

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E DE MATERIAIS –  
PPGEM

CONFEÇÃO DE BIOCENSORES ATRAVÉS DA IMOBILIZAÇÃO DE  
BIOCOMPONENTES POR ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE PIRROL

Vinícius Mordini de Andrade  
Engenheiro Químico

Dissertação para obtenção do título de  
Mestre em Engenharia

Porto Alegre  
2006

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS, METALÚRGICA E DE MATERIAIS –  
PPGEM

CONFECÇÃO DE BIOCENSORES ATRAVÉS DA IMOBILIZAÇÃO DE  
BIOCOMPONENTES POR ELETROPOLIMERIZAÇÃO DE PIRROL

Vinícius Mordini de Andrade  
Engenheiro Químico

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

Área de Concentração: Ciência dos Materiais

Porto Alegre

2006

II

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Stülp

Prof. Dr. Alvaro Meneguzzi

Prof. Dr.-Ing. Antônio Cezar Faria Vilela  
Coordenador do PPGEM

Dedico este trabalho a todos que se esforçam para a construção de um mundo melhor, seja através da ciência, política, ações sociais, ou apenas pelo bom exemplo e vontade.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela acolhida, ensino e contribuição para minha formação técnica e pessoal.

Ao professor Carlos Ferreira pela oportunidade oferecida e por acreditar em mim e na construção desta dissertação ao longo deste período. Obrigado pela orientação, estímulo, dedicação e esforço pessoal proporcionado.

Aos amigos do LAPOL Sandro Borges, Daniel Kersting, Franco Amado, Luis Fernando “Bambam”, Flávia Abreu, Fernanda Anderle e demais colegas que acompanharam e muito opinaram em meu trabalho durante os almoços, cervejadas e churrascos. Nossas conversas foram de grande incentivo. Em especial à Liciane Bertol, por sua colaboração e companheirismo desde o início como bolsista.

Ao Dr. Fernando Kreutz, por me confiar o espaço e equipamentos sem restrições e pelas “aulas particulares” de bioquímica, fundamentais neste trabalho; à Aline Baldi pelo auxílio, reforço teórico nos fundamentos e conceitos dos experimentos e principalmente pela sua amizade, assim como de todo o pessoal da FK Biotecnologia.

Ao Sistema FIERGS, em especial ao SENAI, pelo apoio concedido nesta reta final do estudo, mostrando que esta é uma instituição que realmente estimula o estudo e a pesquisa, e pelas mensagens de carinho e otimismo de todos os colegas.

Aos meus pais pelo amor proporcionado e enorme confiança que me depositam, por acreditarem e me incentivarem em cada novo ideal que crio. Sem isto, com certeza eu não seria metade da pessoa que sou hoje. Amo muito vocês.

À minha noiva Simone Sanghi, minha companheira de todas as horas, pelo amor incondicional, respeito, compreensão e atenção dedicada nas horas em que eu mais precisei. Meus passos não seriam os mesmos sem o teu olhar e as tuas palavras.

A todos os meus amigos de perto, de longe, de hoje e de ontem, que muito colaboraram opinando, criticando ou apenas torcendo pelo sucesso deste trabalho. Obrigado pelo simples fato de vocês existirem. Esta vitória é nossa!

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	XIV
RESUMO .....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES .....	4
2.1.1. Histórico .....	4
2.1.2. Mecanismo de condução .....	6
2.1.3. Síntese de polímeros condutores.....	7
2.1.4. Polimerização eletroquímica – conceitos e considerações gerais .....	10
2.1.4.1 Eletrodos .....	10
2.1.4.2 Monômeros.....	11
2.1.4.3 Eletrólitos.....	11
2.1.4.4 Dopagem ( <i>doping</i> ).....	12
2.1.5. Propriedades eletroquímicas do polipirrol .....	13
2.1.5.1 Condições de síntese .....	13
2.1.5.2 Morfologia e propriedades mecânicas .....	13
2.1.5.3 Condutividade e eletroatividade .....	14
2.2. COMPONENTES BIOLÓGICAMENTE ATIVOS (BIOCOMPONENTES) ..	15
2.2.1. Enzimas .....	16
2.2.1.1 Enzimas em biossensores.....	17
2.2.2. Anticorpos .....	18
2.2.3. Técnicas de imobilização de biocomponentes .....	19
2.2.3.1 Adsorção .....	20
2.2.3.2 Ligação covalente.....	20
2.2.3.3 Filmes ou matrizes poliméricos(as) .....	21
2.3. BIOUSSENSORES.....	22
2.3.1. Introdução .....	22

2.3.2.	Conceitos e definições .....	24
2.3.2.1	Receptor .....	25
2.3.2.2	Transdutor .....	26
2.3.3.	Classificação de biossensores .....	27
2.3.3.1	Quanto ao elemento de reconhecimento biológico.....	27
2.3.3.1.1	Reconhecimento por biocatálise.....	28
2.3.3.1.2	Reconhecimento por bioafinidade ou biocomplexidade .....	28
2.3.3.2	Quanto ao mecanismo de transdução .....	28
2.3.3.2.1	Biossensores amperométricos.....	29
2.3.3.2.2	Biossensores potenciométricos .....	30
2.3.3.2.3	Outros tipos de biossensores .....	31
2.3.3.2.4	Comparação entre o método potenciométrico e amperométrico.....	32
2.3.3.3	CrITÉrios de desempenho de biossensores.....	33
2.3.3.3.1	Sensibilidade .....	33
2.3.3.3.2	Estabilidade.....	34
2.3.3.3.3	Tempo de resposta.....	36
2.3.3.3.4	Reprodutibilidade .....	37
2.3.4.	Aplicação de polímeros condutores em biossensores .....	37
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1.	Reagentes e soluções .....	41
3.2.	Equipamentos .....	42
3.2.1.	Ensaio eletroquímico .....	42
3.2.2.	Espectroscopia de infravermelho .....	42
3.3.	Construção dos eletrodos e montagem das microcélulas .....	42
3.3.1.	Eletrodos de trabalho (ET) .....	43
3.3.1.1	Limpeza eletroquímica.....	43
3.3.2.	Eletrodos de referência (ER).....	43
3.3.3.	Contra-eletrodos (CE) .....	44
3.3.4.	Células de três eletrodos .....	44
3.4.	Imobilização enzimática – preparo do biossensor.....	45
3.5.	Imobilização enzimática por eletropolimerização .....	46
3.5.1.	Faixa de potencial .....	47
3.5.2.	Número de ciclos (espessura do filme polimérico).....	47

3.5.3.	Velocidade de varredura .....	48
3.5.4.	Concentração de eletrólito .....	48
3.5.5.	Concentração de pirrol .....	48
3.5.6.	Concentração de enzima .....	49
3.6.	Caracterização do filme obtido .....	49
3.6.1.	Análises por FTIR .....	49
3.7.	Teste de sensibilidade do biossensor ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.7.1.	Diferença de potencial .....	50
3.7.2.	Concentração de eletrólito .....	51
3.8.	Estudos sobre o mecanismo de imobilização enzimática .....	51
3.8.1.	Influência do grau de pureza do monômero.....	51
3.8.2.	Ligação inespecífica.....	52
3.8.3.	Quantificação da imobilização de enzima ativa.....	53
3.9.	Imobilização do V3.5R3 por <i>entrapment</i> com inoculação da HRPO .....	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	55
4.1.	Preparo dos biossensores.....	55
4.2.	Células de três eletrodos.....	55
4.3.	Condições ótimas de preparo do biossensor .....	55
4.3.1.	Faixa de potencial de polimerização .....	56
4.3.2.	Espessura do filme polimérico .....	57
4.3.3.	Velocidade de varredura .....	59
4.3.4.	Concentração de pirrol.....	61
4.3.5.	Concentração de enzima .....	63
4.3.6.	Padronização dos parâmetros da etapa de eletropolimerização.....	66
4.4.	Caracterização do filme obtido .....	67
4.5.	Teste de sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (TSP) .....	68
4.5.1.	Diferença de potencial .....	69
4.5.2.	Concentração de eletrólito .....	72
4.5.3.	Estabilização .....	73
4.6.	Comparação com proteína inespecífica.....	74
4.7.	Capacidade de imobilização de enzima ativa.....	75
4.8.	Imobilização do V3.5R3 por <i>entrapment</i> com inoculação da HRPO .....	78

4.8.1. Imobilização do anticorpo V3.5R3.....	79
4.8.2. Inoculação da enzima HRPO.....	80
5. CONCLUSÕES .....	83
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Configuração de um biossensor para detecção do PSA. O anticorpo é imobilizado à superfície do eletrodo por <i>entrapment</i> e os demais biocomponentes ligam-se através de reações específicas. ....	2
Figura 2 – Configurações das imobilizações realizadas: a) PPy-HRPO x H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : imobilização por <i>entrapment</i> da HRPO; b) PPy-V3.5R3-HRPO x H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> : imobilização por <i>entrapment</i> do V3.5R3 com inoculação da HRPO. ....	3
Figura 3 – Condutividade de polímeros condutores em comparação com outros materiais [12]. ....	5
Figura 4 – Estrutura com ligações duplas alternadas e caminho de condução eletrônica para o polipirrol ....	7
Figura 5 – Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [24]. ....	8
Figura 6 – Gráfico corrente x tempo de uma síntese eletroquímica sob potencial constante (E=+500 mV) mostrando cálculo simplificado da carga envolvida. ....	9
Figura 7 – Reação redox de dopagem e dedopagem do polipirrol. ....	12
Figura 8 – Representação gráfica do “Princípio Chave-fechadura” [17]. ....	22
Figura 9 – Principais etapas do mecanismo de operação de um biossensor [35]. ....	25
Figura 10 – Modelo das etapas da difusão eletrônica para o processo de detecção em biossensores amperométricos descrito por Davis [33]. ....	30
Figura 11 – Estudo da estabilidade de um biossensor enzimático amperométrico [15].	35
Figura 12 – Esquema da microcélula de três eletrodos utilizada. A reação ocorre entre a superfície exposta do ET (Pt) e o CE (Pt), sendo monitorada pelo ER (Ag <sup>+</sup> ). A imobilização da enzima e formação do polímero é verificada no ET. O CE é disposto de forma equidistante ao ET para manter a uniformidade do filme. ....	45
Figura 13 – HRPO imobilizada de forma direta em matriz polimérica – método de <i>entrapment</i> – e a detecção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	46
Figura 14 – Imobilização de HRPO por inoculação em anticorpo V3 imobilizado por <i>entrapment</i> em matriz polimérica. ....	54
Figura 15 – Voltametria cíclica em solução Py 50 mM, HRPO 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> , LiClO <sub>4</sub> 0,1 M e faixa de potencial de 0 a 1000 mV e $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ . ....	57

Figura 16 – Variação da corrente em função do tempo durante a eletropolimerização em solução Py 0,1M, HRPO 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> , LiClO <sub>4</sub> 0,1 M. Faixa de potencial entre +500 a +1000 mV e v = 50 mV.s <sup>-1</sup> .....	58
Figura 17 – Corrente x [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] para diferentes espessuras de camada. Eletropolimerização em solução HRPO 0,25 mg/mL, Py 0,1M e LiClO <sub>4</sub> 0,1M, polimerização de 3, 7 e 15 ciclos entre +500 e +1000 mV.....	58
Figura 18 – Corrente x tempo de polimerizações com diferentes velocidades de varredura a) 10 mV.s <sup>-1</sup> e 50 mV.s <sup>-1</sup> ; b) 20 mV.s <sup>-1</sup> e 100 mV.s <sup>-1</sup> .....	59
Figura 19 – Corrente x [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] de biossensores eletropolimerizados sob diferentes velocidades de varredura, de forma a verificar a influência deste parâmetro eletroquímico sobre a sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Todos os biossensores foram polimerizados em soluções com as mesmas concentrações de HRPO, Py e LiClO <sub>4</sub> . .....	61
Figura 20 – Gráfico Corrente x tempo para eletropolimerizações com potencial cíclico entre 0 e +1000 mV e concentrações de Py de 25, 50, 75, 100 e 200 mM. Velocidade de varredura= 50 mV.s <sup>-1</sup> ; [HRPO]= 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> e [LiClO <sub>4</sub> ]=0,1M. ....	62
Figura 21 – Teste de sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (TSP) para biossensores eletropolimerizados em soluções com concentrações de pirrol de 50, 75, 100 e 200 mmol/L ([HRPO]=0,5 mg.mL <sup>-1</sup> , [LiClO <sub>4</sub> ]=0,1M). ....	63
Figura 22 – Gráfico corrente x tempo para eletropolimerizações sob voltametria cíclica (+500 a +1000mV/ 50 mV.s <sup>-1</sup> ) com concentrações de HRPO de 0,1 a 0,4 mg.mL <sup>-1</sup> (em intervalos de 0,1 mg.mL <sup>-1</sup> ), para a verificação da influência da concentração de enzima no grau de polimerização (LiClO <sub>4</sub> 0,1M + 0,05 M Py).....	64
Figura 23 – Concentração de HRPO na solução de polimerização x Carga elétrica calculada através da integral da Figura 22.....	65
Figura 24 – Respostas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de biossensores imobilizados em soluções com diferentes concentrações de HRPO (0,0 a 0,5 g.L <sup>-1</sup> ) para verificação da influência da concentração da enzima na sensibilidade do biossensor ([Py]=0,05M/ [LiClO <sub>4</sub> ]=0,1M/ +500 mV). ....	65
Figura 25 – Espectro do polipirrol eletropolimerizado em solução aquosa em concentração 0,05M de monômero e 0,1M de LiClO <sub>4</sub> .....	67

Figura 26 – Espectro do polipirrol eletropolimerizado na concentração de 0,05M de pirrol em meio com 0,1M de LiClO <sub>4</sub> e 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> de HRPO. ....	68
Figura 27 – Voltametria cíclica de -500 a +500 mV em solução 0,1 M de LiClO <sub>4</sub> com adição de 0,1 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a cada ciclo em $v = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . O biossensor utilizado foi eletropolimerizado em solução 0,05 M de Py, 0,1 M de de LiClO <sub>4</sub> e 0,5 mg.mL <sup>-1</sup> de HRPO.....	70
Figura 28 – Corrente x tempo para adições de 0,2 mmol/L sob diferentes potenciais aplicados. Eletrodos eletropolimerizados conforme Tabela 3. ....	71
Figura 29 – Corrente x tempo em adições consecutivas de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Biossensor confeccionado sob parâmetros estabelecidos na Tabela 3, E fixo=+500 mV. ....	72
Figura 30 – Corrente x Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para as respostas ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> de biossensores confeccionados nos parâmetros estabelecidos na Tabela 3, com sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> testada em diferentes concentrações de LiClO <sub>4</sub> .....	73
Figura 31 - Teste comparativo de sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> entre eletrodos eletropolimerizados com PPy puro, HRPO imobilizada e albumina. ....	74
Figura 32 – Curva de calibração Absorbância x concentração de HRPO, com valores de leitura para soluções-padrões de HRPO em comprimento de onda de 450 nm.. ...	75
Figura 33 – Valores de absorbância obtidos pelo produto de reação dos biossensores com o TMB. Os mesmos foram confeccionados nas condições descritas na Tabela 3, variando apenas a [HRPO] (n=3). ....	76
Figura 34 – Gráfico tempo x corrente para eletropolimerizações de imobilização do V3.5R3 nas concentrações de LiClO <sub>4</sub> de 0,1 mol.L <sup>-1</sup> e 0,2 mol.L <sup>-1</sup> para verificação da influência do eletrólito no grau de polimerização. ....	79
Figura 35 – Comparação da sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nos três experimentos de <i>entrapment</i> e inoculação: a) polimerização de V3.5R3 com inoculação de HRPO; b) polimerização de BSA com inoculação de HRPO; e c) polimerização de V3.5R3 sem inoculação. [H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] = 8 mmol.L <sup>-1</sup> . ....	81
Figura 36 - a) Esquema de biossensor para imobilização enzimática - vista superior e inferior; b) aparelho eletrônico para a leitura da concentração do analito. ....	85

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Condições ótimas dos parâmetros eletroquímicos para a imobilização da HRPO em PPy segundo Razola [18], considerando como critério de eficiência a corrente obtida da reação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	46
Tabela 2 – Quantidade de cargas calculadas para cada velocidade de varredura através da integral das áreas mostradas nas Figuras 24-a e 24-b. Tempo= 100 s. ....	60
Tabela 3 – Condições consideradas ótimas para a imobilização da HRPO em polipirrol (critério de otimização: sensibilidade ao H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ). Os parâmetros que diferem da Tabela 1 estão em negrito.....	66
Tabela 4 – Resultados para a relação entre as quantidades de HRPO utilizada na polimerização para quantidade de HRPO imobilizada ativa.....	77
Tabela 5 – Condições de imobilização do anticorpo V3.5R3. Em negrito os parâmetros alterados em relação às condições de imobilização da enzima HRPO. ....	80
Tabela 6 – Esquema descritivo do teste com enzima inespecífica para o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> para o biossensor preparado pelas etapas de entrapment do V3.5R3 seguido de inoculação da enzima HRPO. ....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\delta$  – Dipolo
- A – Ampere
- Ac – Anticorpo
- Ag – Antígeno
- BSA – *Bovine albumine serum* (soro de albumina bovina)
- CE – Contra-eletrodo
- DBO – Demanda bioquímica de oxigênio
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
- ECS – Eletrodo de calomelano saturado
- ELISA – *Enzyme linked immuno-sorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
- EP – Eletropolimerização
- EPH – Eletrodo padrão de hidrogênio
- ER – Eletrodo de referência
- ET – Eletrodo de trabalho
- FET – *Field effect transistor* (transistores de efeito de campo)
- FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
- GOx – Enzima *glucose oxidase*
- HRPO – *Horseradish root peroxidase* (Peroxidase de raiz forte)
- i – Corrente medida
- PIC – Polímero intrinsecamente condutor
- PPy – Polipirrol
- PSA – *Prostate specific antigen* (Antígeno específico da próstata)
- S – área (superfície)
- S.m<sup>-1</sup> – Siemens por metro
- TSP – Teste de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- V3.5R3 – Anticorpo específico para a enzima HRPO
- VC – Voltamograma cíclico

## RESUMO

Neste trabalho é apresentado um estudo da imobilização da enzima horseradish peroxidase (HRPO) em matriz polimérica através de dois métodos diferentes. O primeiro consiste em um método de uma etapa, no qual a HRPO é imobilizada por eletropolimerização de pirrol em meio aquoso com eletrodo de platina – técnica esta denominada *entrapment* – visando a confecção de biossensores enzimáticos para a detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A matriz polimérica com a enzima imobilizada foi analisada por reação colorimétrica, confirmando as afirmações de alguns autores sobre a baixa quantidade de enzima imobilizada, e FTIR mostrando espectros bastante semelhantes entre os filmes de polipirrol (PPy) puro e de PPy + HRPO. Foram realizados estudos do efeito das concentrações de monômero, enzima e eletrólito, assim como dos parâmetros eletroquímicos para a otimização da preparação do biossensor. Os valores dos parâmetros otimizados serviram de referência para o estudo do segundo método de imobilização, no qual é utilizado um anticorpo específico para a enzima HRPO, o V3.5R3, imobilizado via *entrapment* com a HRPO inoculada ao sistema através da imersão do substrato formado (PPy-V3.5R3) em uma solução de HRPO. Os dois métodos de confecção dos biossensores para a determinação quantitativa de  $H_2O_2$  são comparados: em relação ao parâmetro comportamento linear, verificou-se uma faixa de concentração de 0 a 15 mmol/L de  $H_2O_2$  para o método via *entrapment*, enquanto que através do método com inoculação foi verificado um comportamento linear de 2 a 8 mmol/L de  $H_2O_2$ . Em relação à resposta do biossensor, tem-se para a concentração de 8 mmol/L de  $H_2O_2$ , uma corrente de aproximadamente 600 nA utilizando biossensores preparados pelo método de *entrapment* e 300 nA pelo método com inoculação. Apesar do baixo desempenho da imobilização do anticorpo V3.5R3 para a detecção de  $H_2O_2$ , o sucesso na imobilização de diferentes biocomponentes e o desenvolvimento de mecanismos como a inoculação amplia o espectro de possibilidades para o estudo de biossensores.

Palavras-chave: biossensor, pirrol, peroxidase

## ABSTRACT

In this work is presented a study of the immobilization of the enzyme *horseradish peroxidase* (HRPO) in polymeric matrix by two different methods. The first one consist in a one-step method, in which the HRPO is immobilized by electropolymerization of pyrrole in aqueous solution onto platin electrode – techniques denominated entrapment – aiming the confection of enzymatic biosensors for the amperometric detection of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). The polymeric matrix with the immobilized enzyme (substrate PPy-HRPO) was analyzed by colorimetric reaction, confirming the affirmations of some authors about the low quantities of enzymatic immobilization, and FTIR, what shows very similar specters for the polypyrrole (PPy) film and the PPy + HRPO. Studies of the concentrations of monomer, enzyme and electrolyte, as well as of the electrochemical parameters, have been carried through for the optimization of the biosensor. The values of the optimized parameters were used as reference for the study of the second immobilization method, in which is used a specific antibody for enzyme HRPO, the V3.5R3, immobilized via entrapment. The HRPO is, then, inoculated to the system by immersion of the PPy-V3.5R3 substrate in HRPO solution. The results of the biosensores confectioned by the two methods are compared: about the linear behavior it was verified a range of concentration form 0 to 15 mmol/L of  $H_2O_2$ , while through the second method was verified a linear range of 2 to 8 mmol/L of  $H_2O_2$ . About the signal response, for the same concentration of 8 mmol/L of  $H_2O_2$ , an electric current of 600 nA was reached, against 300 nA with the biosensors constructed by the second method. Although the low performance of the immobilization of the antibody V3.5R3 for the  $H_2O_2$  detection, the success in different biocomponents immobilization and the development of mechanisms as the inoculation increases the possibilities specter for biosensors research.

Keywords: biosensor, pyrrole, peroxidase

## 1. INTRODUÇÃO

Os polímeros orgânicos são materiais de larga utilização, tradicionalmente vistos como isolantes elétricos. Porém, nas últimas décadas este papel vem sendo quebrado à medida que estudos sobre uma nova classe de polímeros conjugados têm trazido este tipo de material a assumir o papel de condutor em uma gama de novas aplicações. Cientistas de diversas disciplinas estão combinando conhecimentos para estudarem sólidos orgânicos que exibem propriedades condutoras notáveis.

Esta nova classe de polímeros, conhecida como polímeros intrinsecamente condutores (PIC) ou polímeros eletroativos conjugados, tem sido aplicada em estudos de diversas áreas, quando não raro encontrados em estudos multi-disciplinares. Estes materiais exibem propriedades elétricas e óticas muito interessantes, até então encontradas apenas em sistemas inorgânicos.

Um dos grandes avanços que os PIC's proporcionaram foi o aprimoramento dos biossensores, substituindo as membranas e sistemas semi-permeáveis utilizados até então pela imobilização através da eletropolimerização – método que consiste na formação de uma matriz polimérica (rede) na qual o biocomponente fica fisicamente ou covalentemente ligado às cadeias poliméricas. Visto que vários PIC são biologicamente inócuos, o biocomponente mantém suas propriedades biológicas. Esta forma de imobilização é denominada *entrapment*, cujo mecanismo ainda não está totalmente elucidado.

Esta nova tecnologia criou os chamados “biossensores de terceira geração”, os quais são simples, de resposta rápida, estáveis, podem ser miniaturizados e com potencial de aplicação para os mais diversos fins. Parte-se do princípio que qualquer reação biológica pode ser analisada por este método através da imobilização de um dos componentes envolvidos – o qual pode ser desde células inteiras até fragmentos protéicos –, no entanto a maioria das aplicações é voltada para o uso de enzimas, formando os também classificados como “biossensores enzimáticos”.

Devido às propriedades “redox” dos polímeros utilizados para a imobilização, as enzimas do tipo *oxidoreductases*, como a *glucose oxidase* (GOx), a *urease* e as *peroxidases* são as mais freqüentemente utilizadas, geralmente para aplicações clínicas, como a detecção e quantificação da glicose, uréia e peróxidos.

Uma das aplicações mais recentes e promissoras é a identificação e quantificação de biomarcadores (produto natural que pode ser associado a determinado processo biológico) no diagnóstico e acompanhamento de doenças crônicas como, por exemplo, o câncer de próstata. Alguns estudos obtiveram sucesso construindo um biossensor para a detecção do PSA (*prostate specific antigen*), o qual poderá ser útil no diagnóstico e acompanhamento de pacientes.

Este tipo de biossensor é produzido com a imobilização de um anticorpo anti-PSA, (o que pode ser feito em matriz polimérica), seguido da adição da amostra contendo PSA e a adição de um segundo anticorpo anti-PSA conjugado à peroxidase. A presença de  $H_2O_2$  gera o sinal amperométrico, como mostrado na Figura 1.

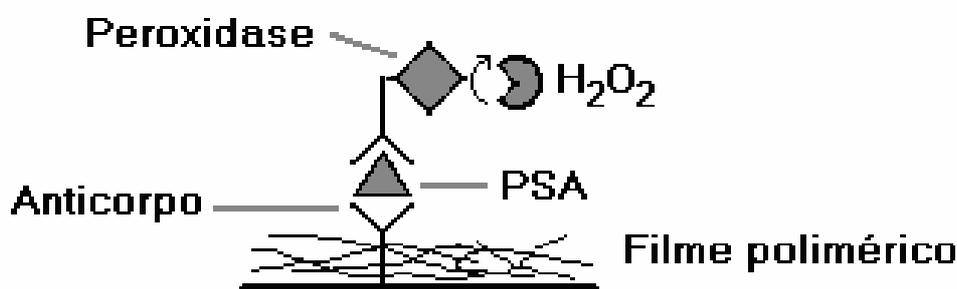


Figura 1 – Configuração de um biossensor para detecção do PSA. O anticorpo é imobilizado à superfície do eletrodo por *entrapment* e os demais biocomponentes ligam-se através de reações específicas.

Neste estudo são apresentadas as etapas de imobilização semelhantes a este processo, sendo utilizados a peroxidase de raiz forte – *horseradish peroxidase* – (HRPO) e o anticorpo V3.5R3 (anti-peroxidase). A imobilização da HRPO é realizada em matriz polimérica de polipirrol (PPy), sendo estudados os parâmetros físicos e eletroquímicos das etapas de eletropolimerização/ imobilização e a respectiva influência de cada parâmetro na sensibilidade do substrato PPy-HRPO ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), como mostra o esquema da Figura 2a.

A imobilização do anticorpo V3.5R3, também é feita por *entrapment*, seguido de uma etapa de inoculação da HRPO para sensibilizar o substrato ao  $H_2O_2$ , como mostra a Figura 2b.

