; *Filmes Nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com os modelos de membrana e aplicações em biossensores*. **2008**. 129f. Tese (Doutorado em Físico-Química), Instituto de Química – USP/São Carlos, 2008.
- [44] Atvars, T. D. Z.; Martelli, C.; *Espectroscopia Eletrônica de Emissão*. **2002**. Artigo didático obtido em <<http://www.chemkeys.com>>Acessado em 29 de Janeiro 2010.
- [45] Skoog, D. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Ed, Editora Bookman, **2002** .