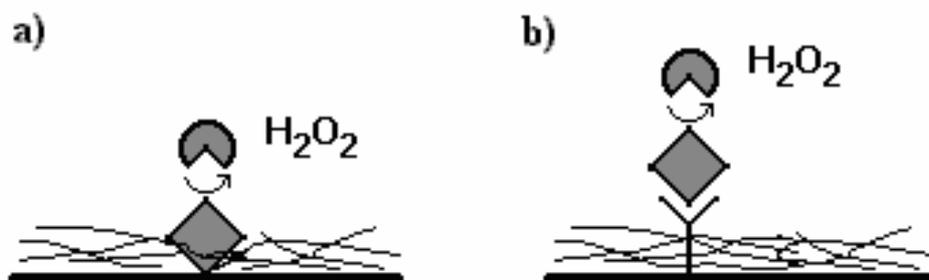


Figura 2 – Configurações das imobilizações realizadas: a) PPy-HRPO x  $H_2O_2$ : imobilização por *entrapment* da HRPO; b) PPy-V3.5R3-HRPO x  $H_2O_2$ : imobilização por *entrapment* do V3.5R3 com inoculação da HRPO.

Nesta segunda configuração (b) a enzima fica mais exposta ao meio e espera-se que seja menos suscetível a efeitos de impedimento espacial. A eficiência da imobilização deste método também é avaliada pela sensibilidade ao  $H_2O_2$ .

O  $H_2O_2$ , assim como outros peroxigênios, tem como principais aplicações o branqueamento da pasta de papel, a indústria têxtil, os cosméticos e o campo ambiental. Suas propriedades únicas os tornam particularmente adequados para fornecer proteção ao meio ambiente em áreas da vida cotidiana e na indústria em geral, desde a prevenção da poluição até sua redução e eliminação.

O uso do  $H_2O_2$  apresenta as vantagens de ser um líquido totalmente miscível com água, permitindo facilidade de dosagem e controle; não é tóxico; apresenta como produtos de degradação apenas água e oxigênio; quando manuseado e armazenado corretamente, é um oxidante seguro e fácil de se trabalhar e, em reação com certos ácidos, pode formar o ácido de Caro (ácido permonossulfúrico), um sistema de oxidação particularmente potente.

Este trabalho é fruto de uma parceria entre o Laboratório de Polímeros da UFRGS - LAPOL e a empresa FK Biotecnologia, os quais somaram recursos humanos, tecnológicos e financeiros para darem este passo na grande e promissora área dos biossensores.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES**

Uma nova classe de polímeros conhecida como polímeros intrinsecamente condutores (PIC), ou polímeros conjugados, está sendo estudada devido às interessantes propriedades elétricas e ópticas que vêm a satisfazer diversas necessidades de áreas como a microeletrônica [1, 2], química analítica [3], biotecnologia [4], entre outras. Os polímeros intrinsecamente condutores diferenciam-se dos outros semicondutores cristalinos por serem em sua natureza de estrutura molecular e apresentarem comprimento de cadeias em menor escala [5]. A condução elétrica ocorre pelo fenômeno de conjugação de ligações duplas, resultando na sobreposição de seus orbitais moleculares parcialmente preenchidos e permitindo o livre movimento dos elétrons entre estas lacunas.

Os polímeros condutores são conhecidos em aplicações físicas e físico-químicas, como inibidores de corrosão [6], capacitores compactos, revestimento eletrostático [7], proteção eletromagnética de computadores, dispositivos de “janela inteligente” [8] – a qual varia a quantidade de luz que permite passar –, entre outras. Devido a algumas vantagens como baixo custo, propriedades biológicas inertes, capacidade de exclusão de interferentes, alta velocidade de transferência de elétrons e facilidade de síntese sobre qualquer superfície metálica, independentemente da forma [9], os PIC's tem sido intensamente utilizados para a confecção de sensores. Juntamente com a moderna instrumentação eletroquímica disponível atualmente, a associação dos PIC's aos eletrodos quimicamente modificados resulta em sensores com alta seletividade e sensibilidade [10].

#### **2.1.1. HISTÓRICO**

As pesquisas em polímeros condutores intensificaram-se logo após a descoberta do poli(sulfur-nitrado) [(SN)<sub>x</sub>], em 1975, o qual torna-se supercondutor em baixas temperaturas. No entanto, os polímeros condutores complexos na forma de tetraciano e tetraoxalato-platinato – os complexos de transferência de cargas (sais de Krogman) – já

eram conhecidos desde 1971 [11]. A descoberta do poliacetileno dopado, o qual é considerado o marco inicial dos PIC's, iniciou-se em 1974, quando este polímero – comumente conhecido como um pó preto – foi sintetizado via catálise com catalisadores do tipo Ziegler-Natta, formando um filme de aparência metálica. Apesar disto, as propriedades condutoras não chegaram a obter alterações significativas. No entanto, em 1977 Shirakawa, MacDiarmid e Heeger [12] descobriram que a oxidação com vapor de cloro, bromo ou iodo tornou o filme de acetileno dez vezes mais condutor do que o original. Este tratamento com halogênios foi chamado de “doping” (dopagem) pela analogia com a dopagem de semicondutores.

A forma “dopada” do poliacetileno chegou a uma condutividade de 10 Siemens por metro ( $S.m^{-1}$ ), um valor maior do que qualquer outro polímero conhecido. Como comparação, o teflon apresenta uma condutividade de  $10^{-16} S.m^{-1}$  enquanto a prata e o cobre  $10^8 S.m^{-1}$ , como mostra a Figura 3:

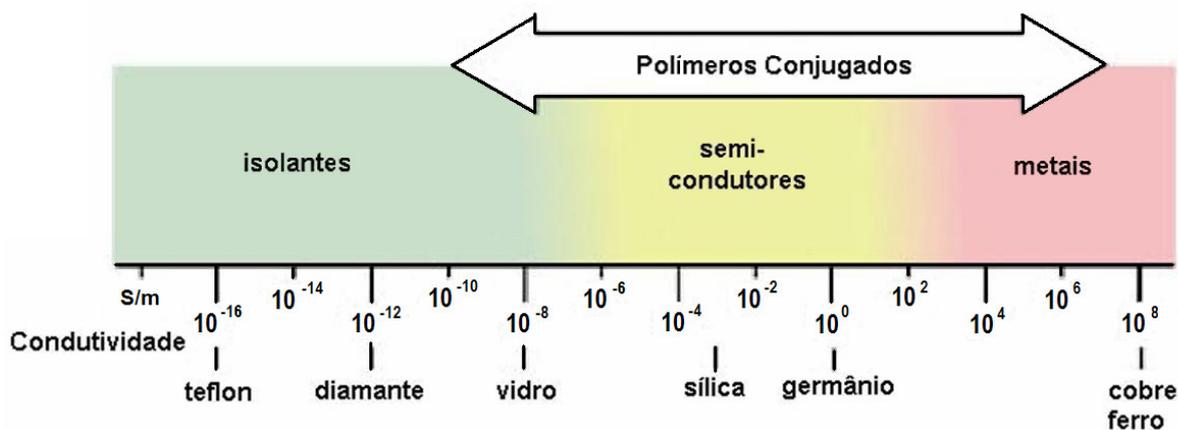


Figura 3 – Condutividade de polímeros condutores em comparação com outros materiais [12].

A síntese eletroquímica de PIC's teve seu primórdio com os estudos de Dall'Olio e col. em 1968, quando obtiveram o polipirrol, polímero na forma de um pó preto insolúvel, por oxidação eletroquímica do monômero pirrol em solução aquosa de ácido sulfúrico em eletrodo de platina. Porém o polímero resultante apresentava condutividade elétrica muito baixa ( $0,08 S.m^{-1}$ ) se comparada a de outros polímeros obtidos por síntese química na época, o que despertou pouco interesse [13].

Estes estudos ganharam força em 1979, quando Diaz e col. obtiveram filmes de polipirrol por síntese eletroquímica com condutividades elétricas muito mais altas ( $100 \text{ S.cm}^{-1}$ ) e excelente estabilidade ao ar [14, 15, 16, 17]. A partir de então os principais aspectos da síntese eletroquímica passaram a ser estudados sob o ponto de vista da química, física, ciência de polímeros e de materiais, entre outros.

Em 1987, surgiu a primeira aplicação dos polímeros condutores na imobilização de enzimas. A co-deposição da enzima GOx em polipirrol sobre eletrodos de platina criou o primeiro biossensor por polimerização eletroquímica e abriu uma vasta gama de possibilidades que resultou na denominada terceira geração de biossensores [18, 19, 20].

### **2.1.2. MECANISMO DE CONDUÇÃO**

O mecanismo da condução em alguns polímeros é muito complexo, já que um mesmo material pode exibir uma condutividade dentro de uma escala de até quinze ordens de valor e muitos envolvem diferentes mecanismos dentro de regimes diferentes [11].

Em geral, os PIC's apresentam uma configuração de ligações conjugadas – ligações simples e duplas alternadas ao longo das cadeias (Figura 4) – responsável pelo processo de condução eletrônica. Além da condutividade elétrica, estes elétrons  $\pi$  alternados são responsáveis por outras propriedades como baixa energia de transição óptica, baixo potencial de ionização e alta afinidade elétrica [13]. Devido a isto, os PIC's são também chamados de "metais sintéticos", e têm sido muito utilizados em eletrocatalise, separação por membranas e cromatografia, porém a aplicação destes na modificação de eletrodos convencionais criou novas possibilidades no desenvolvimento de sensores químicos e bioquímicos [21, 22].

No entanto, a configuração conjugada não é o bastante para tornar um material polimérico condutor. Além deste fator “transportadores de carga” em forma de elétrons extras ou “lacunas” têm de ser injetados no material, e esta é a função do dopante [23]. Uma lacuna é uma posição na qual está faltando um elétron. Quando uma lacuna é

preenchida por um elétron que saltou de uma posição vizinha, uma nova lacuna é criada nesta antiga posição e assim por diante, permitindo o transporte das cargas por toda a extensão do material.

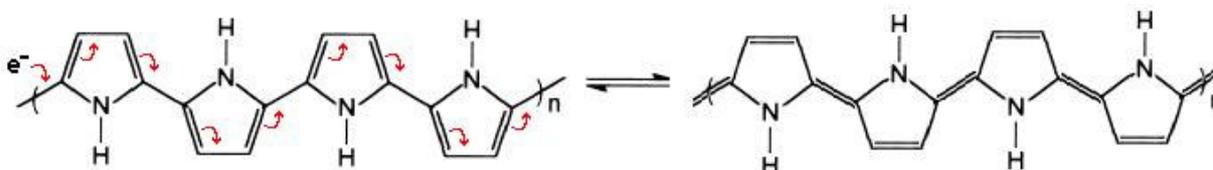


Figura 4 – Estrutura com ligações duplas alternadas e caminho de condução eletrônica para o polipirrol

### 2.1.3. SÍNTESE DE POLÍMEROS CONDUTORES

A formação do filme de polímero condutor em uma superfície envolve um número de subseqüentes passos. De uma forma geral, pode-se simplificar o mecanismo de síntese dos PIC's citando-se as etapas principais de transporte de difusão do monômero à superfície do eletrodo e os sucessivos passos de acoplamentos oxidativos:

- i. oxidação do monômero a um radical cátion seguido pelo acoplamento para formar um dímero (dimerização);
- ii. oxidação eletroquímica dos oligômeros formados;
- iii. propagação da cadeia devido às reações de acoplamento;
- iv. precipitação das cadeias do polímero policatiônico na superfície do ânodo quando o comprimento destas ultrapassar o limite de solubilidade [24].

Após a formação do radical cátion do pirrol por eletro-oxidação na superfície do eletrodo, ocorre a dimerização e então aromatização por deprotonação. O dímero se oxida ligeiramente mais facilmente do que o monômero e permite assim que reações sucessivas de acoplamento prossigam [13], o potencial de oxidação do polímero é sempre mais baixo do que o do monômero. O polímero é ionizado eletroquimicamente a um estado condutor, sendo a neutralidade de cargas, do composto como um todo, mantida pela incorporação do contra-íon proveniente do eletrólito. Isto é essencial porque a precipitação do polímero não oxidado, por estar no estado isolante, pararia a reação [24].

Os passos acima citados do mecanismo da reação de polimerização são mostrados na Figura 5 – Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [24]., tendo o polipirrol como exemplo [24].

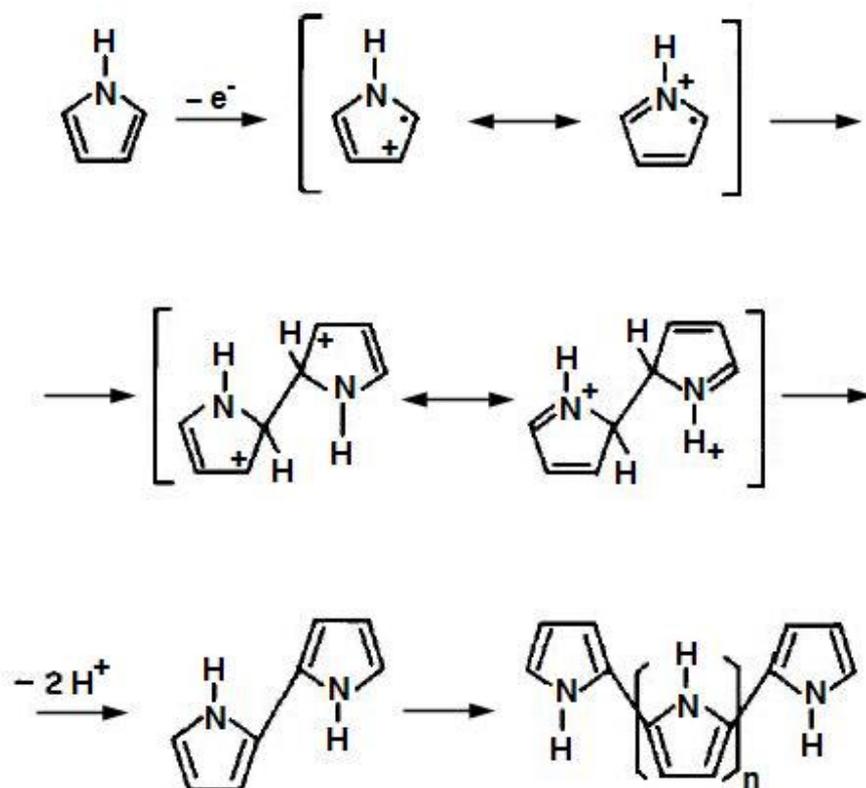


Figura 5 – Mecanismo de eletropolimerização do pirrol [24].

As reações de síntese de PIC's podem ser obtidas via química ou eletroquímica. Na síntese química a oxidação é feita pelo contato com um agente oxidante capaz de produzir um potencial de oxidação igual ou superior ao necessário para oxidar o monômero em um meio adequado. Como exemplo pode-se citar a oxidação do pirrol pelo  $FeCl_3$  ( $Fe^{+3} + e^- \rightarrow Fe^{+2}$ , +0,77 V) em meio aquoso com pH neutro, a qual resulta em um pó preto insolúvel com condutividade de  $0,01$  a  $1 \text{ S.cm}^{-1}$  quando comprimido [7].

Uma das principais vantagens da síntese química é a possibilidade de obtenção de grandes quantidades do polímero [8]. Na técnica de eletropolimerização a dopagem ocorre de forma mais uniforme por ser simultânea à polimerização. A espessura do filme, ou seja, a massa depositada é proporcional ao tempo de reação, e pode ser calculada pela

quantidade de carga elétrica pela integral da área no gráfico corrente x tempo, como mostra o exemplo da Figura 6.

As propriedades do filme polimérico (porosidade, espessura) podem ser facilmente controladas pelos parâmetros eletroquímicos [25]: por exemplo, o valor da corrente ou potencial (método galvânico ou potenciostático, respectivamente), influencia diretamente na homogeneidade e densidade do filme obtido [26, 27, 28].

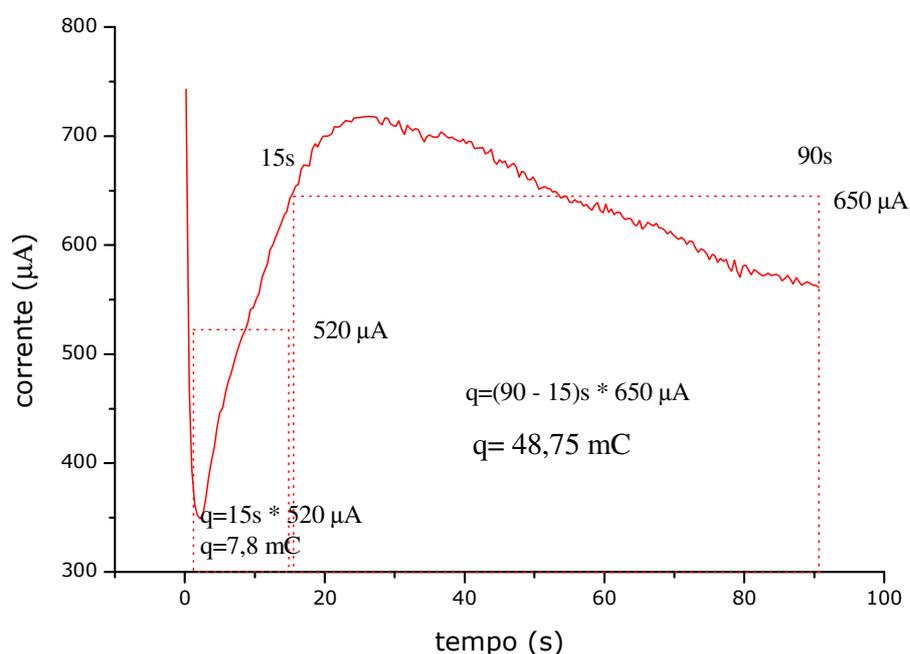


Figura 6 – Gráfico corrente x tempo de uma síntese eletroquímica sob potencial constante ( $E=+500$  mV) mostrando cálculo simplificado da carga envolvida.

A eletropolimerização pode ser realizada em temperatura ambiente na maioria dos casos, sofrendo menor influência da temperatura que a oxidação química. A grande vantagem é que o filme polimérico pode ser produzido em qualquer objeto metálico inerte no meio e na faixa de potencial aplicada, sobre qualquer forma e tamanho, ou mesmo em eletrodos de áreas muito pequenas, com um bom grau de aderência [6], o que favorece na criação de microcélulas eletroquímicas (atualmente tem-se referências de microcélulas de até 50 µL), reduzindo assim as quantidades de reagentes consumidos nos experimentos [18].

#### 2.1.4. POLIMERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA – CONCEITOS E CONSIDERAÇÕES GERAIS

A polimerização eletroquímica, ou eletropolimerização, consiste em conduzir de forma potencioestática (isto é, sob tensão constante) ou galvanostática (sob corrente constante) o monômero a um potencial acima de seu potencial de oxidação. É uma técnica realizada normalmente em uma célula eletroquímica na configuração padrão de três eletrodos, em solução geralmente aquosa de um monômero e de um eletrólito [24, 29].

Filmes eletroquimicamente polimerizados de monômeros aromáticos heterocíclicos, tais como pirrol, tiofeno, fenileno e a polianilina têm sido fonte de muitos estudos encontrados na literatura [30, 31], que mostram como as condições de síntese (concentração do eletrólito, concentração do monômero, número de ciclos e velocidade de varredura) influenciam nas propriedades físicas, eletroquímicas e morfológicas do filme [29]. Esta forma de síntese será revista com enfoque nos métodos mais utilizados no preparo de biossensores.

##### 2.1.4.1 ELETRODOS

A eletropolimerização geralmente é conduzida em um sistema padrão de célula de três eletrodos consistindo de um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e de um eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho atua como suporte para a formação do polímero. Como os filmes são produzidos por um processo oxidativo, é necessário que o material do eletrodo não seja propenso à oxidação. Por esta razão, são utilizados materiais como o ouro, platina, titânio, níquel e paládio, eletrodos de carbono e eletrodos de vidro revestido com óxido de estanho.

A função do contra-eletrodo é fornecer a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho sem influenciar nas características nos dados medidos e, como consequência, o contra-eletrodo deve ter uma área grande quando comparada ao eletrodo de trabalho [13].

Para que seja obtido um filme de espessura uniforme e homogêneo, a célula deve ser configurada com o contra-eletrodo equidistante de todos os pontos do eletrodo de

trabalho, mantendo as linhas de força entre o ânodo e o cátodo o mais semelhantes possível. Isto garante uma densidade de corrente uniforme durante a eletropolimerização, o que interfere na natureza do filme. O eletrodo de referência tem a função de medir o potencial e servir como um parâmetro para o potenciostato mantê-lo estável durante a eletropolimerização.

#### 2.1.4.2 MONÔMEROS

Os monômeros eletroquimicamente polimerizáveis apresentam potenciais de oxidação relativamente baixos, suscetíveis a reações de substituição eletrofílica [13] e decréscimo no potencial de oxidação no decorrer das reações de acoplamento, o que favorece o crescimento das cadeias. Na aplicação de PIC's em biossensores e na modificação de superfícies de eletrodos, os monômeros que mais se destacam são a anilina e, principalmente, o pirrol e seus derivados para o procedimento de imobilização de biomoléculas por estes serem solúveis em água [24].

O pirrol apresenta a vantagem de ser altamente solúvel em água, o que permite a solução deste no mesmo meio que as enzimas sem provocar a desnaturação destas [24, 31], além de que a imobilização em um procedimento de única etapa facilita a funcionalização da superfície de eletrodos [32], assim como o controle da espessura do filme polimérico [1, 33]. Devido a estas características, o polipirrol e seus derivados são os mais utilizados por sua versatilidade e grande variedade de espécies com propriedades redox capazes de ligar-se ao grupo pirrol [34, 35, 36].

#### 2.1.4.3 ELETRÓLITOS

O eletrólito fornece o caráter condutor à solução eletroquímica, conduzindo a corrente entre os eletrodos imersos. Além desta finalidade principal, na eletropolimerização o eletrólito também é responsável pela dopagem do polímero formado, influenciando na etapa de protonação e no aspecto conjugado, característico dos polímeros condutores [37, 38].

A escolha do eletrólito depende da solubilidade, do grau de dissociação e do caráter nucleofílico. No método convencional de oxidação química este papel é desenvolvido pelo agente oxidante (ou redutor), como na eletropolimerização não há a necessidade de que o composto dopante tenha este caráter redox, a variedade de sais possíveis de serem utilizados é enorme [29, 38]. A escolha do eletrólito tem influência nas características mecânicas, elétricas, óticas e na morfologia dos filmes formados [28].

#### 2.1.4.4 DOPAGEM (DOPING)

Tratando-se de PIC's, o conceito de dopagem é crucial para a observação de que estes materiais eletrônicos exibem a uma propriedade bastante particular de variarem seu comportamento elétrico de isolante a supercondutor, dependendo da modificação química aplicada.

O termo “dopagem” significa a conversão de um polímero neutro (ou seja, na forma isolante) em um complexo iônico condutor por uma transformação de oxi-redução. O equilíbrio de cargas como um todo é conseguido pela incorporação dos contra-íons, ou seja, dos íons dopantes. Com o nível de dopagem é possível controlar a condutividade elétrica do polímero, quanto mais facilmente os elétrons  $\pi$  das cadeias poliméricas puderem ser removidos ou adicionados para formarem compostos iônicos (mobilidade do ânion dentro e fora da película), mais o polímero é propenso à dopagem.

A dopagem química com uso de agente oxidante corresponde à dopagem tipo "p". O polímero forma um complexo catiônico, incorporando a forma reduzida do agente oxidante como íon dopante. A dopagem química com agente redutor é denominada tipo "n", onde é formado um complexo polimérico aniônico, incorporando a forma oxidada do agente redutor.

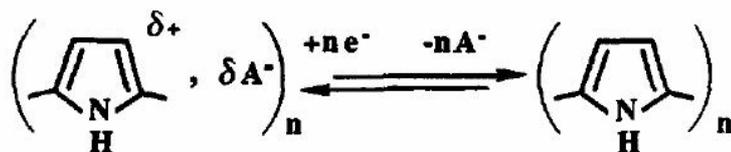


Figura 7 – Reação redox de dopagem e dedopagem do polipirrol.

O mesmo efeito pode ser obtido eletroquimicamente submetendo o polímero neutro ao potencial correspondente de oxidação ou redução (dopagem eletroquímica) [1]. Neste caso, os íons dopantes são provenientes do eletrólito presente na solução eletrolítica, podendo-se assim trocar o íon dopante do polímero. Um esquema geral para a dopagem do polipirrol e seus compostos mostrado na Figura 7.

## **2.1.5. PROPRIEDADES ELETROQUÍMICAS DO POLIPIRROL**

### **2.1.5.1 CONDIÇÕES DE SÍNTESE**

Os filmes de polipirrol eletroquimicamente sintetizados são preparados em células eletrolíticas, com variações no material do eletrodo de trabalho e contra-eletrodo, assim como no eletrodo de referência. Alguns autores utilizam o ECS, enquanto a grande maioria utiliza prata/ cloreto de prata pela facilidade de confecção em tamanho compatível com as microcélulas.

A concentração do monômero mais utilizada na solução eletroquímica é de 0,05M, tanto para a imobilização de GOx [19] como de HRPO [14, 39]. Os eletrólitos mais utilizados são sais com os ânions perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) e cloreto ( $\text{Cl}^-$ ).

### **2.1.5.2 MORFOLOGIA E PROPRIEDADES MECÂNICAS**

A natureza dos íons dopantes influencia muito nas propriedades micro-estruturais mecânicas e elétricas dos filmes resultantes. Por exemplo, Salmon e col. demonstraram que os fatores morfológicos superficiais variam para a eletropolimerização conforme o ânion presente, como hexaflúorofosfato, perclorato, sulfato, trifluórmétanosulfonato, fluorsulfonato e trifluoracetato [40].

### 2.1.5.3 CONDUTIVIDADE E ELETROATIVIDADE

O ânion dopante também desempenha um papel importante nas propriedades elétricas das películas de polipirrol que contêm ânions polifluór e do perclorato. Em geral, estes ânions conduzem a filmes mais condutores (de 30 a 200 S.cm<sup>-1</sup>) do que os filmes sintetizados com ânions de sulfonato ou carboxilato (de 0,01 a 10 S.cm<sup>-1</sup>) [13], com exceção de filmes com ânions sulfonato aromáticos ( $\pm 50$  S.cm<sup>-1</sup>). O efeito de condições de síntese e dos ânions dopantes nas propriedades mecânicas, assim como nas propriedades elétricas de filmes de polipirrol foi investigado por Wang *et al.* [38]. Eles mostraram que o grau de ordenação é determinado pela composição do ânion e pelas condições de síntese, e que aumentando a ordenação é possível obter filmes altamente condutores.

Hoar e Kumar [41] estudam a influência do potencial hidrogeniônico (pH) e do potencial eletroquímico em um biossensor suportado em polianilina, estabelecendo que a condutividade eletrônica desta classe de polímeros apresenta uma forte resposta a alterações destes dois parâmetros.

## 2.2. COMPONENTES BIOLÓGICAMENTE ATIVOS (BIOCOMPONENTES)

É considerado biocomponente todo o elemento vivo ou derivado de um agente vivo capaz de ser imobilizado em contato íntimo com a superfície de um sensor, de forma a reconhecer determinada espécie de interesse quantitativo. Entende-se por imobilização o método pelo qual o componente biológico liga-se ou é passivamente ligado ao sensor, mantendo suas propriedades biológicas naturais [42].

Desde a demonstração por Clark e Lyons da integração entre uma enzima e um eletrodo formando um biossensor de alta seletividade [34], o desenvolvimento deste tipo de dispositivo obteve considerável progresso. Este aprimoramento tem sido obtido pela biotecnologia moderna com a pesquisa dos mais diversos tipos de componentes biologicamente ativos (biological components – ou “biocomponentes”), os quais atuam como agentes de reconhecimento, tais como tecidos, células, anticorpos, antígenos e enzimas devido a diversas vantagens destes sobre detectores químicos na reação com o analito [11, 34, 43, 44].

No entanto, a imobilização estável sobre superfícies condutoras com total retenção de suas propriedades biológicas é um problema crucial: dentro do biossensor o biocomponente incorporado apresenta um alto grau de seletividade, mas continua sendo vulnerável a condições extremas como temperatura, pH e força iônica [13].

A estabilidade *in vitro* – tanto em condições de armazenagem como de operação – de enzimas e proteínas continua sendo um tema crítico deste estudo. A estabilidade de armazenagem, ou tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), refere-se ao período em que o componente mantém suas propriedades catalíticas entre a manufatura e seu eventual uso. A estabilidade operacional é definida como o tempo em que o componente mantém a atividade durante o uso contínuo sob as condições de uso [45].

### 2.2.1. ENZIMAS

Enzimas são em sua maioria proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas presentes em todos os seres vivos. Consistem de uma estrutura tridimensional complexa com um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos. Este centro ativo é geralmente formado por resíduos de aminoácidos da cadeia protéica e um grupo não-protéico (resíduos de carboidratos, por exemplo), responsável pela atividade biológica da enzima [46].

Existem certas desvantagens no uso de enzimas as quais devem ser consideradas no planejamento de pesquisas e estudos sobre o tema: as enzimas trabalham sob condições estreitas de temperatura, pressão e pH; em particular, o alto custo de isolamento e purificação e a natureza instável quando fora de seu meio natural são as principais barreiras para o seu uso ainda maior.

Como outros catalisadores, elas aceleram as reações promovendo o alcance do equilíbrio sem alterá-las, através da diminuição da energia de ativação. Além de sua função catalítica, enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. Elas catalisam uma certa espécie de reação química com um único reagente ou número de reagentes estruturalmente similares, sendo estes reagentes denominados substratos. Dessa forma, a razão principal para o amplo uso de enzimas em biossensores envolvem sua especificidade e propriedades catalíticas. As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e também da própria enzima [2].

As enzimas apresentam diversas vantagens sobre os catalisadores químicos convencionais, com destaque para a especificidade e a seletividade, não apenas para reações particulares como também na discriminação entre partes similares das moléculas (regioespecificidade) ou isômeros óticos (estereoespecificidade). Elas catalisam as reações apenas de uma faixa bastante estreita de reagentes (substratos), a qual pode consistir de um pequeno número de compostos intimamente relacionados (como a *trypsin*, que catalisa a hidrólise de alguns peptídeos e ésteres); uma única classe de compostos (a *hexokinase* catalisa a transferência de um grupo fosfato da ATP para

algumas hexoses); ou um simples composto (GOx oxida apenas a glicose entre os diversos tipos de açúcares existentes).

Isto significa que além das altas velocidades de reação atingidas pela catálise de enzimas, a especificidade deste sistema mantém o controle das reações paralelas, eliminando co-produtos indesejados, o que aumenta a produtividade e reduz os custos com purificação, uma vez que o produto é gerado em um meio sem contaminantes. Além disto, algumas reações estereoespecíficas – como a conversão de glicose em frutose – não podem ser atingidas por métodos químicos clássicos sem o consumo de grande quantidade de tempo e trabalho.

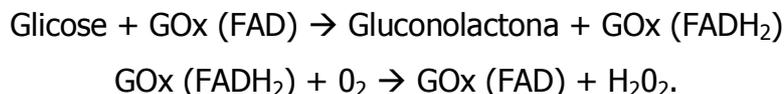
#### 2.2.1.1 ENZIMAS EM BIOSENSORES

Entre as diversas espécies de biocomponentes a serem imobilizados, as enzimas e os anticorpos são os mais utilizados em biossensores, com maior destaque para as enzimas [14, 19, 32, 35, 31, 47, 48]. Dentre estas, as mais utilizadas são a GOx [49], para biossensores de detecção e quantificação de glicose e a *horseradish peroxidase* (HRPO), para peróxidos, principalmente para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [50, 51]. Outras enzimas, como a *urease*, utilizada na detecção e quantificação da uréia, *lactate oxidase* ou *lactate dehydrogenase* – lactato e *cholesterol oxidase* – colesterol também são encontradas na literatura, porém com menor expressão que as duas primeiras.

A multiplicidade dos processos de imobilização de enzimas reduz os custos de análises. A enzima imobilizada é mais estável em condições de funcionamento extremas, como alta temperatura, e pode facilmente ser combinada com um transdutor apropriado no conjunto do biossensor [52].

A GOx, extraída do *Aspergillus niger* catalisa a conversão da β-D-glicose e oxigênio a D-glico-1,5-lactona e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A GOx é uma flavoproteína, altamente específica à β-D-glicose, e é largamente usada para estimar a concentração de glicose no sangue e na

urina através da formação de compostos coloridos. Por ser consumida na reação, esta enzima não pode ser usada como um sensor reversível [53]:



A HRPO é a mais usada na construção de eletrodos, e a mais citada como exemplo para as reações de enzimas do tipo peroxidase [19]. A utilização de outras peroxidases é limitada por diversas razões, como a pouca disponibilidade comercial, instabilidade à temperatura ambiente e baixa taxa de transferência eletrônica atingida [19]. A HRPO é considerada uma enzima de comportamento relativamente compreendido [54], a qual foi imobilizada com sucesso em diferentes tipos de suportes e métodos [31].

### **2.2.2. ANTICORPOS**

Os anticorpos (Ac), também chamados de imunoglobulinas, são glicoproteínas de alto peso molecular (em torno de 150 kD) sintetizadas e secretadas pelos linfócitos B que interagem especificamente com um epítipo. Representam cerca de 2% das proteínas séricas e localizam-se na fração gamaglobulina do soro [55]. Possuem duas cadeias "leves" e duas cadeias pesadas, as quais são ligadas entre si por pontes de dissulfeto, formando estrutura simétrica em forma de Y. Próximo ao topo desta estrutura as cadeias têm sua porção amino terminal, onde se encontra o paratopo, que determina a especificidade do Ac que se liga ao antígeno. Conforme as seqüências de aminoácidos neste sítio ativo, os Ac reconhecem o analito alvo (antígeno) ou grupos de analitos e reagem especificamente.

É definido como antígeno (Ag) qualquer molécula ou substância estranha ao organismo capaz de produzir uma resposta imune com produção de anticorpos e linfócitos T específicos para a mesma. Um Ag completo tem duas propriedades: imunogenicidade e antigenicidade [55]. São proteínas que, apesar de seu baixo peso molecular em relação aos anticorpos, possuem uma complexidade química que os diferem das substâncias reconhecidas pelo organismo.

A interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) forma um complexo Ag-Ac que envolve ligações não covalentes como Van der Waals, ligação eletrostática, ponte de hidrogênio e ligações hidrofóbicas. Estas ligações ocorrem à curta distância, de modo que só as moléculas que contém o determinante antigênico ligam ao sítio antígeno ligante do respectivo Ac [3]. O biossensor que utiliza como receptor um Ac ou um Ag é denominado imunossensor [56].

### **2.2.3. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE BIOCOMPONENTES**

Várias técnicas de imobilização de biocomponentes – mais particularmente de enzimas e anticorpos – têm sido desenvolvidas: encapsulação, ligação covalente, adsorção e *entrapment* [22].

Em um biossensor a biomolécula incorporada atribui um alto grau de seletividade, porém é vulnerável a condições extremas do meio, tais como temperatura, pH e força iônica [57]. A maioria dos biocomponentes apresenta um curto período de meia-vida quando em solução. Devido a isto, estes devem ser estabilizados em uma matriz adequada. A imobilização do biocomponente resulta em um decréscimo de sua atividade [58], porém prolonga o tempo de meia-vida. A atividade do biocomponente imobilizado depende da área superficial, porosidade e caráter hidrofílico da matriz, assim como das condições da reação e método de imobilização. Em alguns casos o próprio produto de reação pode causar o decréscimo da atividade de reação (auto-inativação): Bourdillon *et al.* mostra como a enzima GOx pode sofrer inativação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado na reação com a glicose [59].

Como a estabilidade é um dos principais problemas que afetam o potencial comercial, uma grande variedade de técnicas tem sido investigada para a produção de biossensores mais estáveis [60, 61]. As técnicas utilizadas para a imobilização de biocomponentes são bastante diversificadas. Entre as mais destacadas, pode-se citar a adsorção física, a ligação cruzada, a ligação covalente, a imobilização em gel e a imobilização em matriz polimérica [62]. No entanto, a maioria destes procedimentos

convencionais apresenta baixa reprodutibilidade assim como baixo controle de deposição espacial [34].

#### 2.2.3.1 ADSORÇÃO

A adsorção consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão, do eletrodo a esta solução [10]. Proporciona incorporação simples e rápida do composto em uma ampla gama de eletrodos base e é bastante empregada, dada sua simplicidade e eficiência em muitos casos. No entanto apresenta a desvantagem de produzir no máximo uma monocamada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear. Como a adsorção é um processo de equilíbrio, pode haver a ocorrência de dessorção do modificador para o meio durante a sua utilização, resultando na perda de reprodutibilidade e redução da vida útil do sensor preparado por este método [10].

#### 2.2.3.2 LIGAÇÃO COVALENTE

Este método consiste na formação de uma ligação entre o agente modificador e o substrato, incorporando de forma estável o agente modificador através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo. Reações de silanização, envolvendo organosilanos e óxidos presentes na superfície do eletrodo são bastante exploradas. Os eletrodos metálicos oxidados em meio ácido são recobertos com uma fina camada de óxido. Após a silanização este eletrodo pode reagir com outra molécula, levando à incorporação do grupo funcional que se queira imobilizar, ligado covalentemente [10].

A imobilização via ligação covalente é bastante estável em relação aos demais métodos, contudo, se comparado à adsorção, requer maior tempo para ser realizado e é mais difícil de ser executado, gerando também cobertura máxima de uma monocamada. Seu emprego é de especial interesse para a imobilização de enzimas, sendo amplamente empregado nesta área [10].

### 2.2.3.3 FILMES OU MATRIZES POLIMÉRICOS(AS)

Este método é baseado na imobilização do biocomponente durante o crescimento de polímeros gerados por oxidação eletroquímica do monômero em solução com o biocomponente [31]. Os polímeros cujos monômeros são solúveis em água são mais utilizados, pois apresentam a vantagem de não denaturarem enzimas. Além disso, o procedimento de imobilização em uma etapa permite a fácil funcionalização da superfície de eletrodos, assim como o controle eletroquímico da espessura do filme polimérico [31].

Ao contrário das técnicas vistas anteriormente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, com o recobrimento com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica. Os filmes poliméricos ainda oferecem a vantagem de proteger a superfície do sensor contra impurezas, bloquear interferentes, permitir alta velocidade de transferência de elétrons e fornecer biocompatibilidade.

No entanto este método sofre algumas limitações: é necessária uma grande quantidade do biocomponente em solução para que a imobilização seja perceptível. E embora a quantidade de polímero depositada possa ser controlada, segundo alguns autores [34, 31] a quantidade de enzima imobilizada na matriz polimérica não pode ser estimada.

## 2.3. BIOSSENSORES

### 2.3.1. INTRODUÇÃO

A progressiva expansão de pequenos dispositivos capazes de monitorar a saúde, os alimentos, o meio ambiente e diversas novas aplicações que vêm surgindo a cada dia tem causado uma verdadeira revolução no cenário científico, comparável, segundo especialistas, à dos microprocessadores. Os biossensores prometem ser uma forma simples, compacta, rápida e acessível no ramo da detecção química, bioquímica e imunológica.

Investigações sobre biossensores podem ser encontradas em diversas revistas e jornais científicos, visto a multidisciplinaridade do tema. O desenvolvimento desta área iniciou-se em meados da década de 80, sendo hoje motivo de diversas patentes publicadas e encontrando-se em plena etapa de expansão comercial, com investimentos milionários no setor.

O que difere os biossensores dos sensores comuns é a presença de um elemento biológico, o qual é o responsável pela identificação do analito. Este elemento (o qual pode ser uma célula, tecido, anticorpo, enzima ou uma combinação destes [47]) é rigorosamente seletivo, mesmo sem etapas de separação no preparo da amostra. Devido a isto, denominou-se este princípio de “princípio chave-fechadura”, ilustrada pela Figura 8.

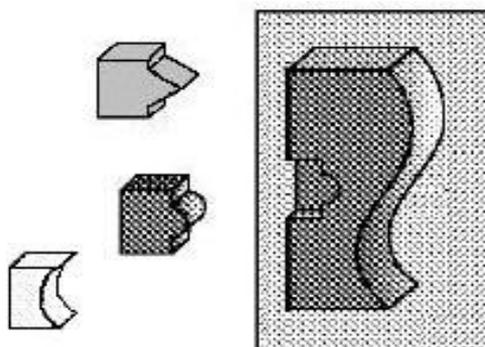


Figura 8 – Representação gráfica do “Princípio Chave-fechadura” [17].

O papel crescente da tecnologia dos biossensores está estimulando a pesquisa para a criação de sensores novos e o desenvolvimento dos já existentes [63], chamando a atenção dos laboratórios para a descentralização das aplicações clínicas: por tratar-se de um dispositivo de fácil confecção, sensibilidade elevada, portáteis e de resposta rápida, possibilitando o diagnóstico o paciente no local de atendimento ou em salas de emergência (por exemplo, para saber a natureza da droga em pacientes com suspeita de overdose); monitoramento contínuo em leitos de pacientes, graças aos mecanismos eletroquímicos de transdução; e kits de autodiagnóstico (*home self testing*), como os utilizados para a quantificação de glicemia, já bastante conhecidos no mercado.

Por estes fatores, os biossensores tornaram-se rapidamente uma nova tendência na tecnologia de diagnósticos. Com a aplicação dos biossensores é possível simplificar qualquer análise química que utilize como detector um organismo capaz de ser imobilizado, reduzindo o custo e o tempo de análises para as quais eram necessários equipamentos robustos e/ou procedimentos complexos. Por exemplo, a DBO (demanda bioquímica de oxigênio), a qual estima a quantidade de matéria orgânica que pode ser degradada facilmente pelos microorganismos presentes na água: pelo método padrão, são utilizados ensaios de pelo menos três dias de duração, enquanto que um biossensor desenvolvido de células microbianas e um eletrodo detector de oxigênio, pode obter este resultado em aproximadamente uma hora [64].

Detecção de micróbios [64], análises de microorganismos patogênicos e monitoramento de alimentos [16, 20, 65, 66, 67], análise de água potável [68], medicina preventiva [69, 70], análises clínica [71, 72, 73], monitoramento de drogas terapêuticas [74], identificação de drogas ilícitas [75], veterinária, controle de processos [76] e aplicações industriais – como os processos fermentativos [77, 78] e controle de qualidade [79, 80], controle da poluição em rios [81], reconhecimento do DNA para identificação e controle de alimentos e outras aplicações [82, 83, 84, 85], análise contínua dos nutrientes e pesticidas no solo para agricultura [42, 86, 87] e outras aplicações de cunho ambiental [43, 81, 82, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94].

O exemplo mais conhecido e mais bem-sucedido de um biossensor é a medida da glicose no sangue de pacientes diabéticos. Trata-se de um dispositivo menor que um

telefone celular, o qual utiliza a enzima GOx immobilizada como elemento de reconhecimento. Com apenas uma gota de sangue sobre tiras descartáveis o paciente tem a leitura de sua glicemia. O próximo passo desta inovação consiste em produzir o chamado “pâncreas artificial”: como alguns modelos de biossensores apresentam um tempo de meia-vida relativamente longo, tendo-se exemplos de biossensores enzimáticos com  $t_{1/2}$  de até 3 semanas [15], desenvolveu-se um sistema no qual um biossensor de glicose é introduzido na região sub-cutânea (biossensor implantável tipo agulha, para monitoramento *in vivo*), e este monitora a taxa de glicose, liberando sistematicamente por um sistema de *feedback* a dose de insulina precisamente necessária para o bem estar do paciente [42, 74].

Enfim, as expectativas futuras são promissoras, mostrando possíveis soluções para problemas bastante atuais, e não será nenhuma surpresa quando surgir, em um futuro próximo, sistemas de identificação do DNA – atingindo casos cotidianos, como exames de paternidade, identificação pessoal em aeroportos, fronteiras e sistemas de segurança – baseados na tecnologia dos biossensores, saindo dos limites dos laboratórios e hospitais para influenciar na vida da sociedade como um todo.

### **2.3.2. CONCEITOS E DEFINIÇÕES**

Biossensores são dispositivos analíticos que quantificam uma substância presente de forma seletiva, convertendo a concentração desta em uma grandeza capaz de ser medida pela combinação de um sistema de reconhecimento biológico e um transdutor físico-químico. A princípio, é possível construir um biossensor para qualquer molécula orgânica capaz de interagir com uma espécie biológica. Das várias definições encontradas, a que parece mais completa, citada por Lowe, define biossensores como: "uma ferramenta ou sistema analítico que consiste em um material biológico immobilizado em contato íntimo com um dispositivo adequado de transdução o qual converte o sinal bioquímico em um sinal elétrico quantificável" [47].

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

Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) criou algumas definições, classificações e nomenclaturas, as quais definem biossensor eletroquímico como "um dispositivo integrado auto-referente (self-contained), capaz de fornecer informação analítica específica, quantitativa ou semiquantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), o qual é mantido em contato espacial direto com um elemento de transdução eletroquímica" [95, 96]. O receptor e o transdutor são as principais etapas do processo de detecção em biossensores [97], como mostra a Figura 9.

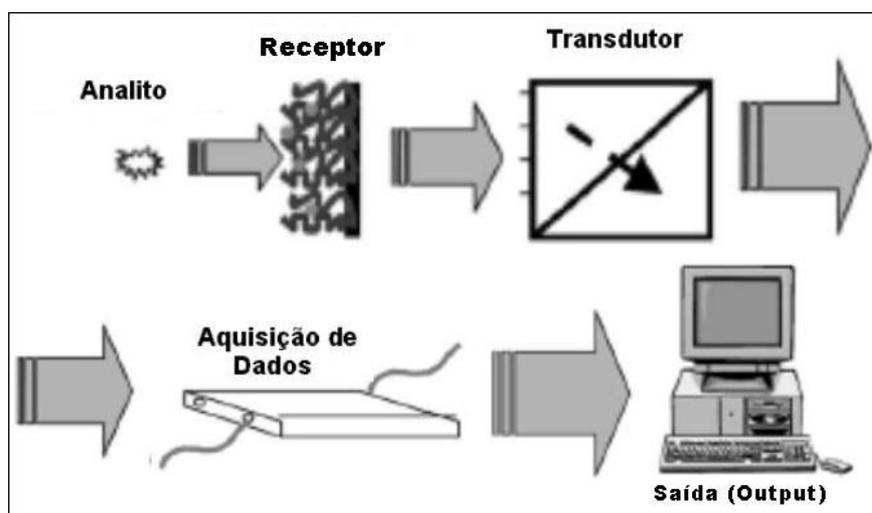


Figura 9 – Principais etapas do mecanismo de operação de um biossensor [35].

### 2.3.2.1 RECEPTOR

O receptor é o elemento biologicamente ativo, o qual interage de forma específica e reversível com o analito, gerando uma alteração em um ou mais parâmetros físico-químicos associados com esta interação. Esta alteração pode produzir íons, elétrons, gases, luz ou calor. O receptor é responsável pelo reconhecimento do analito e também pela especificidade e sensibilidade do sensor [13].

Nos sensores em geral, como receptor pode ser utilizado qualquer substância ou sistema capaz de detectar o sinal bioquímico [96]. Porém quando se trata de biossensores, o receptor deve ser por definição um elemento vivo (do latim, bio - vida), o qual pode ser uma célula, organela, enzima ou anticorpo, entre outras inúmeras possibilidades. Até

mesmo animais inteiros ou partes de animais têm sido empregadas para este fim. Alguns estudos mais recentes mostram a utilização de antenas de insetos como receptores adaptados em transistores de efeito-de-campo (field-effect transistors), os chamados BioFET (Biologically sensitive FET) [97, 98, 99, 100], e de sistemas olfativos completos, chamados de “Narizes eletrônicos” [101, 102], adaptados a diversos tipos de mecanismos de transdução, [17].

Estas biomoléculas ou sistemas biológicos têm uma habilidade intrínseca de reconhecer suas contrapartes: uma enzima reconhece seu substrato e um anticorpo liga-se seletivamente ao seu antígeno correspondente. A finalidade destas é reagir com o analito, gerando uma espécie capaz de ser detectada pelo transdutor. Por exemplo: em um biossensor enzimático amperométrico, uma enzima gera através da reação catalítica uma espécie redox ativa em relação estequiométrica com o substrato [33]. Esta espécie redox é então detectada pela transferência de elétrons (corrente) gerada por sua oxidação ou redução eletroquímica.

Em relação ao sistema de reconhecimento biológico os biossensores podem ser classificados em duas categorias: os biossensores biocatalíticos e os biossensores por bioafinidade [48].

#### 2.3.2.2 TRANSDUTOR

O transdutor é o elemento que recebe as perturbações do processo biocatalítico - geradas pela interação receptor-analito e converte-as em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado [13]. O sistema de transdução deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse [11].

Entre os transdutores físicos pode-se citar os potenciométricos (que convertem o sinal biológico em um potencial elétrico), amperométricos (convertem o sinal biológico em corrente elétrica), ópticos (provocam um desvio no caminho óptico ou variação de absorvância relacionada com a presença do analito), condutimétricos (alteram a condutividade elétrica do substrato), calorimétricos (alteram a entalpia de reação do

substrato), termométrico (a detecção do analito gera uma variação de temperatura), entre outros. Dentre os biossensores eletroquímicos, os mecanismos de transdução amperométrico e potenciométrico são os mais utilizados [42].

O design do transdutor deve ser altamente específico para o analito de interesse e responder em uma faixa de concentração apropriada, ter um tempo de resposta baixo, apresentar a possibilidade de miniaturização e compensar efeitos externos (como temperatura e umidade) com o propósito de ser utilizado em aplicações práticas.

### **2.3.3. CLASSIFICAÇÃO DE BIOSENSORES**

Em estudos sobre biossensores são encontradas definições como biossensor amperométrico enzimático [23, 108, 103, 104], imunossensor (biossensor que utiliza anticorpos como receptores) amperométrico [67, 68] e biossensor de DNA (baseados nos diferentes modos de interação de ácidos nucleicos) [82, 83, 84, 85].

Segundo as recomendações das divisões de Físico-química e Química Analítica da IUPAC (comissões de Química Eletroanalítica e Biofísica) para definição, classificação e nomenclatura de biossensores eletroquímicos, os biossensores podem ser classificados de acordo com a especificidade biológica que confere o mecanismo de reconhecimento, ou pelo modo de transdução do sinal, ou, alternativamente, considerando-se que o reconhecimento biológico e o mecanismo de transdução podem ser integrados em biossensores de diversas formas, por uma combinação dos dois [95].

#### **2.3.3.1 QUANTO AO ELEMENTO DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO**

A operação do biossensor é baseada no tipo de interação do analito com o receptor imobilizado, isolado do seu meio biológico original. Desta forma não há o consumo líquido do analito. A resposta, transiente ou em estado estacionário, é monitorada pelo detector integrado.

#### 2.3.3.1.1 *Reconhecimento por biocatálise*

O biossensor biocatalítico é baseado em uma reação catalisada pelo componente biológico, o qual está presente em seu meio original, apenas previamente isolado ou produzido. Três tipos de biocatalisadores são comumente utilizados: enzimas, células e tecidos. Os biossensores enzimáticos são os mais conhecidos e estudados atualmente e têm sido com maior frequência aplicados em matrizes biológicas [95]. Compreende uma membrana na qual a enzima é imobilizada mantendo suas propriedades ativas e reconhecendo o analito a ser analisado de forma seletiva [14]. Estão se tornando muito úteis em aplicações analíticas, devido à possibilidade de se combinar a seletividade e sensibilidade da enzima com a simplicidade dos transdutores eletroquímicos [10].

#### 2.3.3.1.2 *Reconhecimento por bioafinidade ou biocomplexidade*

Biossensores por bioafinidade, de outra forma, envolvem anticorpos e/ou antígenos, ligação protéica ou receptor protéico, o qual forma um composto complexo com o correspondente ligante. Este complexo é estável o bastante para resultar em um sinal de transdução [48].

Os mais desenvolvidos exemplos de receptores biocomplexos são os imunossensores [14]. O princípio básico de todos os imunossensores é a especificidade do reconhecimento molecular de antígenos por anticorpos formar um complexo estável, de forma similar à metodologia dos imunoenaios [105]. Resultam em sensores altamente seletivos, baseados nos princípios de fase sólida de imunoenaios e nos eventos físico-químicos resultantes da interação anticorpo - antígeno [10].

Diversos métodos de imobilização foram relatados para o desenvolvimento de técnicas de ligação antígeno-anticorpo para aumentar a sensibilidade da detecção ou para a ligação covalente do anticorpo ou da proteína na superfície [106].

#### 2.3.3.2 QUANTO AO MECANISMO DE TRANSDUÇÃO

A diferença básica entre os mecanismos de transdução é a natureza do sinal de saída para o qual este sistema converte o sinal biológico, podendo ser esta qualquer

propriedade física mensurável, como as várias descritas anteriormente. Entre os três tipos de biossensores eletroquímicos – amperométricos, potenciométricos e condutimétricos, estes últimos usualmente são não-específicos e têm uma pobre razão sinal/ruído [10]. As técnicas amperométricas e potenciométricas têm sido mais empregadas por apresentarem maior sensibilidade [14].

Dentre outras vantagens dos biossensores amperométricos e potenciométricos quando comparados a outros sistemas de transdução, pode-se citar a facilidade de construção, baixo custo e estabilidade, enquanto que os problemas mais freqüentes são a velocidade de resposta e a interferência e/ou inibição por substâncias não-específicas presentes na amostra [77].

#### 2.3.3.2.1 *Biossensores amperométricos*

Um biossensor amperométrico mede a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou reagente usualmente sob um potencial constante aplicado [11].

A quantificação é estabelecida pela relação entre a concentração da espécie eletroativa (analito) e a corrente produzida no potencial aplicado. A escolha deste potencial é um meio de tornar este mecanismo mais seletivo, favorecendo a reação desejada ou até mesmo impedindo a ocorrência de reações paralelas.

O método amperométrico pode fornecer sensibilidade de até  $10^{-8}$ M em análises de espécies eletroativas presentes em amostras biológicas. Muitas moléculas deste tipo, incluindo proteínas, não são intrinsecamente eletroativas e não podem então ser detectadas diretamente. O uso das enzimas que catalisam reações redox específicas facilita a produção de espécies eletroativas, possíveis então de serem determinadas eletroquimicamente.

O fator mais importante que afeta o funcionamento deste tipo de biossensor é a transferência de elétrons entre o receptor, geralmente uma enzima do tipo oxidase ou peroxidase, e a superfície do eletrodo. Este fenômeno muitas vezes envolve um mediador, que é uma substância capaz de incrementar a sensibilidade do biossensor [19], um

polímero condutor ou ambos, quando o polímero desenvolve um papel passivo no processo de mediação, o que depende da técnica utilizada para a imobilização [19].

Isto afeta significativamente a resposta do biossensor amperométrico, pois a condutividade e a interação da matriz com a enzima (um mecanismo ainda não explicado completamente) é fator chave na difusão e transferência eletrônica. Um modelo o qual mostra as etapas da difusão eletrônica em biossensores amperométricos é mostrado na Figura 10.

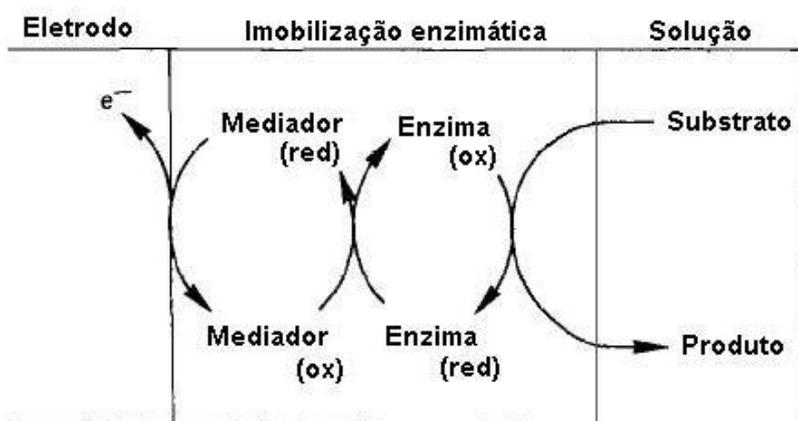


Figura 10 – Modelo das etapas da difusão eletrônica para o processo de detecção em biossensores amperométricos descrito por Davis [33].

#### 2.3.3.2.2 *Biossensores potenciométricos*

Os dispositivos potenciométricos operam sob o princípio de acumulação de densidade de cargas na superfície do eletrodo [47] sem que haja um fluxo de corrente [42]. Estas cargas resultam na formação de uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar que, na condição de equilíbrio, é proporcional ao logaritmo da atividade iônica do analito presente na amostra, medido em relação ao eletrodo de referência, também em contato com a amostra [42].

O transdutor pode ser um eletrodo íon-seletivo, que é um eletrodo eletroquímico baseado em filmes finos ou em membranas seletivas como elemento de reconhecimento [95]. As condições potenciométricas são recomendadas quando a espessura do filme é um

fator importante, pois facilitam o controle na obtenção de filmes finos [1]. O medidor de pH é o mais conhecido entre os dispositivos potenciométricos. Os íons em solução são quantificados pela mudança no potencial causada pela ligação seletiva de íons a uma membrana. Os íons mais comuns detectados por potenciometria, além do  $H^+$ , são o  $F^-$ ,  $I^-$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $CN^-$ .

#### 2.3.3.2.3 *Outros tipos de biossensores*

Mesmo com o grande desenvolvimento e eficiência dos dois métodos de transdução descritos anteriormente, muitos outros têm sido estudados. Os diversos parâmetros físico-químicos possíveis de serem medidos em reações de sistemas biológicos permitem que uma reação seja monitorada por mais de um transdutor ao mesmo tempo, sendo o número de mecanismos de transdução possíveis para tal qual o número de parâmetros significativamente alterados por esta. Uma maior atenção é voltada para os sensores capazes de explorar mudanças em prótons, gases, íons específicos, densidade óptica e fluxo elétrico causados por enzimas devido à facilidade de trabalhar-se com estas.

Praticamente todas as reações biológicas podem ser monitoradas pela determinação do calor envolvido no processo biocatalítico. Esta aproximação é independente das condições da amostra, pode ser aplicada a qualquer tipo de receptor biológico e não exige acoplamento ou sistema de amplificação. Por exemplo, um sistema biocatalítico imobilizado em contato com um transdutor termométrico resulta em um biossensor capaz de medir o calor produzido no contato com a amostra [30].

Outro princípio de medição alternativo quase que universal, sendo aplicável a muitos tipos de receptores biológicos, é o de condutância iônica. Enzimas como a urease geram produtos iônicos ( $NH_4^+$ ,  $HCO_3^-$ ) a partir de substratos neutros (uréia). Há assim o aumento de cargas iônicas na solução e conseqüentemente da sua condutância, podendo então esta ser monitorada [47].

Os biossensores ópticos também têm recebido uma atenção considerável devido às vantagens do uso com fibras ópticas associadas a transdutores ópticos ou óptico-eletrônicos para medida de reações biológicas [42]. A emissão de luz de um elemento

biológico ou a sua resposta à luz pode ser monitorada pela fibra ou outro dispositivo óptico, enquanto que substâncias foto-sensíveis e fibras ópticas quimicamente sensibilizadas são usadas como receptores.

#### *2.3.3.2.4 Comparação entre o método potenciométrico e amperométrico*

Em geral as vantagens dos métodos amperométricos e potenciométricos são: facilidade de construção, baixo custo e estabilidade [77]. Entre estes dois métodos, a amperometria é mais utilizada em biossensores do que o método potenciométrico [103], embora em alguns casos especiais a potenciometria apresente algumas vantagens [11], em geral os sensores amperométricos apresentam uma maior velocidade de resposta, sensibilidade e precisão que o potenciométrico, pois não é necessário aguardar que um estado de equilíbrio seja atingido para a obtenção de dados, além de apresentarem resposta linear em uma faixa relativamente mais ampla [10, 74].

Uma melhor explicação do efeito do estado de equilíbrio sobre a performance do biossensor pode ser feita para os dois métodos: na potenciometria a concentração no estado estacionário é cineticamente determinada e sofre uma forte influência do transporte de massa do substrato e do produto tanto no sensor como na solução, assim como das suas concentrações nesta. Conseqüentemente, no método potenciométrico a importância da velocidade de reação e estabilidade dos eletrodos de referência é maior [103].

No método amperométrico, a taxa de reação da enzima é monitorada diretamente pela transferência de elétrons sem que haja acúmulos de cargas na superfície do eletrodo ou grandes diferenças de densidades de carga na solução. Isto faz com que a influência do transporte de massa diminua bastante e permite que o estado de equilíbrio seja atingido mais facilmente, sendo menos influenciado por agitação do meio, densidade, e propriedades físico-químicas do fluido [103]. Precisamente falando, o estado estacionário é apenas uma suposição teórica e o que ocorre é a detecção em um estado intermediário entre o estacionário e o transiente [95].

A principal vantagem do método amperométrico é que este pode fazer uso do potencial para direcionar a reação e garantir a formação do produto desejado quando o

sistema for susceptível a outras espécies eletroativas, principalmente em potenciais elevados [107]. A preocupação com a formação do produto é minimizada, assim como reações lentas podem ser aceleradas pela aplicação de sobrepotencial [103]. Por sua vez, o método potenciométrico não conta com a corrente como uma variável capaz de influenciar na reação.

### 2.3.3.3 CRITÉRIOS DE DESEMPENHO DE BIOCENSORES

As propriedades de um biossensor são conferidas principalmente pelo seu receptor, mas são influenciadas por uma série de fatores, tais como o método de imobilização, concentração do biocomponente imobilizado e condições eletroquímicas. As propriedades principais de um biossensor são a seletividade, sensibilidade e estabilidade [17], sendo os problemas mais freqüentes relacionados a estas, tais como:

- (i) estabilidade funcional limitada do receptor;
- (ii) baixa estabilidade mecânica e resistência à difusão (aumento da concentração causa aumento na espessura da camada) causada pela matriz utilizada para imobilizar o receptor [108];
- (iii) presença de sinais causados por interferentes, gases dissolvidos, íons, fenômenos de transferência de elétrons, que, se gerados na proximidade do transdutor, podem ser convertidos a um sinal elétrico.

#### 2.3.3.3.1 *Sensibilidade*

Define-se como sensibilidade a relação entre o sinal de saída (sinal elétrico) e o sinal de entrada (sinal biológico) no transdutor. No caso de biossensores enzimáticos amperométricos, a sensibilidade é a relação entre a corrente medida e a concentração do analito em solução.

A sensibilidade está associada aos parâmetros da construção do biossensor, tais como a concentração do biocomponente imobilizado e a espessura do filme, e pode ser melhorada com o uso de mediadores, os quais substituem o receptor natural de elétrons e permitem trabalhar em potenciais mais baixos, com redução de interferências e ruídos indesejáveis [19].

Geralmente a sensibilidade é utilizada como único critério para a otimização, como as propriedades de um biossensor são interligadas, nem sempre uma maior sensibilidade significa uma condição ótima de trabalho. É preciso avaliar o desempenho do sensor em relação à facilidade de construção, reprodutibilidade, tempo de resposta e estabilidade.

#### 2.3.3.3.2 *Estabilidade*

A estabilidade operacional da resposta do biossensor pode variar de acordo com a geometria do sensor, método da preparação, assim como do receptor e transdutor aplicados e condições operacionais, como concentração do analito, o contato contínuo ou esporádico do biossensor com a solução do analito, temperatura, pH, presença de solventes orgânicos e composição da matriz da amostra.

A estabilidade é um dos principais problemas a serem superados em um biossensor para que este tenha potencial comercial [60], principalmente para aplicações de monitoramento contínuo, por estes não permitirem uma recalibração ou avaliação *in vivo*, como os biossensores implantáveis para medição da concentração de glicose em diabéticos.

Como demonstrado em várias aplicações experimentais, a confiabilidade na medição de biossensores enzimáticos é frequentemente afetada pela diminuição progressiva da sensibilidade do sensor. Embora alguns biossensores sejam relatados como utilizáveis em condições de laboratório por mais de um ano, o tempo de meia-vida na prática é desconhecido ou limitado a dias ou semanas quando estes são introduzidos em processos industriais ou outras aplicações práticas [95].

A estabilidade é medida em termos de atividade relativa – atividade do biossensor em relação à atividade do biossensor recém produzido em termos percentuais. O biossensor é considerado estável quando esta resposta (para um biossensor amperométrico, é a relação corrente elétrica x concentração do analito) atinge um platô, como mostra a Figura 11.

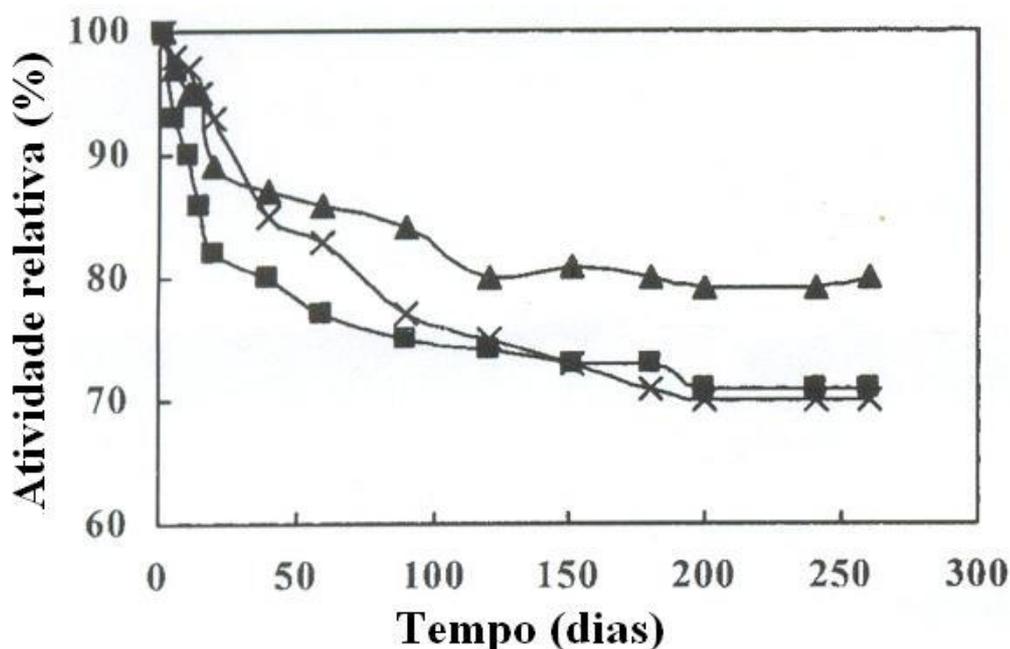


Figura 11 – Estudo da estabilidade de um biossensor enzimático amperométrico [15].

Além do método de imobilização, o material do eletrodo, a frequência de monitoramento/ utilização e as condições nas quais o biossensor é armazenado entre os ensaios (seco, imerso em água ou em solução de tampão salino), são alguns fatores que influenciam no tempo de meia-vida. Neste aspecto há diversas conclusões encontradas na literatura:

Razola *et al.* ao estudar a imobilização da HRPO concluiu que a melhor condição de estabilidade foi obtida mantendo os biossensores em tampão-fosfato, pH 6,2, à temperatura de 5 °C, obtendo uma resposta de 90% em relação à inicial 35 dias após a confecção dos biossensores, enquanto que quando secos, expostos à mesma temperatura e em contato com o ar, a sensibilidade caía significativamente [14], o que concorda com Tatsuma, o qual afirma que a exposição ao ar pode causar diminuição da sensibilidade pela desativação da enzima ou por oxidação do filme de PPy [109].

Fiorito *et al.* utilizou-se de condições semelhantes às de Razola para a conservação de GOx imobilizada (tampão-fosfato pH 7,0; 4°C) e conseguiu uma estabilidade de 75% entre o terceiro e o oitavo dia. Após este período o sinal ficou muito ruidoso, não sendo possível realizar a leitura [19].

Tais instabilidades de sinal são abordadas por diversas hipóteses. A inibição reversível da enzima [110], o inchamento da matriz polimérica que conduziria à perda do contato elétrico entre o polímero e o substrato [19] e a deterioração do filme de PPy pelo  $H_2O_2$  [14] são alguns dos fatores a serem observados para a otimização do biossensor.

A HRPO tem sido bastante estudada para exemplificar as reações das enzimas peroxidases devido à sua estabilidade por longos períodos à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH [19].

#### *2.3.3.3 Tempo de resposta*

O tempo de resposta é o tempo necessário para que uma variação na concentração do analito seja mensurada como uma variação no sinal de saída do biossensor. Este parâmetro envolve uma série de fatores, incluindo a cinética das reações, a difusão do substrato na solução e a transferência de cargas através da camada enzimática.

A questão cinética é, por natureza, invariável. A difusão do substrato na solução pode ser alterada pela velocidade de agitação, sendo que quanto maior esta for, menor será o tempo de resposta. No caso de medidas amperométricas, as medidas são feitas em estado estacionário, admitindo-se que as espécies eletroativas migrem por difusão até a superfície do eletrodo [108]. A difusão do substrato também ocorre dentro da camada enzimática, sendo este fator influenciado pela porosidade do filme e esta, por sua vez, relacionada com o potencial de oxidação. Filmes mais porosos são obtidos em potenciais de oxidação mais elevados [29].

A transferência de cargas através da camada enzimática é função da espessura, da morfologia e da concentração do biocomponente. Quanto mais espessa for a camada, ou seja, quanto maior a massa de polímero e enzima depositada na superfície do eletrodo, maior a resistência elétrica a ser superada. A concentração do biocomponente também aumenta a espessura da camada enzimática e conseqüentemente o tempo de resposta.

#### 2.3.3.3.4 *Reprodutibilidade*

A reprodutibilidade consiste no potencial de serem obtidos resultados semelhantes a partir de biossensores produzidos sob as mesmas condições. O critério para a avaliação da reprodutibilidade é feito a partir do conhecimento do desvio-padrão obtido entre "n" amostras de cada experimento, e o quanto este é significativo em relação ao valor da média entre os valores.

São observados valores de desvio-padrão bastante baixos em estudos sobre biossensores que fazem referência para o número de amostras utilizado [32, 35, 37, 111], o que é um indício de que estes sejam bastante reprodutíveis.

### **2.3.4. APLICAÇÃO DE POLÍMEROS CONDUTORES EM BIOSSENSORES**

Materiais orgânicos como proteínas, pigmentos e polímeros condutores têm sido considerados como materiais alternativos por apresentarem as mesmas funções de alguns semicondutores mais utilizados [9]. Alguns polímeros como os PPys, politiofenos e polianilinas têm se projetado na aplicação de uma diversa gama de dispositivos molecular-eletrônicos.

As principais razões pelas quais o interesse nos polímeros condutores na aplicação em sensores biológicos, imunológicos e de afinidade biomimética tem aumentado tanto são várias: alguns polímeros condutores (PPy, polianilina e politiofeno) são biocompatíveis, ou seja, causam um mínimo e reversível distúrbio na forma de atuação do biocomponente, visto a infinidade de enzimas e anticorpos que mantêm suas propriedades biológicas ao serem imobilizados em matrizes poliméricas eletropolimerizadas [112, 113, 114, 115], o que é de grande interesse na área da bioquímica.

A matriz polimérica formada no mecanismo de imobilização (*entrapment*) também atua como uma proteção ao biocomponente e à superfície do eletrodo, reduzindo o contato com sujidades ou materiais eletroquimicamente ativos. A imobilização física em filmes poliméricos preserva um melhor acesso do substrato ao biocomponente imobilizado e

facilita a interação macromolecular, embora isto restrinja a quantidade do biocomponente imobilizado ativo a uma monocamada na interface polímero-solução.

O fato de esta matriz ser formada via eletroquímica atribui uma grande vantagem ao método, pois permite uma formação uniforme sobre qualquer superfície, indiferente da forma e tamanho, sendo principalmente aplicável em sistemas miniaturizados. O biocomponente, por exemplo, pode tanto ser imobilizado em um disco para análise *in vitro* como também diretamente em uma agulha para análise *in vivo*.

Enquanto os procedimentos convencionais de imobilização de biocomponentes (ligações-cruzadas, ligação covalente e imobilização em géis ou membranas) sofrem uma baixa reprodutibilidade e controle de deposição espacial ruim, o uso de polímeros condutores para imobilizar biocomponentes em sensores apresenta a vantagem, quando comparado com procedimentos convencionais de imobilização, de permitir que a quantidade de monômero seja controlada pela quantidade de cargas. O número de coulombs transferidos na eletropolimerização, facilmente medidos em um galvanostato, é diretamente relacionado à quantidade de substância eletroativa oxidada, ou seja, é proporcional ao número de monômeros oxidados, formadores da matriz polimérica [71].

Devido a estas propriedades químicas e físicas poderem ser trabalhadas dentro de uma diversificada faixa de características, o uso dos polímeros condutores está encontrando um lugar permanente em dispositivos de medição eletrônicos sofisticados tais como sensores [21], atuando como um meio simples e eficaz para a imobilização de biocomponentes [40]. Devido ao grande avanço na miniaturização e construção de componentes eletrônicos com tempos de resposta extremamente rápidos oferecidos pelas técnicas eletroquímicas, criou-se uma demanda por sistemas bio e imunologicamente sensíveis que pudessem ser integrados a esta tecnologia.

Segundo Cosnier [34], a imobilização estável de biocomponentes macromoleculares em microsuperfícies condutoras, com a retenção completa das propriedades de reconhecimento biológico é um problema crucial para o desenvolvimento comercial de biossensores.

A imobilização de enzimas em filmes eletropolimerizados oferece algumas características bastante atrativas [31], visto que o processo pode ser controlado por instrumentos e ser implementado dentro de uma variedade de microtransdutores [34]. A morfologia do polímero formado pode ser predominantemente controlada pelos parâmetros de síntese como potencial de polimerização, concentração do monômero, natureza/concentração do íon dopante e solvente utilizado [27, 28, 29, 37, 38].

Diversos estudos têm apresentado êxito utilizando polímeros condutores para estabilizar enzimas, anticorpos e outros biocomponentes em diversas configurações de biossensores [30, 54, 113]. Basicamente, este método consiste na imobilização física do biocomponente durante o crescimento do polímero por oxidação eletroquímica de um determinado monômero em solução com a enzima; mecanismo este denominado "*entrapment*" (do inglês, "prender como em uma armadilha") [43, 88], ou por ligações covalentes do componente biológico na rede do polímero funcionalizado [108, 89]. Entre os polímeros condutores, o PPy e seus derivados têm o principal destaque devido à sua versátil aplicabilidade a à grande variedade de espécies moleculares (redox) que podem ligar-se covalentemente ao grupo Py [34].

A imobilização da enzima *HRPO* (HRPO) para a determinação de  $H_2O_2$  foi descrita anteriormente por Razola *et al.* [18] e Tatsuma *et al.* [108]. Uma revisão deste método de imobilização da HRPO foi apresentada recentemente por Gaspar *et al.* [36], acrescentando uma etapa de funcionalização do monômero pirrol com um complexo de Ósmio. A imobilização também é realizada durante a eletropolimerização, caracterizando o método como de única etapa. Segundo o autor, esta funcionalização permite uma sensibilidade significativamente maior à redução do  $H_2O_2$  se comparado com os biossensores baseados na imobilização da HRPO até então.

O mecanismo pelo qual a HRPO imobilizada no eletrodo com PPy responde ao  $H_2O_2$  ainda é um assunto de controvérsias: a transferência eletrônica direta entre o filme de PPy e a HRPO oxidada ou a transferência eletrônica mediada por oligômeros remanescentes no filme de PPy são alguns postulados atuais [14].

Segundo estes, durante o processo de eletropolimerização as partículas do biocomponente mais próximas do eletrodo seriam incorporadas durante o crescimento do polímero. A imobilização destas moléculas ocorre sem qualquer interação química que possa afetar a sua atividade. Para biossensores de imobilização enzimática, denomina-se camada enzimática o filme constituído da matriz polimérica e da enzima imobilizada.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Para o preparo de soluções foram utilizados os seguintes reagentes:

Monômero pirrol 99% p.a. (Acros). Este é utilizado previamente destilado e estocado à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  em atmosfera de nitrogênio.

Tampão fosfato salino (Phosphate-buffer saline – PBS), preparado utilizando os sais dihidrogeno-fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e hidrogeno-fosfato disódico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), ambos da MERCK, sendo o pH aferido por um pH-metro devidamente calibrado.

Enzima Horseradish Peroxidase (HRPO - EC 1.11.1.7 tipo II), cedida pela FK Biotecnologia, utilizada em solução com tampão fosfato salino (PBS) 0,1M pH 7,2.

Albumina bovina sérica (bovine serum albumine – BSA), devido a sua não-especificidade à HRPO, foi utilizada como agente de controle da imobilização de biocomponentes.

Anticorpo monoclonal anti-peroxidase V3.5R3, utilização para a imobilização em matriz polimérica, formando o substrato para inoculação da HRPO, gentilmente cedido pela empresa FK biotecnologia.

Tetrametilbenzidina (TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina – Exalpa Biologicals, Inc.), substrato para imunoenaios enzimáticos de amostras da HRPO. Este sistema desenvolve uma coloração azul como produto da reação com conjugados da peroxidase.

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% p/p (Fisher Scientific). Devido à instabilidade desta substância, estas soluções eram feitas diariamente e mantidas em banho de gelo durante o uso.

Perclorato de lítio ( $\text{LiClO}_4$ ) anidro (Ventron Alfa Inorganics, MA, EUA), utilizado como dopante na polimerização e como eletrólito no Teste de Sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (TSP), o qual avalia a performance do biossensor.

Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  - MERCK) diluído, utilizado na limpeza eletroquímica dos eletrodos quando os eletrodos apresentavam traços de polímero mesmo após a retirada do filme e polimento e para parar as reações com o TMB.

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente.

Demais materiais foram utilizados para a construção das microcélulas, discos e eletrodos, tais como fios e redes de platina, resina auto-polimerizável, papéis abrasivos, pasta de Alumina, arames de prata e suportes de polipropileno.

### **3.2. EQUIPAMENTOS**

Para o estudo dos parâmetros de confecção dos biossensores e detecção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram utilizados os seguintes equipamentos:

#### **3.2.1. ENSAIOS ELETROQUÍMICOS**

Todos os experimentos eletroquímicos (voltametria cíclica, eletropolimerização e amperometria) foram realizados em um potenciostato EG&G PAR 273 com o auxílio do software SAD 32 (Sistema de Aquisição de Dados), desenvolvido pelo Laboratório de Medições Mecânicas da UFRGS.

#### **3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO**

Os espectros vibracionais de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) *ex-situ* foram obtidos com o preparo das amostras em pastilhas de KBr a 1%. O espectrômetro utilizado foi um modelo Spectrum 1000 da marca Perkim Elmer, do Laboratório de Materiais Poliméricos - UFRGS.

### **3.3. CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS E MONTAGEM DAS MICROCÉLULAS**

Os eletrodos utilizados e as células eletroquímicas foram construídos da seguinte maneira:

### 3.3.1. ELETRODOS DE TRABALHO (ET)

Os ET's são compostos de fios de platina de 12 mm de comprimento x 1,47 mm de diâmetro ( $\varnothing_{\text{médio}}$ ) ( $A=0,01697\text{cm}^2$ ) embutidos em resina auto-polimerizável e cuidadosamente lixados em papéis abrasivos de mesh até 1200 até ficarem com a área transversal exposta. Antes de cada experimento eletroquímico era realizado um polimento em feltro com pasta de Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) de granulometria igual a  $4\mu\text{m}$  dissolvida em água, seguido de lavagem com água deionizada [33,39].

#### 3.3.1.1 LIMPEZA ELETROQUÍMICA

Utilizou-se o procedimento de limpeza eletroquímica descrito na literatura [24, 112], o qual consiste em submeter os eletrodos de platina a ciclos potenciométricos de  $-1000$  a  $+1000$  mV em solução de ácido sulfúrico 1M até serem obtidos voltamogramas constantes. Este processo é utilizado para retirar resíduos de outros metais e/ou de alumina provenientes de polimerizações anteriores, lixamento e polimento dos eletrodos.

### 3.3.2. ELETRODOS DE REFERÊNCIA (ER)

Os eletrodos de referência utilizados são do tipo prata/ cloreto de prata. Conforme visto na literatura [25, 39], são dispositivos confiáveis, fáceis de preparar e possíveis de serem utilizados em células de pequeno porte.

Para a confecção dos ER's utilizou-se fio de prata (99%,  $\varnothing = 0,4\text{mm}$ ), o qual foi recoberto com cloreto de prata ( $\text{AgCl}$ ) por polarização em voltametria cíclica de  $-100$  mV a  $+500$  mV a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  em solução saturada de cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ) até ser obtido um potencial estável de  $-0,044 \text{ V}$  ( $\pm 0,002 \text{ V}$ ) contra um Eletrodo de Calomelano Saturado (SCE), o que era testado diariamente.

Todos os valores de potencial apresentados neste trabalho são em relação a este tipo de eletrodos de referência.

### 3.3.3. CONTRA-ELETRODOS (CE)

Para a construção dos CEs, ou eletrodos auxiliares, foram utilizados fios flexíveis ( $\emptyset = 0,4\text{mm}$ ) e rede de platina nas duas células eletrolíticas montadas. A eficiência destes eletrodos está relacionada com a condição de apresentarem área maior que a dos ET's para que a reação estudada no eletrodo de trabalho seja a limitante da corrente [13], o que foi rigorosamente observado.

### 3.3.4. CÉLULAS DE TRÊS ELETRODOS

Foram montadas duas células de três eletrodos em suporte de polipropileno: uma de volume igual a 200  $\mu\text{L}$ , esquematizada conforme mostra a Figura 12, utilizada para as eletropolimerizações e outra de 1000  $\mu\text{L}$  [33] para os testes amperométricos de resposta do biossensor à concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ambas foram desenvolvidas da mesma forma e são compostas de um CE e de um ER, conforme descrito anteriormente. Os ETs não são fixos às células, sendo presos a um suporte com fixação para haste e prendedores de contato.

A tampa um tubo de *ependorf* (1,5 mL) foi utilizada como base para a célula de 200 $\mu\text{L}$ . Como CE foi utilizado um fio de Pt de 0,5 mm de diâmetro e como ER um fio de prata de 0,3 mm, ambos fixados com resina auto-polimerizável.

A célula de 1000  $\mu\text{L}$  é utilizada para as análises de sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  por duas razões: maior diluição e controle da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante as adições e necessidade de utilizar agitação no sistema, realizada por micropipetas [112], o que exige que haja determinado espaço entre as paredes externas do eletrodo de trabalho e os limites da célula.

Também foi utilizada uma célula maior, de capacidade de 20 mL, para a obtenção de material o suficiente para a realização de análises de Infravermelho (FTIR). Nestes experimentos foram utilizadas placas de platina como eletrodos de trabalho e contra-eletrodos e um eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) como referência.

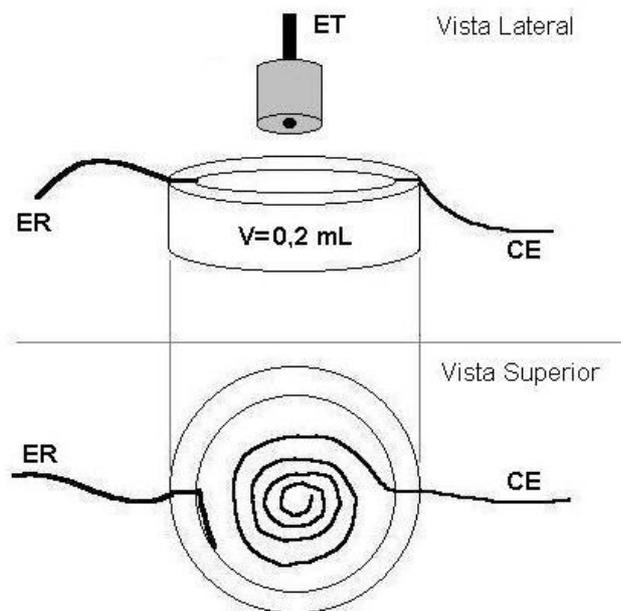


Figura 12 – Esquema da microcélula de três eletrodos utilizada. A reação ocorre entre a superfície exposta do ET (Pt) e o CE (Pt), sendo monitorada pelo ER ( $\text{Ag}^+$ ). A imobilização da enzima e formação do polímero é verificada no ET. O CE é disposto de forma equidistante ao ET para manter a uniformidade do filme.

### 3.4. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA – PREPARO DO BIOSENSOR

A imobilização da enzima HRPO foi realizada durante a eletropolimerização do Py [31], o qual consiste em submeter uma solução contendo o monômero, enzima e o eletrólito a um potencial acima do potencial de oxidação do monômero em uma célula de três eletrodos.

Desta forma o monômero é oxidado pela diferença de potencial e dopado pelo ânion do eletrólito, formando uma rede polimérica sobre a superfície do eletrodo. A enzima é fisicamente aprisionada durante a formação desta rede e, devido às propriedades condutoras dos PICs, esta mantém o contato eletrônico entre a enzima e o eletrodo. A confecção do biossensor é realizada em uma única etapa. Este método é conhecido como “*entrapment*”.

A detecção do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é realizada através dos sítios ativos livres da enzima HRPO, como mostra a Figura 13:

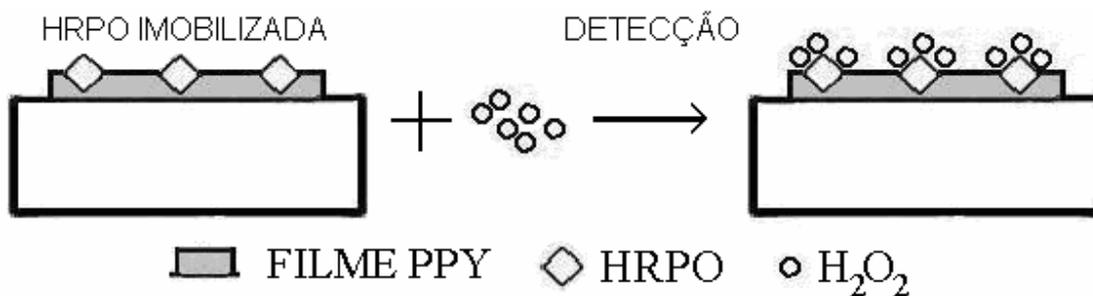


Figura 13 – HRPO imobilizada de forma direta em matriz polimérica – método de *entrapment* – e a detecção de  $H_2O_2$ .

Segundo Razola *et al*, este processo de imobilização da HRPO em meio com  $LiClO_4$  para a detecção de  $H_2O_2$  [14], tem como valores ótimos dos principais parâmetros de imobilização os mostrados na Tabela 1:

Tabela 1 – Condições ótimas dos parâmetros eletroquímicos para a imobilização da HRPO em PPy segundo Razola [18], considerando como critério de eficiência a corrente obtida da reação com  $H_2O_2$ .

Parâmetro	Condição de EP
Faixa de Potencial	0,0 a +1000 mV
Velocidade de varredura	10 $mV.s^{-1}$
Concentração do eletrólito	0,1 M $LiClO_4$
Concentração do monômero	0,05 M Py
Concentração da enzima	0,48 $mg.mL^{-1}$
Espessura do filme	3 ciclos de 0,0 a +1000 mV

Estes parâmetros foram utilizados como valores iniciais para o preparo dos biossensores. A influência de cada parâmetro foi investigada.

### 3.5. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA POR ELETROPOLIMERIZAÇÃO

Foram verificadas as influências dos parâmetros eletroquímicos, tais como faixa de potencial, velocidade de varredura e número de ciclos, assim como os parâmetros

químicos – concentrações de monômero, eletrólito e enzima – presentes na etapa de eletropolimerização.

Como citado anteriormente, os testes do tipo TSP com os biossensores são realizadas na célula de 1000  $\mu\text{L}$ , a qual permite a agitação da solução durante o teste com o uso de micropipetas [112], assim como maior sensibilidade na concentração do analito.

### **3.5.1. FAIXA DE POTENCIAL**

Faixa de potencial consiste na diferença entre o potencial inicial e final ao qual o potencial medido entre o ET e o CE será levado, por efeito de uma força eletromotriz externa, em relação ao potencial do ER [11]. É um parâmetro diretamente proporcional à densidade de corrente durante a eletropolimerização, influenciando de forma crucial nas propriedades do PPy [26, 27].

A faixa de potencial tem influência na espessura do filme e no grau de oxidação da matriz polimérica, aspecto este relacionado com a velocidade de estabilização do biossensor. Para a escolha da faixa de potencial mais adequada à eletropolimerização foram estudados os voltamogramas deste processo e determinada a faixa na qual indicavam estar ocorrendo o processo de polimerização.

### **3.5.2. NÚMERO DE CICLOS (ESPESSURA DO FILME POLIMÉRICO)**

Um ciclo significa a aplicação progressiva do potencial inicial da faixa pré-estabelecida até o potencial final e o retorno deste à condição inicial. A cada ciclo uma certa quantidade de monômero – determinada pela quantidade de carga transferida – é oxidada e deposita-se sobre o ânodo (ET). Desta forma o número de ciclos pode ser relacionado com a espessura da camada polimérica depositada.

Para estudar-se o efeito da espessura do filme no biossensor foram utilizadas três condições diferentes de número de ciclos de polimerização. Em uma solução com determinada concentração de Py (0,05M),  $\text{LiClO}_4$  (0,1M) e HRPO (0,3  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), foram feitos biossensores com 3, 11 e 15 ciclos de +500 a 1000 mV e observado o comportamento destes em relação à sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.5.3. VELOCIDADE DE VARREDURA

A velocidade de varredura é o quanto varia-se o potencial por unidade de tempo. Para um mesmo ciclo, quanto maior a velocidade de varredura, mais rápido o ciclo é concluído. Neste trabalho todos os valores de velocidade de varredura estão expressos em milivolts por segundo ( $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Fixando-se os outros parâmetros de polimerização, foram eletropolimerizados 9 discos de platina utilizando-se três diferentes velocidades de varredura.

### 3.5.4. CONCENTRAÇÃO DE ELETRÓLITO

O eletrólito tem como principais funções fornecer suporte para a condução eletrônica para a oxidação do monômero e ânions para a dopagem do mesmo [13, 37]. A concentração de eletrólito deve ser alta o suficiente para permitir a transferência de cargas na solução, porém não em excesso a ponto de competir com os radicais cátions do monômero. O uso de  $\text{LiClO}_4$  é comum para a polimerização de pirrol [29, 28] e este eletrólito parece não interferir com a atividade da enzima HRPO [14].

### 3.5.5. CONCENTRAÇÃO DE PIRROL

Segundo Razola *et al.* [18] a concentração do monômero deve garantir que o filme polimérico seja formado – pois soluções em baixas concentrações não chegam a polimerizar – porém não deve ser alta demais, a ponto de causar saturação dos sítios ativos da enzima, comprometendo a sensibilidade do sensor devido ao impedimento espacial.

Foram testadas as concentrações de 0,025; 0,050; 0,100; 0,150 e 0,200 M no preparo dos biossensores e verificada a influência deste parâmetro no preparo do biossensor e na sensibilidade deste ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.5.6. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

O estudo da influência da concentração da enzima HRP foi realizado preparando-se soluções de Py 0,05 M, LiClO<sub>4</sub> 0,1 M e HRPO nas concentrações de 0,1 a 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. Foi estudado o efeito deste parâmetro na polimerização do filme e na sensibilidade do biossensor ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.6. CARACTERIZAÇÃO DO FILME OBTIDO

Para confirmar a afirmação de que o *entrapment* consiste de uma interação puramente física, ou seja, sem a formação de novas ligações químicas além das de polimerização, foram realizados estudos com espectroscopia de infra-vermelho por transformada de Fourier (FTIR).

#### 3.6.1. ANÁLISES POR FTIR

Foram analisadas amostras de PPy eletroquimicamente polimerizado em meio com LiClO<sub>4</sub> (0,05M Py e 0,1M LiClO<sub>4</sub>) e com LiClO<sub>4</sub> e HRPO (0,05M Py, 0,1M LiClO<sub>4</sub> e 0,5 mg. mL<sup>-1</sup> de HRPO) de forma a se avaliar o efeito da presença da enzima no filme polimérico.

As amostras preparadas para este estudo foram sintetizadas em uma célula com capacidade de 20 mL, para que se obtivesse a massa necessária de material. Como eletrodo de trabalho e contra-eletrodo foram utilizadas placas de platina (Pt - 99,99%). As placas de Pt foram levadas à chama até ficarem incandescentes, resfriadas ao ar, lavadas com acetona, água destilada e secas ao ar. Na montagem da célula o eletrodo de trabalho foi imerso até ficar com uma área de 10 cm<sup>2</sup> imerso na solução. Como eletrodo de referência foi utilizado um eletrodo de Calomelano (+0,241V em relação ao EPH) [33, 13].

As eletropolimerizações foram realizadas por voltametria cíclica, com uma velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>, em uma faixa de +500 a +1000 mV durante 30 ciclos. Após cada eletropolimerização o filme foi raspado do eletrodo de trabalho e foram preparadas pastilhas a 1% em KBr para análise de infravermelho.

### **3.7. TESTE DE SENSIBILIDADE DO BIOSENSOR AO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Todas as variações nos parâmetros e condições de imobilização estudados são avaliados de forma comparativa, tendo como referência as respostas eletroquímicas do biossensor ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ou seja, cada parâmetro sofre uma variação em três ou mais níveis e estes são avaliados quanto à sensibilidade a uma mesma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O Teste de Sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TSP) foi realizado utilizando o biossensor como eletrodo de trabalho na célula de três eletrodos, em solução de LiClO<sub>4</sub> e aplicando um potencial fixo ao sistema. Após a estabilização, com o auxílio de micropipetas foram adicionadas quantidades controladas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (perturbação do tipo degrau), medindo em seguida a variação causada no valor da corrente.

Para a otimização deste sistema, foram estudadas a diferença de potencial aplicada e a concentração do eletrólito na solução, tendo como objetivo a obtenção de uma maior resposta (corrente) do biossensor ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### **3.7.1. DIFERENÇA DE POTENCIAL**

A metodologia descrita por Razola *et al* [18] propunha um potencial de +150 mV em relação à referência Ag/AgCl para o qual seria possível obter uma corrente em torno de 100 nA para a concentração de 0,15 mM. No entanto, ao testar o biossensor confeccionado pelo método sugerido pelo autor não obteve-se uma sensibilidade perceptível para aquele valor de potencial.

Com o objetivo de determinar um potencial mais sensível à reação da enzima com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, submeteu-se um biossensor – polimerizado com HRPO pelo método descrito anteriormente – à uma varredura de potencial de –500 mV a +500 mV em solução aquosa de LiClO<sub>4</sub> 0,1 M com adições sucessivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondentes à concentração de 0,2 mM por adição.

Pôde-se assim encontrar um valor de potencial que atinge maiores valores de corrente para aquela concentração de  $H_2O_2$ , com um nível aceitável de ruído, e que apresentasse uma maior variação de corrente com a reação com o  $H_2O_2$ .

### **3.7.2. CONCENTRAÇÃO DE ELETRÓLITO**

Foram estudadas as concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5M. Três biossensores foram eletropolimerizados em solução com as concentrações de Py,  $LiClO_4$  e HRPO conforme as condições consideradas ótimas para a imobilização da HRPO. Nos TSP's utilizou-se o potencial de +500 mV, testando-se primeiramente na solução de  $LiClO_4$  0,1M, alternando-se para as soluções 0,3M, 0,5M e voltando-se para a solução 0,1M para comparação com o primeiro experimento.

As soluções utilizadas para testar o biossensor foram preparadas com tampão-fosfato (pH =7,0) e  $LiClO_4$  nas concentrações desejadas para o experimento.

## **3.8. ESTUDOS SOBRE O MECANISMO DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA**

Visto que o mecanismo de imobilização via *entrapment* é bastante complexo e ainda não foi totalmente compreendido, foram realizados alguns experimentos que buscam um maior embasamento experimental dos princípios desta técnica.

### **3.8.1. INFLUÊNCIA DO GRAU DE PUREZA DO MONÔMERO**

O monômero pirrol é incolor, de odor característico e baixa viscosidade. Por ser altamente instável, com o passar do tempo, mesmo ao abrigo de luz e a temperaturas próximas de 0°C tende a tornar-se escuro, com coloração que vai do amarelo ao preto, conforme o grau de oxidação. Isto ocorre porque a reação gera oligômeros e com isto há a formação de cor.

A forma mais comum de purificação do monômero é a destilação [6], método que foi utilizado neste trabalho. Um método mais moderno, descrito por Gaspar *et al* é a utilização de uma coluna de alumina ( $Al_2O_3$ ), a qual separa os compostos coloridos pelo tempo de

migração através da coluna (princípio da cromatografia de coluna). Segundo os autores este método é mais econômico e mais rápido do que o processo de destilação, pois não há formação de oligômeros por aquecimento [36], como ocorre na destilação.

A experiência comprova que esta etapa de purificação é extremamente importante para a sensibilidade do biossensor, devendo ser rigorosamente observada. Para os experimentos, realizou-se a destilação do pirrol em atmosfera de nitrogênio, armazenando-o em tubos *ependorf* a 0°C. Todos os experimentos foram realizados com soluções novas. Para cada experimento eram utilizados 5 µL de pirrol fresco.

As razões pelas quais o pirrol puro fornece uma corrente maior estão relacionadas à menor presença de oligômeros, maior grau de polimerização e, conseqüente, imobilização da enzima de forma mais efetiva.

### **3.8.2. LIGAÇÃO INESPECÍFICA**

Este experimento visa quantificar o quanto da corrente obtida pelo biossensor amperométrico é função da reação entre a enzima HRPO e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o quanto é corrente de fundo, causada pelos elétrons conduzidos pelo filme de polipirrol.

Para isto foram utilizadas duas soluções de polimerização: uma contendo pirrol, LiClO<sub>4</sub> e a enzima HRPO – para confecção padrão dos biossensores – e outra solução com Albumina Bovina Sérica (BSA), uma proteína inespecífica ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substituindo a enzima na mesma concentração molar, mantendo-se o monômero e o eletrólito nas mesmas concentrações.

Os eletrodos com BSA imobilizada constituem um sistema que utiliza o mesmo substrato dos biossensores, porém exclui as reações enzimáticas ocorrentes, sendo utilizado como um controle. As respostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos sensores com albumina e com HRPO foram observadas e comparadas.

### 3.8.3. QUANTIFICAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA ATIVA

Um dos problemas do método de *entrapment* é a necessidade de uma alta concentração de enzima em solução para imobilizar efetivamente uma quantidade muito pequena [25, 31]. Até o presente momento não foi encontrada nenhuma referência que indique quantitativamente a proporção entre estas quantidades utilizadas (em solução e efetivamente imobilizada). Chamamos então esta relação de “eficiência” da imobilização.

É possível quantificar a HRPO através de ensaios do tipo ELISA, utilizando como cromógeno o substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) em meio ácido. Construiu-se uma curva de calibração da leitura da reação de soluções-padrões de HRPO (concentração de HRPO x absorvância) de 0,001 a 5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

De acordo com o procedimento especificado pela *Exalpha Biologicals*, adiciona-se a cada cubeta da placa de ELISA 5  $\mu\text{L}$  da solução de HRPO e 100  $\mu\text{L}$  do TMB. Após o período de reação, são adicionados 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 1M para cessar a reação e realizada a leitura em espectrofotômetro após 30 minutos. A curva de calibração foi construída utilizando a massa de HRPO adicionada à cada cubeta (eixo x) e a absorvância lida no comprimento de onda  $\lambda=450$  nm (eixo y).

A HRPO ativa nos biossensores foi verificada reagindo-se os biossensores com 100  $\mu\text{L}$  de TMB. O produto da reação é lido no espectrofotômetro e os valores de absorvância interpolados na curva de calibração, chegando-se a uma estimativa da quantidade de enzima ativa para cada biossensor.

Desta comparação avalia-se a capacidade do método de imobilização por eletropolimerização em PPy de manter a atividade da enzima pela interpolação na curva das soluções de HRPO com o agente cromógeno, estimando-se uma relação entre a concentração da enzima em solução com a enzima biologicamente ativa no biossensor.

Foram estudadas soluções de polimerização com 0,1 a 0,8  $\text{mg.mL}^{-1}$  de HRPO. E em ambas as curvas as soluções foram colocadas em contato com 100  $\mu\text{L}$  de reagente cromógeno específico para a enzima HRPO. Após quatro minutos de reação as respostas foram observadas em um espectrofotômetro no comprimento de onda  $\lambda=450$  nm.

### 3.9. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO V3.5R3 POR *ENTRAPMENT* COM INOCULAÇÃO DA ENZIMA HRPO

Este método de imobilização da enzima HRPO é realizado em duas etapas, as quais consistem na imobilização do Ac específico para a enzima HRPO (V3.5R3 -1ª etapa), seguido de uma etapa de inoculação da HRPO (2ª etapa).

A imobilização do Ac é realizada pelos mesmos procedimentos utilizados para a imobilização da enzima, ou seja, é preparada uma solução com o Ac, o monômero e o eletrólito e esta é submetida à eletropolimerização na célula de três eletrodos formando um filme polimérico o qual atua como uma rede, aprisionando fisicamente os Ac's.

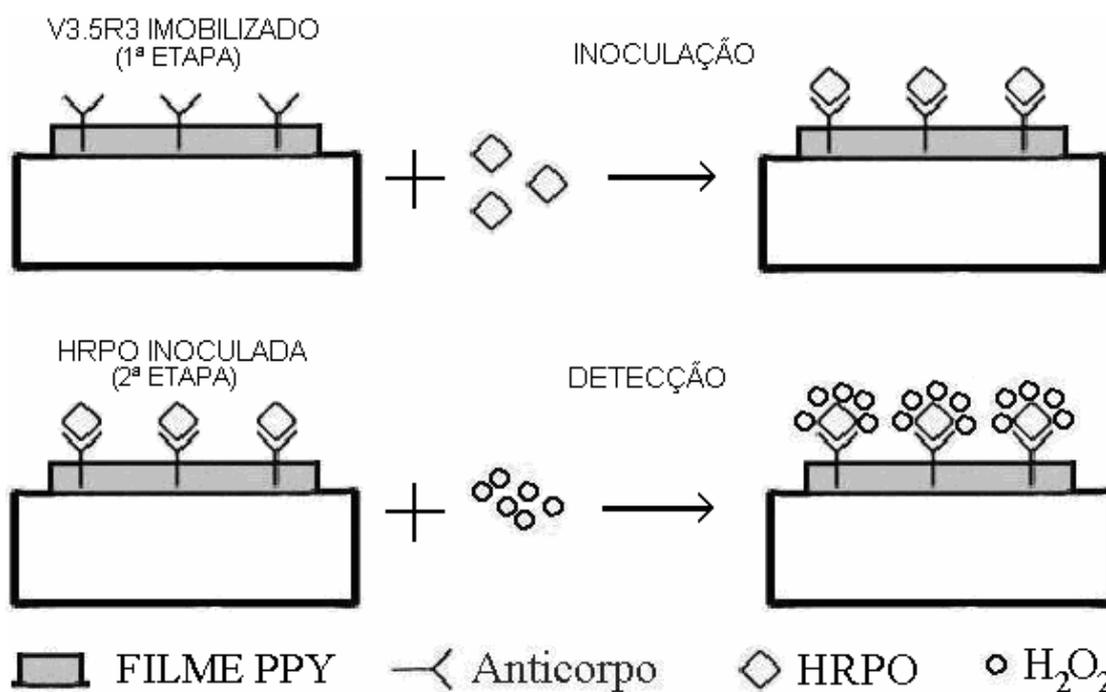


Figura 14 – Imobilização de HRPO por inoculação em anticorpo V3 imobilizado por *entrapment* em matriz polimérica.

A etapa de inoculação consiste na imersão do eletrodo com o filme de PPy e o anticorpo V3.5R3 imobilizado em placas do tipo ELISA, onde é deixado em contato com 70 µL de solução com concentração de 0,9 mg.mL<sup>-1</sup> de HRPO durante 1 hora, como mostra a Figura 14.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. PREPARO DOS BIOSENSORES**

Ao ser utilizado o método de imobilização descrito por Razola *et al* [14] obteve-se a formação de um filme preto (cor característica do polipirrol sintetizado quimicamente) nos discos de platina, variando a espessura e o aspecto (liso ou rugoso) conforme o tempo e a corrente atingida na polimerização.

### **4.2. CÉLULAS DE TRÊS ELETRODOS**

Foram construídas duas células devido às diferentes necessidades de volume para a polimerização e para o TSP. Como a solução de polimerização só é utilizada uma vez, a célula de 200  $\mu\text{L}$  permite uma maior economia de reagentes, principalmente da enzima, reagente de custo bastante elevado. A célula de 1,0 mL – utilizada nos TSP's – permite uma maior precisão na diluição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e facilita a agitação, a qual é realizada com micro-pipeta de 200 $\mu\text{L}$ .

### **4.3. CONDIÇÕES ÓTIMAS DE PREPARO DO BIOSSENSOR**

O processo de eletropolimerização com imobilização de um biocomponente consiste basicamente em submeter certa quantidade do biocomponente em solução com um monômero a um potencial suficiente para iniciar o processo de polimerização. Com isto, parte do biocomponente da solução é “aprisionada” durante a formação da rede polimérica.

Como trata-se de um processo predominantemente físico, o biocomponente preserva suas propriedades biológicas. No entanto, alguns fatores como: potencial elétrico elevado, incompatibilidade do biocomponente com o monômero e distribuição espacial do biocomponente na rede polimérica, podem restringir estas propriedades do biocomponente, tornando-o menos sensíveis ao analito.

Foram estudados diversos parâmetros do processo de eletropolimerização que por algum meio pudessem interferir no desempenho do biossensor (obstrução dos sítios ativos, denaturação, etc).

O estudo da etapa de polimerização visa encontrar as condições que proporcionem as melhores propriedades ao biossensor. Para cada variável analisada serão avaliados os comportamentos da etapa de polimerização através de gráficos Corrente x Tempo e as respostas à adição de  $H_2O_2$ , através de gráficos do tipo Corrente x Concentração de  $H_2O_2$  ( $[H_2O_2]$ ).

Como critério de avaliação, considera-se que quanto maior o sinal de resposta (corrente) ao  $H_2O_2$  maior é a concentração de enzima ativa imobilizada e maior a sensibilidade do biossensor.

#### **4.3.1. FAIXA DE POTENCIAL DE POLIMERIZAÇÃO**

Retornando à Tabela 1, referência inicial deste estudo, observa-se a faixa de polimerização de 0 a 1000 mV. Este limite superior vem a concordar com Bartlett, o qual recomenda que valores superiores a 1000 mV não devem ser utilizados para evitar uma superoxidação a ponto de degradar o filme polimérico [116].

Em relação ao comportamento da enzima, potenciais acima de +600 mV são utilizados em outros tipos de biossensores, mostrando que a mesma não sofre efeitos de denaturação por estar submetido a um potencial desta magnitude [117].

Devido a estas razões foi estabelecido este valor como limite superior da faixa de polimerização. Como pode ser visto na Figura 15, a polimerização do Py, mesmo com a presença da enzima HRPO, ocorre a partir dos 600 mV, o que mostra ser desnecessária a utilização de potenciais abaixo deste valor. Por isto elevou-se o limite inferior da faixa de potencial de polimerização para 500 mV. Chegando-se a uma faixa de +500 a +1000 mV para a etapa de polimerização.

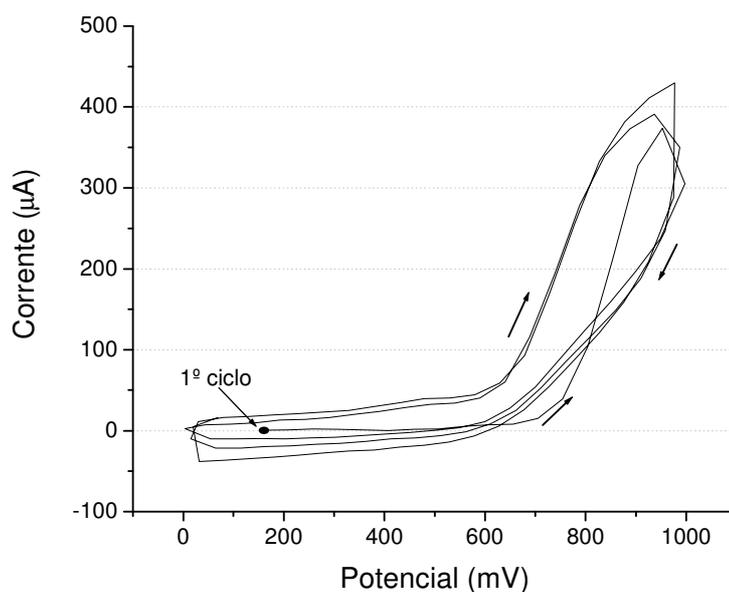


Figura 15 – Voltametria cíclica em solução Py 50 mM, HRPO 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, LiClO<sub>4</sub> 0,1 M e faixa de potencial de 0 a 1000 mV e  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ .

#### 4.3.2. ESPESSURA DO FILME POLIMÉRICO

Como uma análise comparativa, considerou-se a espessura do filme em termos de número de ciclos durante a polimerização, visto que a espessura da camada aumenta a cada ciclo de polimerização em um determinado valor, podendo-se assim relacionar esta grandeza com o parâmetro de controle “número de ciclos”, de forma a obter-se um referencial comparativo.

Foram utilizados nove discos de platina, polimerizados em trélicas com 3, 7 e 15 ciclos de +500 mV a +1000 mV (conforme item 4.4.1) à uma velocidade de varredura de  $50 \text{ mV.s}^{-1}$  em todos experimentos.

Na Figura 16 pode ser observado que à medida que a polimerização avança, os picos de corrente – correspondentes ao limite superior da faixa de polimerização (+1000 mV) – sofrem uma diminuição até a formação do platô. Isto ocorre porque o filme formado aumenta gradativamente a resistência elétrica da superfície do eletrodo, diminuindo assim a taxa efetiva de polimerização com a tendência de cessar a reação de polimerização após um longo número de ciclos.

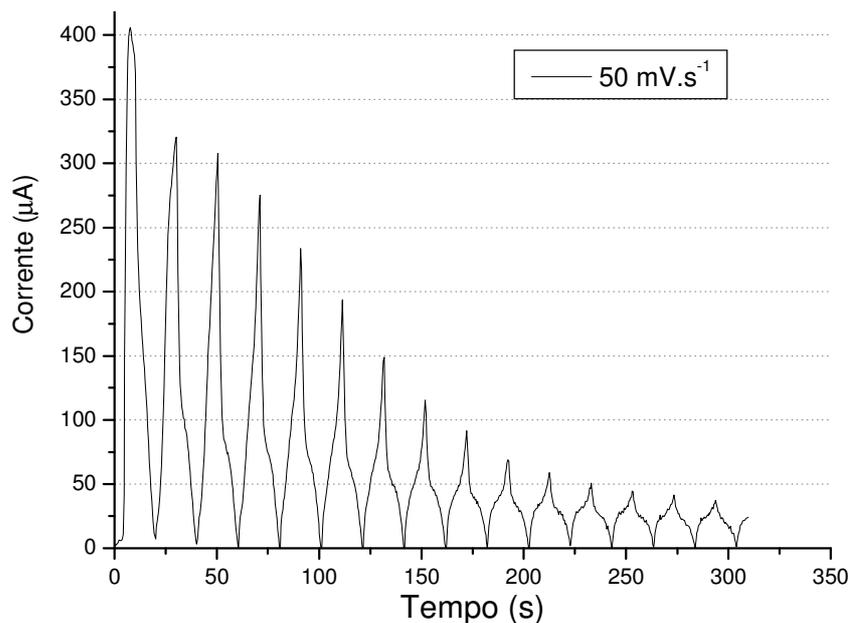


Figura 16 – Variação da corrente em função do tempo durante a eletropolimerização em solução Py 0,1M, HRPO 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, LiClO<sub>4</sub> 0,1 M. Faixa de potencial entre +500 a +1000 mV e  $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ .

Os eletrodos revestidos com diferentes espessuras do substrato PPy + HRPO foram submetidos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e apresentaram o comportamento mostrado abaixo:

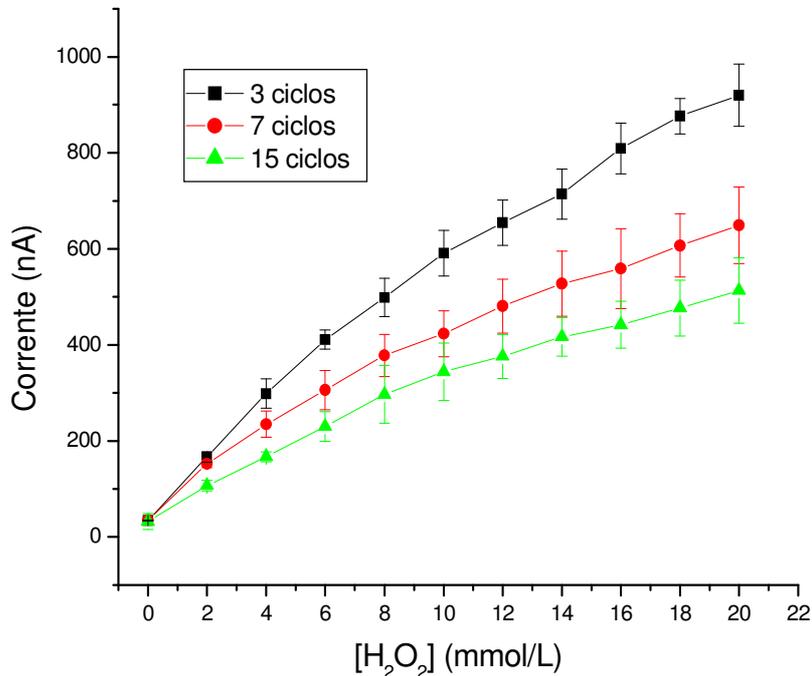


Figura 17 – Corrente x [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] para diferentes espessuras de camada. Eletropolimerização em solução HRPO 0,25 mg/mL, Py 0,1M e LiClO<sub>4</sub> 0,1M, polimerização de 3, 7 e 15 ciclos entre +500 e +1000 mV.

Pode-se observar na Figura 17 que com o aumento a espessura da camada – expressa em número de ciclos – há uma significativa diminuição da sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  devido ao aumento da barreira de difusão das espécies através do filme polimérico. Quanto menos espessa a camada, maior a relação entre Corrente e  $[\text{H}_2\text{O}_2]$ , o que pode ser relacionado com a sensibilidade do biossensor.

Outra questão técnica que leva a optar por camadas menos espessas é a dificuldade em estabilizar um biossensor com camadas mais espessas, conforme será discutido no item 4.5.3 - Estabilização.

#### 4.3.3. VELOCIDADE DE VARREDURA

Foram polimerizados quatro discos de Pt com mesma área entre os potenciais de +500 mV a 1000 mV, conforme o experimento descrito no item 4.3.1, em soluções com concentrações de Py, HRPO e  $\text{LiClO}_4$  conforme a Tabela 1 (página 46), sob as velocidade de varredura de 10, 20, 50 e 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Com a intenção de amenizar o efeito da espessura de camada entre as amostras, mostrado no item anterior (4.3.2), variou-se o número de ciclos de acordo com a velocidade, de forma a fixar o tempo para todos os experimentos, facilitando o controle e visando obter sempre a mesma espessura de camada, como mostra a Figura 18.

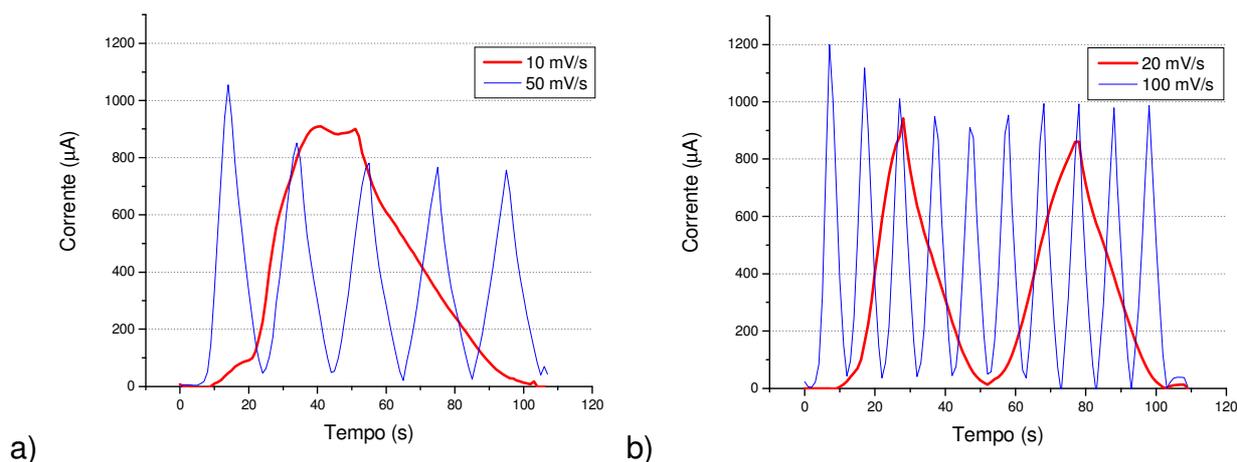


Figura 18 – Corrente x tempo de polimerizações com diferentes velocidades de varredura a) 10  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e 50  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ; b) 20  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$  e 100  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Observa-se que a área total de cada polimerização – ou seja, a soma das áreas dos picos para cada experimento – e conseqüentemente a quantidade de polímero formado, é bastante próxima. A carga total obtida em cada experimento, calculadas pela integral dos picos da Figura 18, com o número de ciclos especificados para cada velocidade de varredura, é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade de cargas calculadas para cada velocidade de varredura através da integral das áreas mostradas nas Figuras 24-a e 24-b. Tempo= 100 s.

Veloc. de varredura (mV.s <sup>-1</sup> )	Número de ciclos	Carga (μCoulomb)
100	10	44604,57
50	5	37631,37
20	2	33910,87
10	1	39028,82

Quanto à sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a velocidade de varredura mostrou ser um parâmetro pouco significativo. A Figura 19 apresenta quatro testes de sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com biossensores eletropolimerizados nas velocidades de varredura de 10, 20, 50 e 100 mV.s<sup>-1</sup>.

Pode-se observar que os biossensores eletropolimerizados em 10, 20 e 50 mV.s<sup>-1</sup> apresentam sensibilidades ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bastante semelhantes, enquanto que o biossensor eletropolimerizado em 100 mV.s<sup>-1</sup> apresenta uma sensibilidade relativamente maior que os outros biossensores, tornando-se mais perceptível para as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acima de 4 mmol/L.

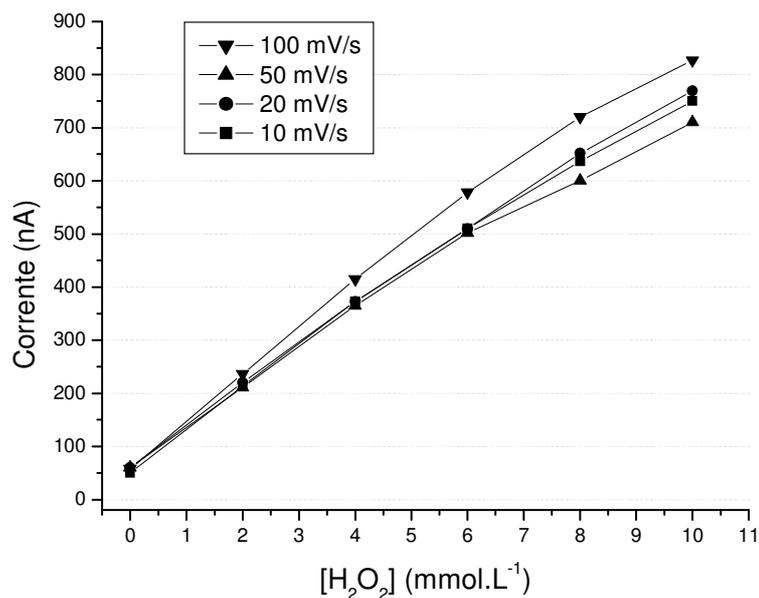


Figura 19 – Corrente x [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] de biossensores eletropolimerizados sob diferentes velocidades de varredura, de forma a verificar a influência deste parâmetro eletroquímico sobre a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todos os biossensores foram polimerizados em soluções com as mesmas concentrações de HRPO, Py e LiClO<sub>4</sub>.

Apesar da velocidade de 100 mV.s<sup>-1</sup> proporcionar maior sensibilidade, optou-se por manter o valor de 50 mV.s<sup>-1</sup> – valor inicial dado pela Tabela 1 – por esta proporcionar maior controle na etapa de polimerização.

#### 4.3.4. CONCENTRAÇÃO DE PIRROL

Foram testadas concentrações de pirrol entre 25 mM e 100 mM no preparo dos biossensores e verificada sua influência nas características do filme formado e sensibilidade do biossensor ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

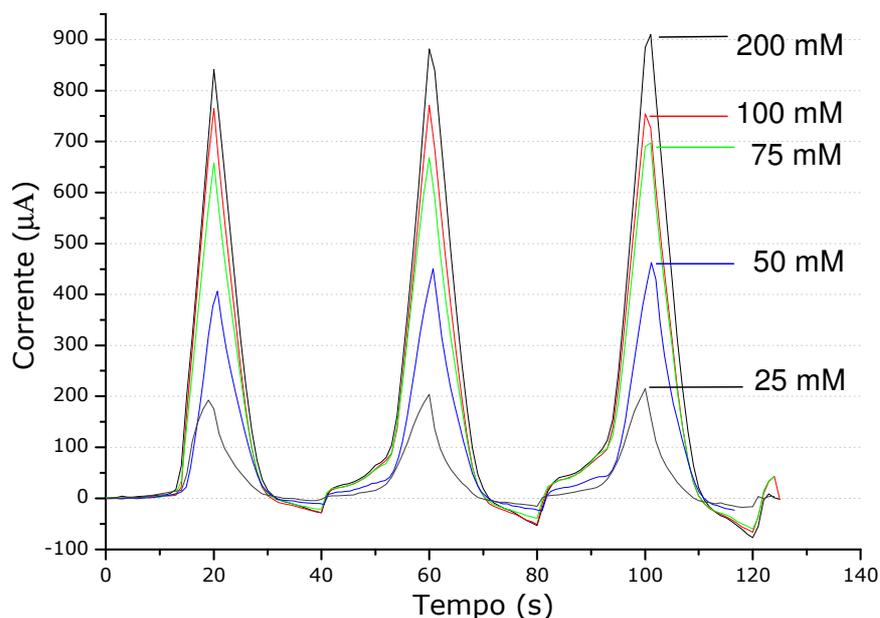


Figura 20 – Gráfico Corrente x tempo para eletropolimerizações com potencial cíclico entre 0 e +1000 mV e concentrações de Py de 25, 50, 75, 100 e 200 mM. Velocidade de varredura= 50 mV.s<sup>-1</sup>; [HRPO]= 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e [LiClO<sub>4</sub>]=0,1M.

A Figura 20 mostra o comportamento da corrente durante a EP no intervalo de +500 a 1000 mV. A quantidade de polímero formado é proporcional à área dos picos, e pode-se perceber que quanto maior a concentração do monômero maior a quantidade de filme polimérico depositado.

A Figura 21 mostra os TSP's para as concentrações de Py 50, 75, 100 e 200 mmol/L em solução. Observa-se que as curvas obtidas para eletrodos eletropolimerizados em soluções com concentrações de Py de 50 a 100 mmol/L são bastante semelhantes, notando-se uma significativa redução da corrente para a curva com 200 mmol/L.

Segundo Lowe [32], esta diminuição da sensibilidade pode ser justificada por a enzima ter sua atividade reduzida devido ao impedimento espacial dos seus sítios ativos. Mesmo que todas as soluções de polimerização tenham concentrações de HRPO iguais, o excesso de pirrol causa o “encapsulamento” da HRPO – como mostrado na Figura 20 – diminuindo, na proporção, o contato desta com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para a concentração de 25 mM não houve formação de polímero suficiente para cobrir integralmente a área do eletrodo para a formação do biossensor.

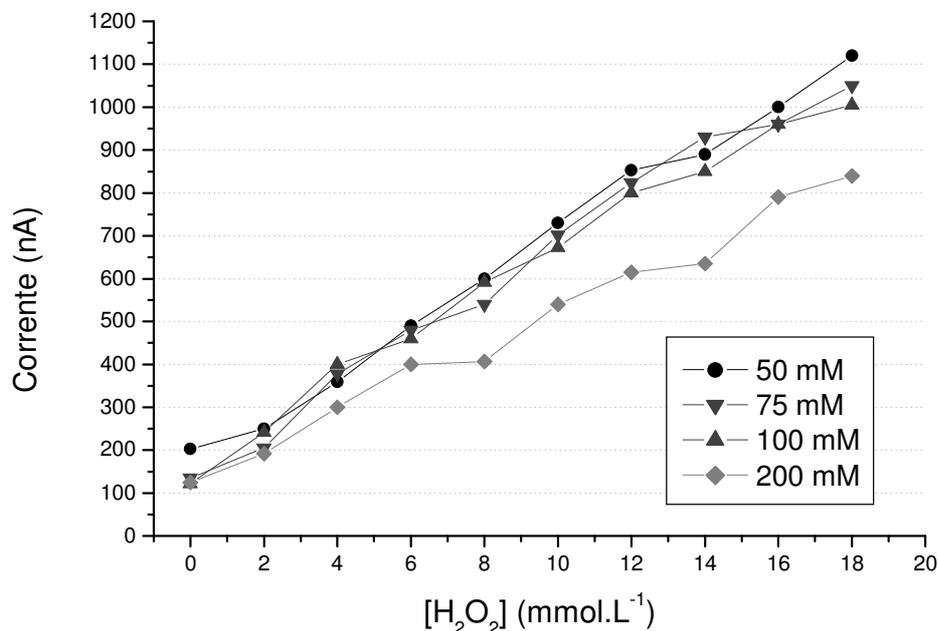


Figura 21 – Teste de sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TSP) para biossensores eletropolimerizados em soluções com concentrações de pirrol de 50, 75, 100 e 200 mmol/L ([HRPO]=0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, [LiClO<sub>4</sub>]=0,1M).

#### 4.3.5. CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA

O estudo da influência da concentração da enzima HRPO sobre a etapa de polimerização e a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dos biossensores formados foi realizado através da eletropolimerização em soluções de Py 0,05 M, LiClO<sub>4</sub> 0,1 M e HRPO nas concentrações de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>.

O comportamento da corrente durante estas eletropolimerizações é mostrado na Figura 22. A diminuição sucessiva dos picos ocorre devido à formação da camada de baixa condutividade – substrato de PPy e HRPO, sendo esta última não-condutora – sobre a superfície do eletrodo, conforme explicado na seção 4.3.2 – Espessura do filme polimérico.

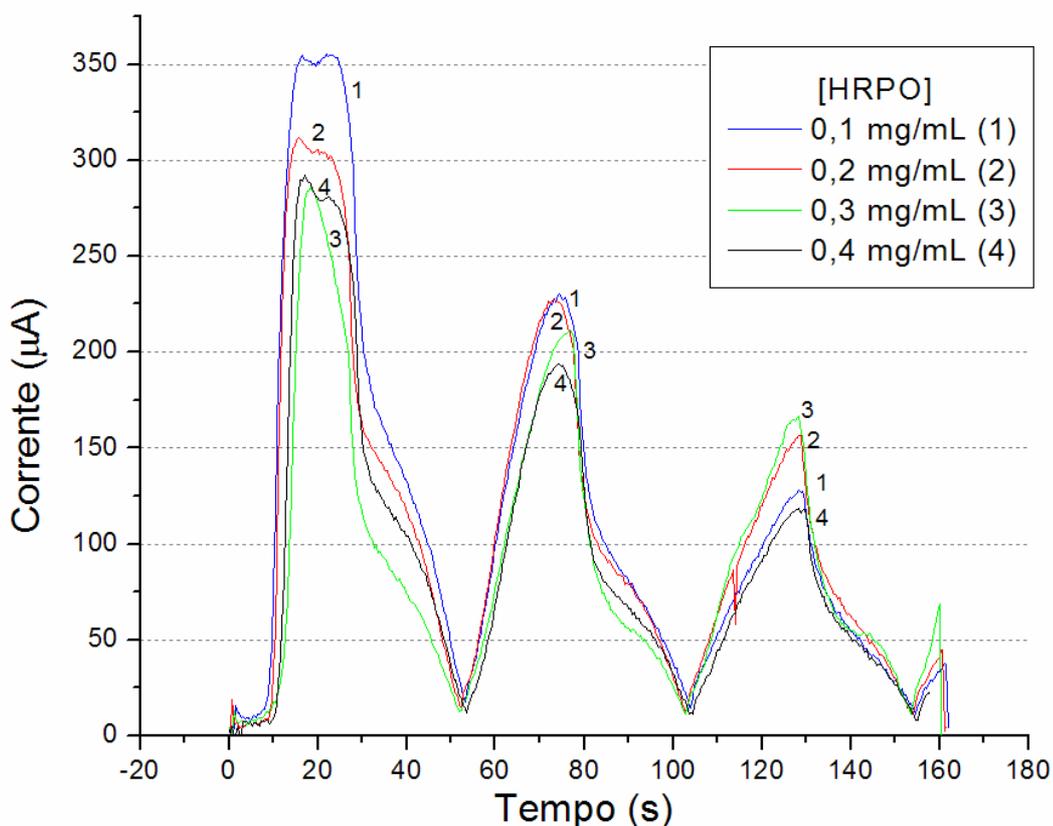


Figura 22 – Gráfico corrente x tempo para eletropolimerizações sob voltametria cíclica (+500 a +1000mV/ 50 mV.s<sup>-1</sup>) com concentrações de HRPO de 0,1 a 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> (em intervalos de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>), para a verificação da influência da concentração de enzima no grau de polimerização (LiClO<sub>4</sub> 0,1M + 0,05 M Py).

A Figura 23 mostra que na medida em que a concentração da enzima aumenta há uma diminuição da quantidade de polímero formado, o que vem a concordar com Shin *et al.*, o qual, ao estudar o comportamento eletroquímico do pirrol em presença da enzima GOx, afirmou que o crescimento eletroquímico do PPy é significativamente afetado pela presença da GOx na solução de polimerização, sendo menor a deposição de polímero com o aumento da concentração da enzima [118]. Com efeito, esta influência também pode ser verificada com a enzima HRPO: para as concentrações acima de 0,2 mg.mL<sup>-1</sup>, mantendo-se as concentrações de Py e LiClO<sub>4</sub>, tem-se uma diminuição na formação do substrato.

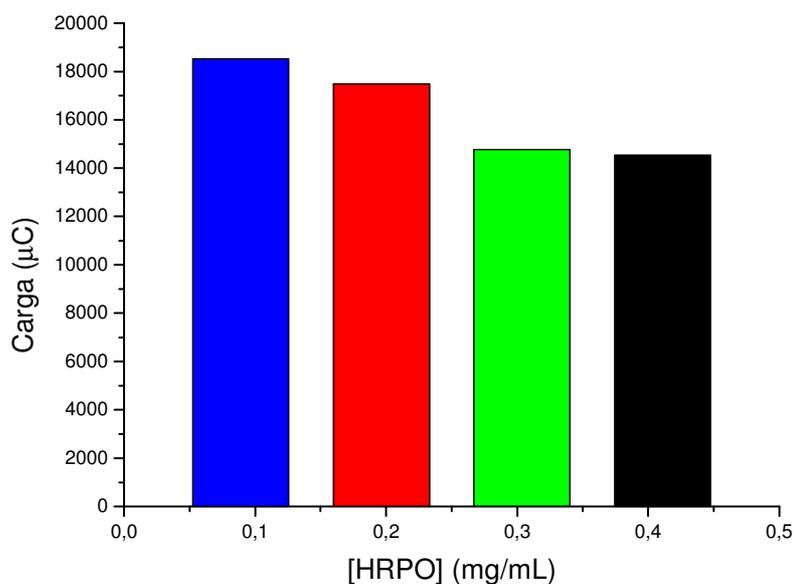


Figura 23 – Concentração de HRPO na solução de polimerização x Carga elétrica calculada através da integral da Figura 22.

A Figura 24 mostra que, dentro da faixa estudada, quanto maior a concentração da enzima HRPO na solução de polimerização, maior é a resposta do biossensor formado à concentração de  $H_2O_2$  (sensibilidade do biossensor).

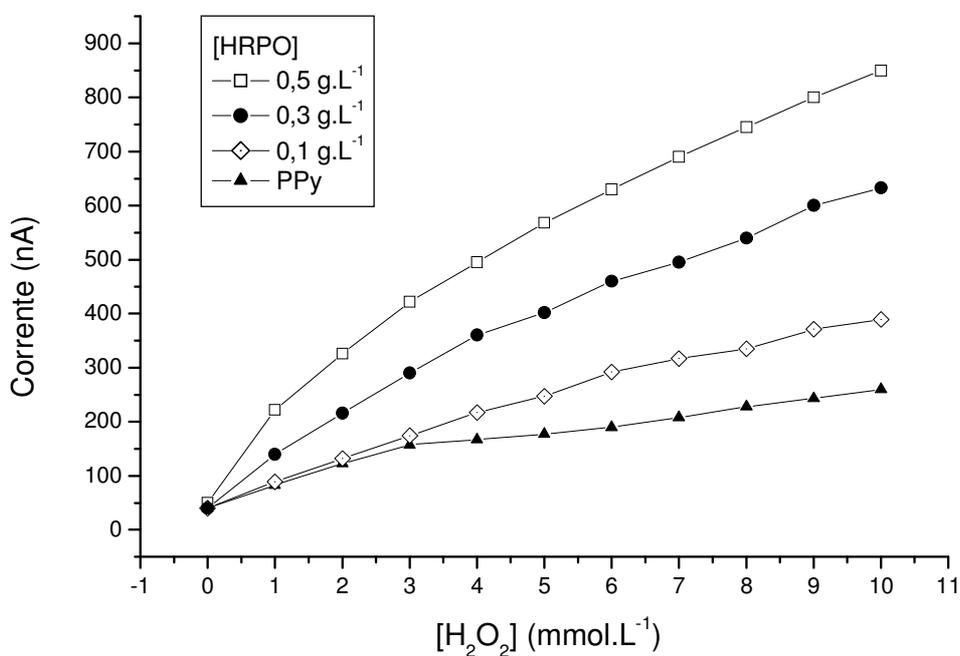


Figura 24 – Respostas ao  $H_2O_2$  de biossensores imobilizados em soluções com diferentes concentrações de HRPO (0,0 a 0,5 g.L<sup>-1</sup>) para verificação da influência da concentração da enzima na sensibilidade do biossensor ([Py]=0,05M/ [LiClO<sub>4</sub>]=0,1M/ +500 mV).

A partir dos dados das Figuras 22, 23 e 24, pode-se dizer que a presença da enzima interfere no mecanismo de polimerização do pirrol, reduzindo a formação do filme polimérico. Alguns fatores identificados como responsáveis por isto são o impedimento espacial: a enzima pode causar a oclusão nas reações de acoplamento e propagação das cadeias poliméricas e a redução da condução elétrica da solução.

Em relação à sensibilidade do biossensor ao  $H_2O_2$ , os dados da Figura 24 mostram que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração da HRPO na solução de polimerização e a sensibilidade dos biossensores, variando de uma sensibilidade de aproximadamente  $36 \text{ nA}/(\text{mmol.L}^{-1}) H_2O_2$  para o biossensor polimerizado na solução de  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de HRPO até  $58 \text{ nA}/(\text{mmol.L}^{-1}) H_2O_2$  na solução de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  de HRPO.

#### 4.3.6. PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ETAPA DE ELETROPOLIMERIZAÇÃO

Pelas avaliações dos parâmetros de eletropolimerização realizadas com base na Tabela 1, foram observados algumas alterações, discutidas anteriormente, resumidas na Tabela 3:

Tabela 3 – Condições consideradas ótimas para a imobilização da HRPO em polipirrol (critério de otimização: sensibilidade ao  $H_2O_2$ ). Os parâmetros que diferem da Tabela 1 (baseada nas condições descritas por Razola [18]) estão em negrito.

Parâmetro	Condição de EP
<b>Faixa de potencial</b>	+500 mV a +1000 mV
<b>Velocidade de varredura</b>	$50 \text{ mV.s}^{-1}$
Concentração do eletrólito	0,1 M $\text{LiClO}_4$
Concentração do monômero	0,05 M pirrol
Concentração da enzima	0,50 mg/mL
<b>Espessura do filme</b>	3 ciclos de 0,0 a 500 mV

Concluída esta etapa, deve-se considerar que todos os biossensores utilizados nos experimentos Teste de Sensibilidade ao  $H_2O_2$  (TSP), Comparação com Proteína Específica e Capacidade de Imobilização de Enzima Ativa foram confeccionados conforme

os parâmetros mostrados na Tabela 3, assim como os substratos formados e caracterizados.

#### 4.4. CARACTERIZAÇÃO DO FILME OBTIDO

O material obtido pela eletropolimerização foi analisado por espectroscopia infravermelho. Os filmes foram eletroquimicamente polimerizados em placas de platina (99%) de área superficial de 30 cm<sup>2</sup> (aproximado), dentro de uma célula com capacidade de 20 mL. O material foi cuidadosamente raspado e preparado em pastilha de KBr para análise por espectroscopia infravermelho no modo transmissão, obtendo-se o espectro mostrado na Figura 25:

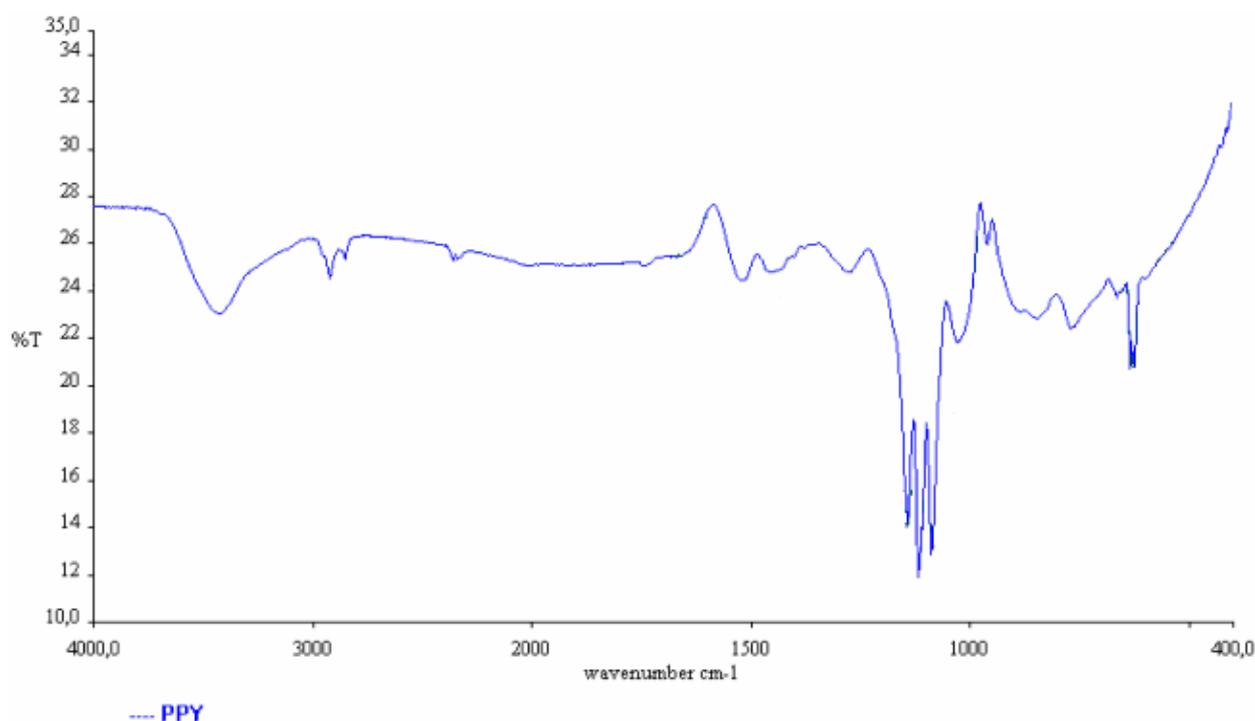


Figura 25 – Espectro do polipirrol eletropolimerizado em solução aquosa em concentração 0,05M de monômero e 0,1M de LiClO<sub>4</sub>.

O espectro obtido foi comparado com outros espectros de absorção IV encontrados na literatura [6, 8, 117]. As bandas características do polipirrol são observadas nas regiões (em cm<sup>-1</sup>) de 776-781, 900-910 e 964-965 devido às vibrações das ligações C-H fora do plano; 1035-1040 devido à deformação N-H; as bandas em 1300, 1360 e 1480 são

atribuídas ao estiramento e vibração do anel, assim como em 1550, característica da ligação dupla C=C [119].

Duas bandas nas regiões de 625 e 1100  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao ânion perclorato na dopagem do polímero [6]. Na Figura 25, assim como na Figura 26, estas bandas estão presentes devido à utilização de perclorato de lítio como dopante.

Para a análise IV do polipirrol com enzima HRPO imobilizada (PPy-HRPO), realizou-se as mesmas etapas de eletropolimerização, obtenção e preparo descritas anteriormente, partindo-se do pirrol em presença da enzima HRPO a 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Na análise por FTIR do PPy-HRPO obteve-se o espectro mostrado na Figura 26, o qual apresenta as mesmas bandas características do polipirrol citadas anteriormente, com certa diferença de intensidade na banda em 1035, atribuída à ligação N-H do anel pirrólico [119].

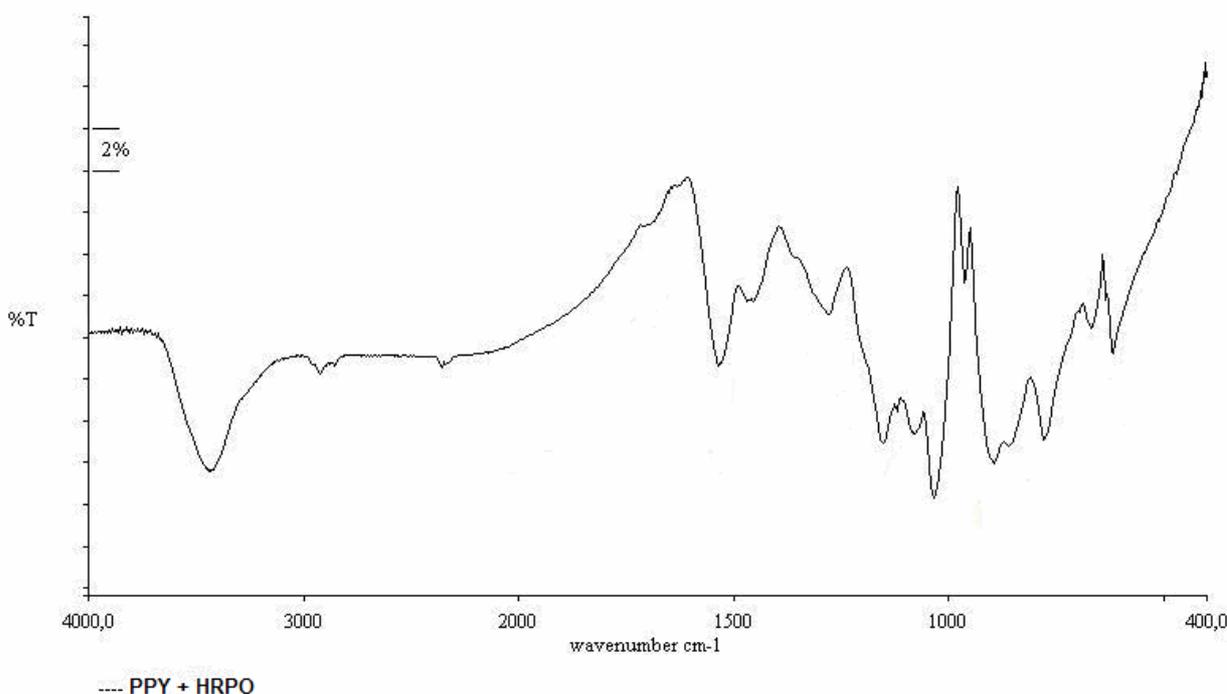


Figura 26 – Espectro do polipirrol eletropolimerizado na concentração de 0,05M de pirrol em meio com 0,1M de  $\text{LiClO}_4$  e 0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HRPO.

#### 4.5. TESTE DE SENSIBILIDADE AO $\text{H}_2\text{O}_2$ (TSP)

Paralelamente à otimização do procedimento de eletropolimerização, as variáveis do TSP, tais como a diferença de potencial aplicada, espessura da camada, e

concentração de eletrólito, também foram otimizadas visando um sinal de resposta (corrente/  $[\text{H}_2\text{O}_2].\text{L}^{-1}$ ) com maior sensibilidade, maior estabilidade e menor ruído.

O TSP consiste nas seguintes etapas:

- submeter o biossensor a um potencial de 600 mV até que a corrente de fundo encontre um valor estável (entre 90 a 100 nA) – ver item 4.5.3. Estabilização;
- mudar o potencial para 500 mV. Para garantir que não haja perdas na corrente de fundo durante o teste, esta deve partir de um valor máximo de 60 nA;
- adicionar 5 ou 10  $\mu\text{L}$  da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com o aumento na concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se deseja atingir;
- agitar com a micro-pipeta de 200  $\mu\text{L}$ ;
- aguardar a estabilização do sistema e fazer a leitura;
- realizar adições de  $\text{H}_2\text{O}_2$  até que não haja aumento de corrente, condição esta denominada de “saturação”.

O desempenho de cada biossensor é avaliado principalmente quanto ao sinal de saída, o qual é considerado diretamente proporcional à capacidade de imobilização da enzima HRPO ativa.

#### **4.5.1. DIFERENÇA DE POTENCIAL**

Como não foi possível detectar qualquer alteração de corrente nos TSP's em +150 mV, procurou-se verificar em qual potencial a reação da HRPO com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  era mais pronunciada.

De forma a determinar-se um potencial que permitisse a detecção do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi utilizado um biossensor enzimático recém imobilizado imerso em solução aquosa de  $\text{LiClO}_4$  0,1 M e submetido à voltametria cíclica de -500 a +500 mV com adições sucessivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na solução de 0,1 mM a cada ciclo, obtendo-se o resultado mostrado na Figura 27. O comportamento descontínuo da faixa de -300 a -500 mV é devido às agitações para a homogeneização da solução realizadas nesta região de potencial.

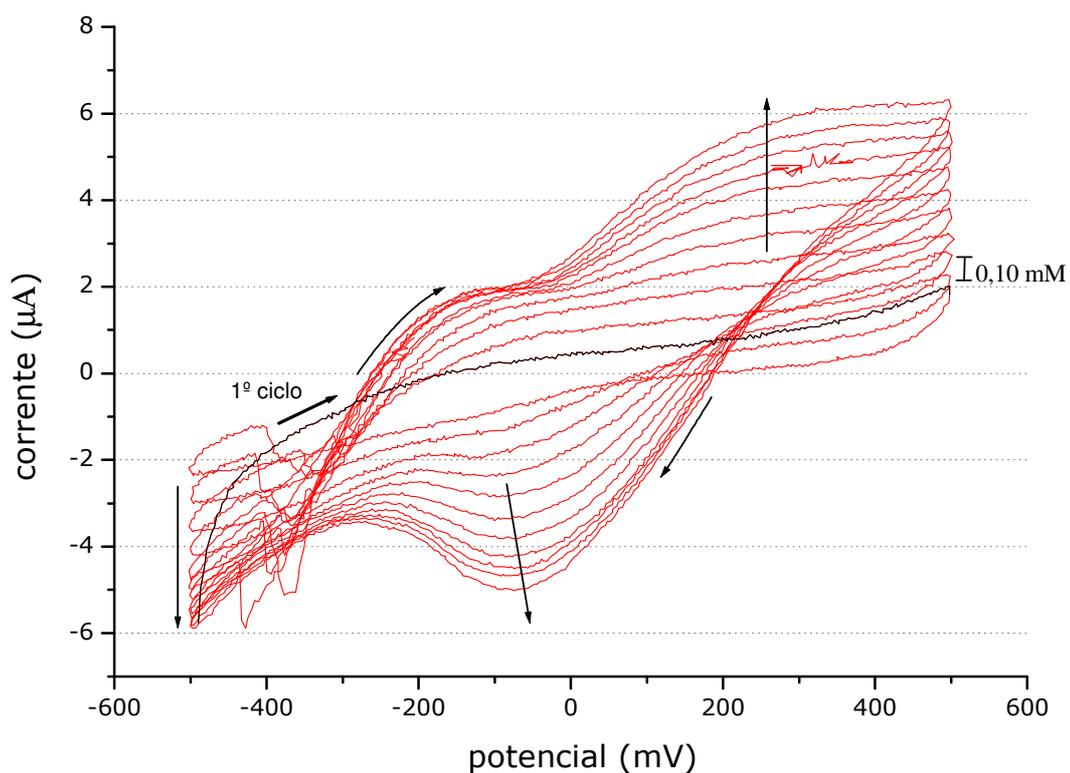


Figura 27 – Voltametria cíclica de -500 a +500 mV em solução 0,1 M de  $\text{LiClO}_4$  com adição de 0,1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a cada ciclo em  $v = 50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . O biossensor utilizado foi eletropolimerizado em solução 0,05 M de Py, 0,1 M de  $\text{LiClO}_4$  e  $0,5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de HRPO.

Nota-se que na região entre 350 e 500 mV a resposta do biossensor (corrente) forma um platô, aumentando proporcionalmente às adições de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os potenciais de +300 mV a +500 mV foram testados, obtendo-se as curvas da Figura 28.

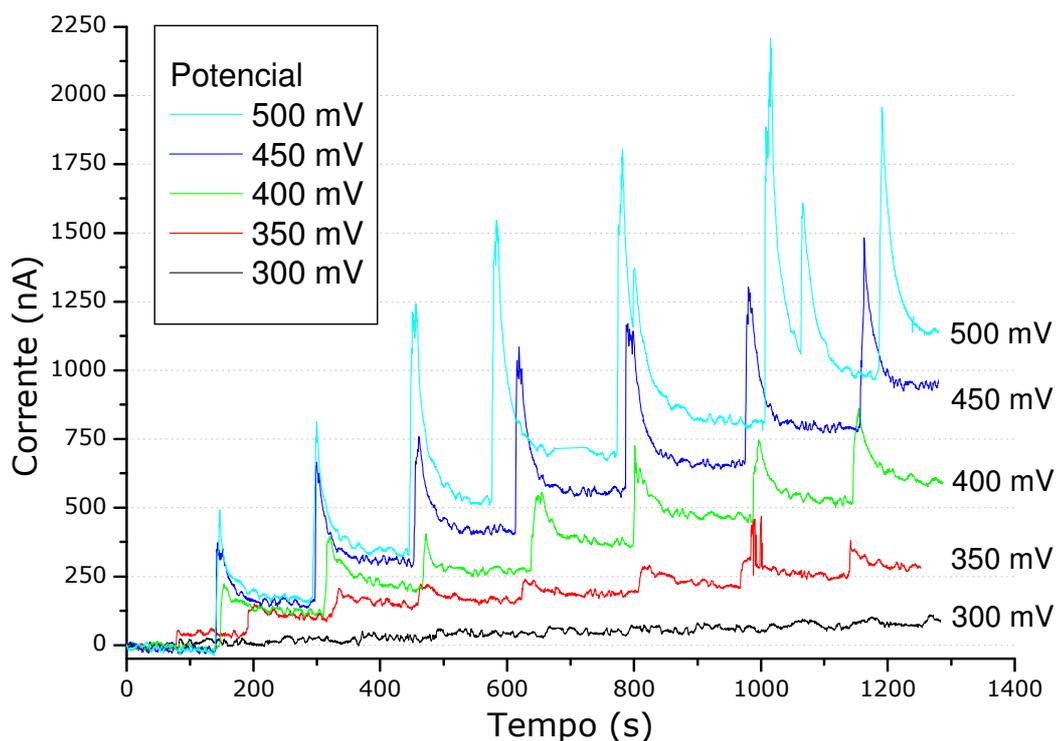


Figura 28 – Corrente x tempo para adições de 0,2 mmol/L sob diferentes potenciais aplicados. Eletrodos eletropolimerizados conforme Tabela 3.

A partir dos dados da Figura 28 optou-se por padronizar o potencial aplicado no valor de 500 mV para os testes de sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apesar de ser encontrados valores bastante inferiores na literatura [18, 31]. Pode-se perceber na Figura 29 uma relação linear da corrente com a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na faixa de 0 até 16  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . O valor de leitura da corrente é obtido nos vales, onde o sistema entra em estado estacionário.

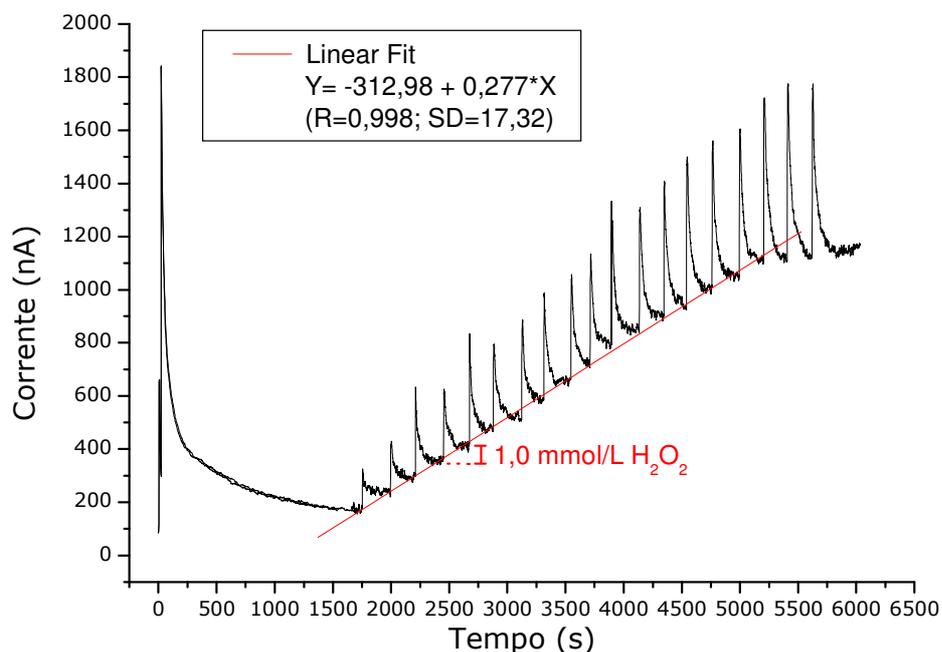


Figura 29 – Corrente x tempo em adições consecutivas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Biossensor confeccionado conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 3, E fixo=+500 mV.

#### 4.5.2. CONCENTRAÇÃO DE ELETRÓLITO

A tréplica utilizada apresentou boa reprodutibilidade nas três concentrações de LiClO<sub>4</sub> testadas (0,1, 0,3 e 0,5M), conforme mostra a Figura 30.

Nota-se que para as concentrações de 0,3 e 0,5M os biossensores atingem correntes mais altas que [LiClO<sub>4</sub>] = 0,1M, o que pode ser explicado devido à maior densidade de íons na solução. Outra vantagem percebida foi a redução do ruído de fundo no TSP para as análises com 0,3 e 0,5M (observação apenas para registro, não sendo apresentado estes dados na Figura 30).

De forma geral, a influência da concentração do eletrólito sobre o TSP é considerada significativa, porém seriam necessários estudos mais aprofundados sobre o mecanismo de imobilização para concluir se trata-se de uma melhoria na eficiência de imobilização do biocomponente ou de apenas um efeito físico de aumento da condutividade do meio.

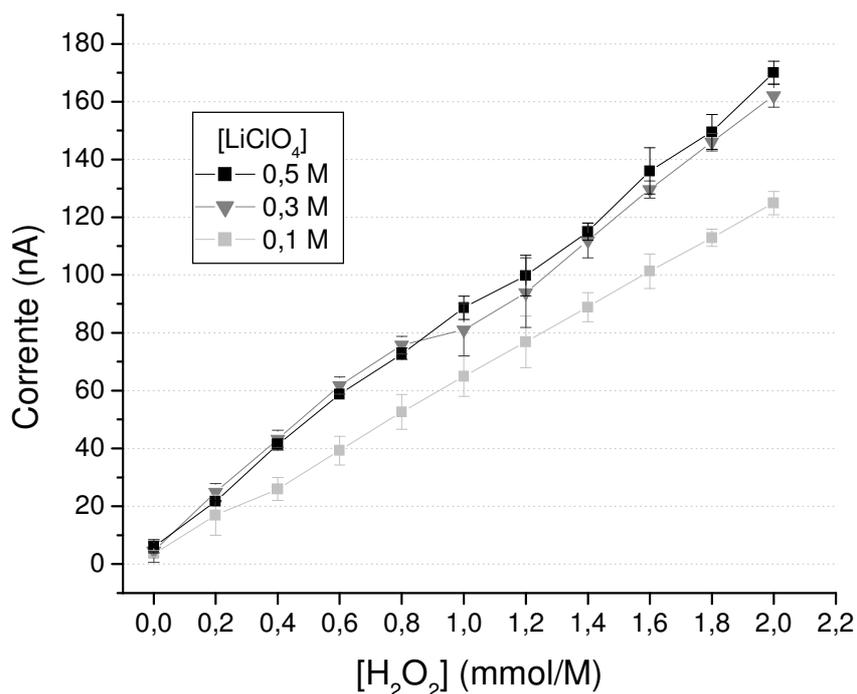


Figura 30 – Corrente x Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para as respostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de biossensores confeccionados conforme parâmetros estabelecidos na Tabela 3, com a sensibilidade ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testada em meios com diferentes concentrações de LiClO<sub>4</sub>.

Para os procedimentos de imobilização direta da enzima HRPO e seu consecutivo TSP foram mantidos o valor de 0,1M de LiClO<sub>4</sub> como padrão. Em relação ao biossensor com imobilização do anticorpo V3.5R3 este parâmetro tem uma maior importância, sendo utilizado como auxiliar na imobilização, como será discutido na seção 4.8.1 (página 79).

#### 4.5.3. ESTABILIZAÇÃO

Para atingir uma condição estável, o biossensor enzimático precisa ser sobreoxidado (*overoxidized*), evitando que haja qualquer transferência de elétrons que não seja da reação entre a enzima e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta operação é realizada submetendo o biossensor a um potencial que oxide totalmente o polímero sem, no entanto, gerar degradação do material.

O tempo de estabilização depende do potencial aplicado e das condições de polimerização, mais diretamente da espessura do filme polimérico. A princípio utilizou-se o valor de leitura (+500 mV), apenas aguardando a estabilização natural. Como exemplo,

para estabilizar as amostras polymerizadas com 15 ciclos a  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  (confeccionadas conforme descrito no Item 4.4.4), foi necessário manter o biossensor no potencial de +500 mV por até 2 horas. Para diminuir este tempo elevou-se o potencial de estabilização, respeitando o intervalo de 500 a 1000 mV, de forma a não causar dano ao filme polimérico ou ao biocomponente. Utilizando-se o potencial de 600 mV, obteve-se uma redução em torno de 60% no tempo de estabilização em relação ao potencial de 500 mV.

#### 4.6. COMPARAÇÃO COM PROTEÍNA INESPECÍFICA

O efeito da enzima HRPO na matriz polimérica não pode ser mensurado diante da simples comparação com o eletrodo de polipirrol puro, pois desta forma não são considerados os efeitos de impedimento espacial na matriz polimérica e o causado pela presença de uma proteína na etapa de polymerização, conforme discutido na seção 4.4.3 - Concentração de enzima (página 63). Por esta razão utilizou-se a albumina bovina sérica (*Bovine Albumin Serum* – BSA), imobilizando-a na matriz polimérica da mesma forma que a HRPO para comparação nos testes de sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 31).

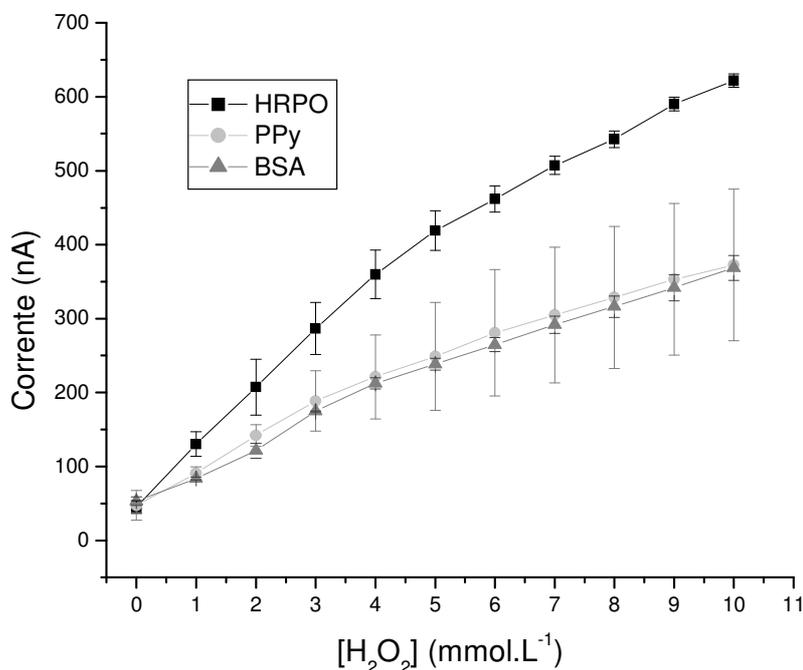


Figura 31 - Teste comparativo de sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre eletrodos eletropolimerizados com PPy puro (Py 0,1M,  $\text{LiClO}_4$  0,1M), HRPO imobilizada (HRPO 0,5 mg/mL, Py 0,1M,  $\text{LiClO}_4$  0,1M) e albumina (BSA 0,5 mg/mL, Py 0,1M,  $\text{LiClO}_4$  0,1M). Todos biossensores confeccionados sob as condições da Tabela 3.

Os eletrodos polimerizados em solução com HRPO atingiram praticamente o dobro da resposta em corrente dos eletrodos com BSA e PPy puro. Os biossensores sem HRPO (PPy e BSA) apresentaram semelhantes valores de resposta, apenas com um desvio maior para o PPy puro.

Desta forma, comprova-se que a maior sensibilidade ao  $H_2O_2$  ocorre devido à presença da enzima no meio, descartando quaisquer possibilidades da sensibilidade ao  $H_2O_2$  ser causa de qualquer outro fenômeno de oxi-redução ou condução eletrônica.

#### 4.7. CAPACIDADE DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA ATIVA

Conforme explicado na seção 3.8.3. - Quantificação da imobilização de enzima (página 53), construiu-se uma curva de calibração [HRPO] x absorbância utilizando soluções de concentrações conhecidas, conforme mostra a Figura 32.

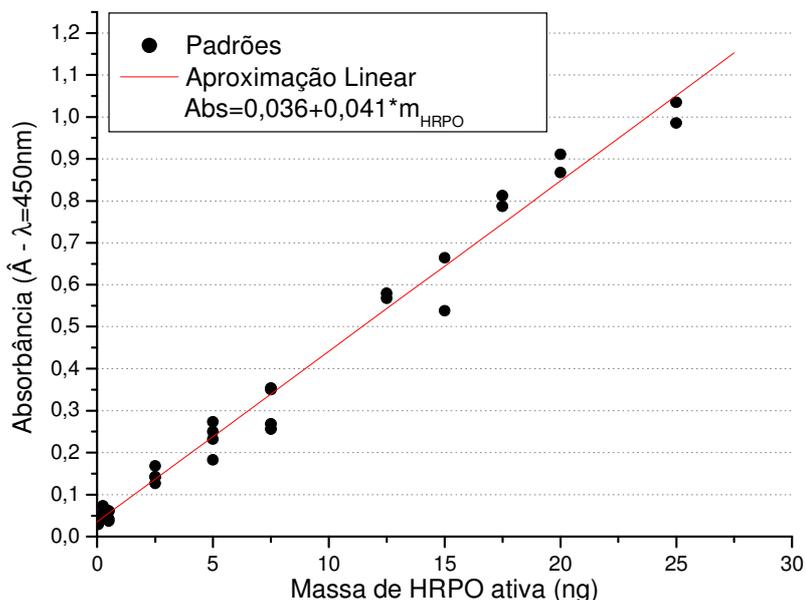


Figura 32 – Curva de calibração Absorbância x concentração de HRPO, com valores de leitura para soluções-padrões de HRPO em comprimento de onda de 450 nm. A linha contínua apresenta uma aproximação linear utilizada como referência ( $r = 0,9932$ ).

A quantificação da enzima ativa presente nos biossensores foi realizada através da leitura em espectrofotômetro do produto de reação dos biossensores eletropolimerizados em soluções com concentrações de HRPO de 0,2, 0,4, 0,6 e 0,8  $mg.mL^{-1}$  (demais

parâmetros segundo Tabela 3). A absorbância obtida em relação à massa de enzima utilizada para a eletropolimerização é mostrada na Figura 33.

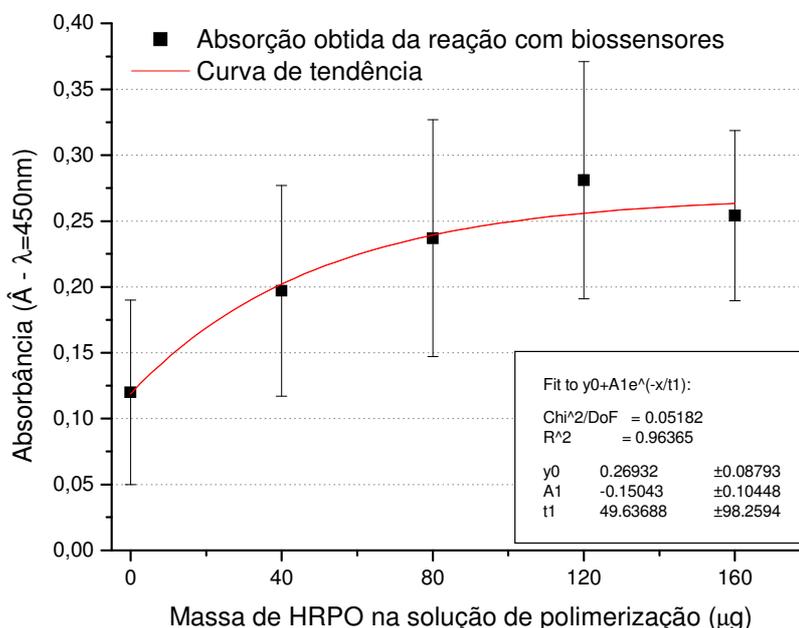


Figura 33 – Valores de absorbância obtidos pelo produto de reação dos biossensores com o TMB. Os mesmos foram confeccionados nas condições descritas na Tabela 3, variando apenas a [HRPO] (n=3).

Na Figura 33 está apresentada a Absorbância em função da massa de HRPO presente na solução de eletropolimerização. A mesma foi conduzida na célula de 200 µL, com concentrações de HRPO entre 0,0 e 0,8 mg.mL<sup>-1</sup>. Os biossensores produzidos foram lavados com água destilada, mergulhados em TMB para a reação na placa de ELISA.

Estes valores de absorbância são então relacionados com a curva de calibração da Figura 32 (Absorbância x m<sub>HRPO</sub>), indicando, através da reação com o TMB, a quantidade de enzima ativa no biossensor, ou seja, o quanto de enzima imobilizada no eletrodo é capaz de reagir com o TMB ou com outras espécies biologicamente afins. Desta forma pôde-se estimar a relação entre a quantidade de enzima adicionada na solução de polimerização (nas condições utilizadas) e a quantidade de enzima que é imobilizada na forma ativa.

A Tabela 4 ilustra esta estimativa mostrando na coluna **m<sub>HRPOsp</sub>** a massa de HRPO na solução de polimerização em nanogramas. A coluna **Abs<sub>BIOS</sub>** mostra a média (n=3) dos valores de absorbância obtidos pelos biossensores preparados nas respectivas soluções,

segundo a Figura 33. A coluna **Calibração** mostra os valores obtidos pelo rebatimento das absorbâncias da terceira coluna na Figura 32, obtendo a massa de HRPO do biossensor que reagiu com o TMB. Na coluna **m<sub>HRPOat</sub>** é descontado o valor de absorbância do controle, obtendo a massa de HRPO ativa nos biossensores em nanogramas. A sexta coluna (**m<sub>HRPOSp</sub>/ m<sub>HRPOat</sub>**) mostra a relação entre a quantidade de enzima presente na solução de polimerização e a quantidade de enzima imobilizada na forma ativa.

Tabela 4 – Resultados para a relação entre as quantidades de HRPO utilizada na polimerização para quantidade de HRPO imobilizada ativa.

<b>Experimento</b>	<b>m<sub>HRPOSp</sub></b>	<b>Abs<sub>BIOS</sub></b>	<b>Calibração</b>	<b>m<sub>HRPOat</sub></b>	<b>m<sub>HRPOSp</sub>/ m<sub>HRPOat</sub></b>
0	0 (controle)	0,120	2,05	0,00	<b>0,000</b>
1	40000	0,197	4,00	1,95	<b>20500,00</b>
2	80000	0,237	4,73	2,68	<b>29818,18</b>
3	120000	0,281	5,95	3,90	<b>30750,00</b>
4	160000	0,254	5,22	3,17	<b>50461,54</b>

Utilizando-se como critério de eficiência a relação  $m_{HRPOSp}/ m_{HRPOat}$ , pode-se concluir que o experimento 1 foi o mais eficiente, pois utilizou uma menor massa de HRPO na polimerização por HRPO imobilizada na forma ativa.

Para as condições testadas, pode-se afirmar que a mais eficiente foi a obtida no experimento 1, onde consumiram-se 20500 ng de HRPO para cada 1 ng de HRPO imobilizada na forma ativa.

Estes experimentos vêm a confirmar, porém de forma quantitativa, a afirmação de Tatsuma *et al*, de que nas imobilizações enzimáticas por eletropolimerização polimérica a maior parte das enzimas presentes na solução de polimerização é perdida [35].

#### **4.8. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO V3.5R3 POR ENTRAPMENT COM INOCULAÇÃO DA ENZIMA HRPO**

Este método de detecção consiste em duas etapas:

1) imobilização por *entrapment* de um anticorpo específico para a enzima HRPO (no caso o V3.5R3) com o uso do monômero pirrol, conforme os parâmetros previamente desenvolvidos na imobilização da mesma enzima;

2) inoculação da HRPO, na qual o filme de PPy com o anticorpo imobilizado é imerso em uma solução com alta concentração de HRPO, com a intenção de formar ligações enzima-anticorpo nos sítios ativos livres do mesmo.

A imobilização do anticorpo ocorre de forma semelhante à imobilização da enzima: o anticorpo (Ac) é colocado em uma solução do monômero pirrol com  $\text{LiClO}_4$  (eletrólito) e submetido a um processo de eletropolimerização por aplicação de um potencial, conforme explicado anteriormente.

A etapa de inoculação é feita em placas de ELISA, onde o disco com o anticorpo imobilizado é deixado em contato com 70  $\mu\text{L}$  (quantidade mínima necessária para cobrir a superfície do eletrodo) de solução de HRPO 1,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  durante 1 hora.

O desempenho do biossensor também é avaliado pela sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , baseados nas condições ótimas estudadas na eletropolimerização da enzima HRPO mostradas na Tabela 3 (página 66). Alguns valores tiveram de ser alterados porque não foi possível imobilizar o V3.5R3 nas mesmas condições que a HRPO devido à pouca formação do filme de polipirrol.

Da mesma forma que a HRPO atua como inibidor do crescimento do filme de PPy, podemos afirmar que o anticorpo V3.5R3 é um inibidor mais atuante, pelas condições mais intensas que foram adotadas, conforme será visto a seguir.

#### 4.8.1. IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO V3.5R3

As primeiras tentativas de imobilização do anticorpo (V3.5R3) foram realizadas de forma idêntica ao procedimento de imobilização da HRPO - Tabela 3 (página 66). Porém naquelas condições obteve-se pouca formação de filme polimérico, insuficiente para cobrir totalmente a superfície do eletrodo. De forma a melhorar a deposição de filme, passou-se o número de ciclos de 3 para 5. Nesta condição observou-se que o filme cobriu uma área maior, mas não chegou a cobrir totalmente a superfície do eletrodo. Foram observados os picos de corrente e percebeu-se que a mesma não atingia um valor alto o bastante para a formação do filme.

Para aumentar este valor da corrente foi necessário aumentar a quantidade de íons em solução, aumentando a concentração de  $\text{LiClO}_4$ , conservando-se a mesma relação entre as concentrações de anticorpo e o Py. Seguindo este raciocínio, elevou-se a concentração do eletrólito de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  a  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ , mantendo-se o número de ciclos em cinco, e não três, como pode ser feito para HRPO.

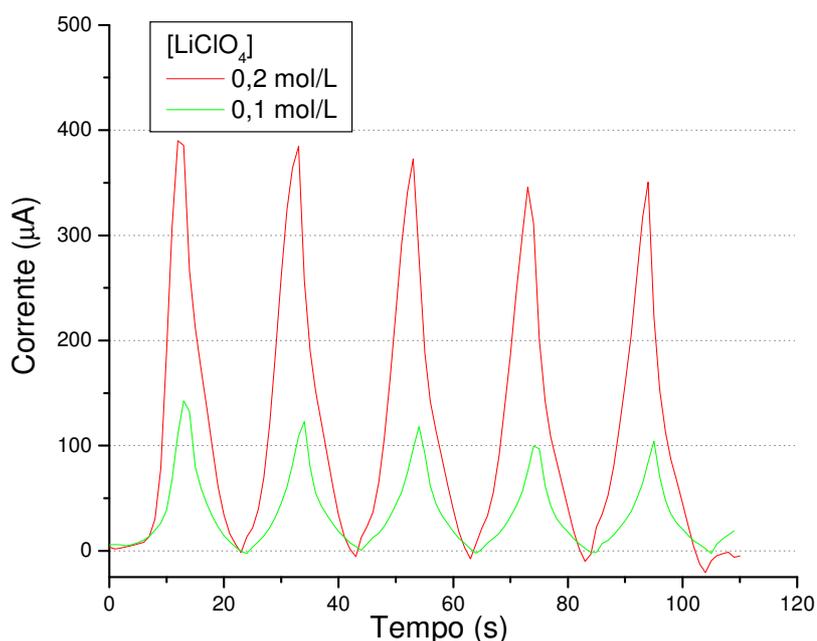


Figura 34 – Gráfico tempo x corrente para eletropolimerizações de imobilização do V3.5R3 nas concentrações de  $\text{LiClO}_4$  de  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  para verificação da influência do eletrólito no grau de polimerização.

Conforme mostra a Figura 34, utilizando a  $[\text{LiClO}_4]=0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  foi possível atingir valores de corrente próximos a  $400 \mu\text{A}$  (2,5 vezes maiores que com  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ), obtendo um recobrimento total do eletrodo.

Estas condições mais críticas mostram que a imobilização do anticorpo V3.5R3 é mais difícil que a da enzima HRPO, ou seja, a presença deste biocomponente na solução de eletropolimerização prejudica a reação de forma mais efetiva que a HRPO.

Tabela 5 – Condições de imobilização do anticorpo V3.5R3. Em negrito estão os parâmetros alterados em relação às condições de imobilização da enzima HRPO (Tabela 3).

Parâmetro	Condição de EP
Faixa de potencial	500 mV a 1000 mV
Velocidade de varredura	$50 \text{ mV.s}^{-1}$
<b>Concentração do eletrólito</b>	<b>0,2 M LiClO<sub>4</sub></b>
Concentração do monômero	0,05 M pirrol
Concentração da enzima	$0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$
<b>Espessura do filme</b>	<b>5 ciclos de 0,0 a 500 mV</b>

A eficiência da imobilização do V3.5R3 só é efetivamente verificada após a inoculação da HRPO, pois sem este procedimento o sensor apresenta baixa sensibilidade ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , como será mostrado na próxima seção.

#### 4.8.2. INOCULAÇÃO DA ENZIMA HRPO

A etapa de inoculação da enzima HRPO tem duas finalidades:

- 1) sensibilizar o eletrodo à presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;
- 2) confirmar a presença do V3.5R3 no eletrodo, visto que a inoculação da HRPO ocorrerá através da ligação com o anticorpo.

Como foi mostrado na Figura 2 (Introdução), considera-se que dos vários sítios ativos da molécula HRPO, um deles liga-se ao V3.5R3 enquanto outros sítios ficam livres

para reagir com o  $H_2O_2$  e apresentem um sinal elétrico detectável nesta reação com  $H_2O_2$ , mesmo considerando efeitos de impedimento ou restrição espacial.

Para estudar este sistema, utilizou-se a albumina (*bovine albumine serum* - BSA) – uma proteína inespecífica ao  $H_2O_2$  – como “branco” às etapas de polimerização e de inoculação. Como mostra a Tabela 6, foram experimentadas três condições:

- V3.5R3 imobilizado por polimerização e HRPO inoculada;
- BSA aplicada na polimerização (“branco” do V3.5R3) com HRPO inoculada;
- V3.5R3 na polimerização sem inoculação (“branco” da enzima HRPO).

Tabela 6 – Esquema descritivo do teste com enzima inespecífica para o  $H_2O_2$  para o biossensor preparado pelas etapas de entrapment do V3.5R3 seguido de inoculação da enzima HRPO.

	Polimerização	Inoculação	Objetivo
a)	V3.5R3	HRPO	Detectar $H_2O_2$
b)	BSA	HRPO	Testar efeito do V3.5R3
c)	V3.5R3	BSA	Testar efeito da HRPO

A sensibilidade ao  $H_2O_2$  das amostras foi analisada, conforme mostra a Figura 35.

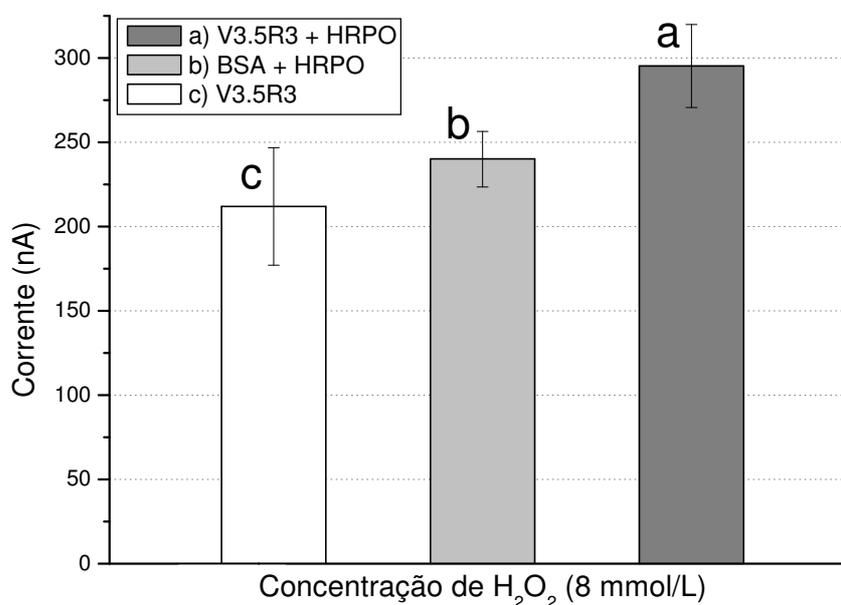


Figura 35 – Comparação da sensibilidade ao  $H_2O_2$  nos três experimentos de entrapment e inoculação: a) polimerização de V3.5R3 com inoculação de HRPO; b) polimerização de BSA com inoculação de HRPO; e c) polimerização de V3.5R3 sem inoculação.  $[H_2O_2] = 8 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

Os dados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os dados obtidos com os biossensores confeccionados pelo método a) V3+HRPO e os grupos de controle b) BSA+HRPO (controle do V3.5R3) e c) V3.5R3 (controle da HRPO) foram realizadas pelo teste t de Student para dados não pareados, sendo rejeitada a hipótese nula para um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Através do teste t de Student conclui-se que a inoculação da HRPO ao eletrodo com o V3.5R3 imobilizado possibilita a obtenção de biossensores mais sensíveis ao  $H_2O_2$ . No experimento “b” é identificado um aumento na resposta ao  $H_2O_2$  devido à HRPO adsorvida à superfície da matriz polimérica. Cabe ressaltar que na adsorção não há ligação química, e conseqüentemente o tempo de meia-vida deste sensor é prejudicado.

O experimento a) V3+HRPO apresentou a maior resposta dentre os três, visto que a imobilização do anticorpo V3 permite uma maior possibilidade de ligações para a HRPO junto aos seus sítios ativos. Comparando-se os biossensores V3+HRPO com os preparados por imobilização enzimática direta, para a concentração de  $8 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $H_2O_2$ , os primeiros atingem valores próximos de 300 nA (Figura 35), enquanto que os biossensores com HRPO diretamente via *entrapment* atingem respostas de até 600 nA (Figuras 28, 29 e 30). Na literatura não foram encontrados biossensores imobilizados com o uso de *entrapment* seguido de inoculação para fins comparativos. No entanto, o fato dos biossensores V3+HRPO apresentarem sinal muito inferior aos produzidos com HRPO imobilizada pode ser explicado analisando-se a perda de material que ocorre na etapa de eletropolimerização, como foi discutido na seção 4.4.7 – Capacidade de Imobilização de Enzima Ativa:

Pelo cálculo mostrado na Tabela 4 (página 77), obtém-se em média a imobilização efetiva de apenas 1 a cada 465,72 moléculas de HRPO disponíveis na solução para o *entrapment*. Visto que o anticorpo é imobilizado pelo mesmo método, deve-se considerar que as perdas sejam semelhantes ou ainda maiores, pelas condições de polimerização mais críticas. Além disto, embora a eficiência da etapa de inoculação não tenha sido avaliada, deve-se considerar que esta também apresente perdas por eficiência.

## 5. CONCLUSÕES

O PPy apresentou-se eficaz como elemento de imobilização de biocomponentes em biossensores. Pôde-se comprovar a imobilização da enzima HRPO através do ganho de sensibilidade ao  $H_2O_2$  de até 2,5 vezes quando comparado a eletrodos preparados sem a presença da enzima. A imobilização do anticorpo V3.5R3 foi estatisticamente comprovada através do teste t de Student utilizando a albumina como controle.

Dentro dos estudos de imobilização da HRPO via *entrapment*, os estudos sobre os parâmetros físico-químicos possibilitaram um maior conhecimento sobre esta técnica de imobilização. As concentrações de  $LiClO_4$ , pirrol e HRPO foram experimentadas e encontrou-se valores ótimos semelhantes aos indicados por Razola, principal referência deste trabalho, considerando como critério de otimização a sensibilidade do biossensor ao  $H_2O_2$ .

Verificaram-se como valores ótimos para os parâmetros Faixa de potencial, Velocidade de varredura e Espessura do filme na imobilização via *entrapment* da enzima HRPO, respectivamente: +500 a +1000 mV;  $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ , realizando 3 ciclos. Como estes parâmetros são interdependentes, estas alterações dos valores descritos por Razola são consideradas como uma adaptação do método para efeito de maior simplicidade e reprodutibilidade.

O biossensor com imobilização direta da HRPO apresentou comportamento linear da corrente com a concentração de  $H_2O_2$  quando aplicado o potencial de +500 mV até o valor de 16 mmol/L de  $H_2O_2$ , com valor de corrente estável e ruído de  $\pm 20 \text{ nA}$ .

O método de estimativa quantitativa da relação entre a massa de HRPO adicionada à solução e a massa de HRPO ativa imobilizada no biossensor através de ensaio colorimétrico comprovou o que vários autores citam como uma desvantagem do método de *entrapment*: a grande quantidade de enzima necessária para pouca imobilização efetiva no biossensor. Esta estimativa oferece uma nova possibilidade de aplicação em cálculos quantitativos. A técnica FTIR mostra que o espectro do filme PPy-HRPO é bastante

semelhante ao espectro do PPy puro, sugerindo que a imobilização da enzima HRPO no filme de PPy ocorre sem alteração na estrutura química do polímero. No entanto, deve-se considerar a pequena quantidade de HRPO presente no filme (conforme demonstrado no ensaio colorimétrico), o que pode prejudicar o estudo da sua influência no filme, assim como qualquer conclusão em relação ao mecanismo do método de *entrapment* baseado neste.

Ao contrário do que era esperado, os biossensores preparados pelo método de imobilização do V3+HRPO (*entrapment*-inoculação) apresentaram respostas ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais baixas que as atingidas pelos biossensores preparados com a HRPO via *entrapment*. Mesmo que o método de inoculação imobilize a enzima HRPO em uma configuração livre de impedimentos espaciais, esta condição não foi o suficiente para superar estas perdas conseqüentes de cada etapa de imobilização.

Conclui-se que esta menor sensibilidade dos biossensores com anticorpo V3.5R3 é devido a este biocomponente ser mais difícil para imobilização por *entrapment* do que a HRPO, exigindo condições mais críticas, além de a etapa de inoculação também apresentar perdas por eficiência.

Mesmo obtendo uma sensibilidade menor, aproximadamente a metade em relação ao primeiro método, a inoculação e a utilização de anticorpos surge como uma inovação em termos de preparo de biossensores e métodos de imobilização de biocomponentes.

## 6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O estudo do mecanismo de imobilização continua sendo uma lacuna para a tecnologia dos biossensores obtidos por EP de PIC's. Alguns estudos mostram que as cinéticas de reação são afetadas pela presença do biocomponente, porém ainda existem inúmeras possibilidades para a pesquisa do mecanismo. Algumas possibilidades sugeridas neste sentido são:

1) experimentos com microbalanças para o acompanhamento em tempo real da relação formação do filme x corrente e

2) estudo da solução de EP por cromatografia antes e depois da eletropolimerização.

De forma a buscar aplicações comerciais deste estudo, uma próxima etapa seria o desenvolvimento deste biossensor em mecanismo semelhante aos utilizados pelos biossensores de glicose, já em avançada expansão comercial. O uso de filmes poliméricos em biossensores de base descartável, como o esquema mostrado na Figura 36-a, pode agregar um menor custo de produção devido à pequena quantidade de reagente necessária, o que é uma vantagem na competitividade do produto.

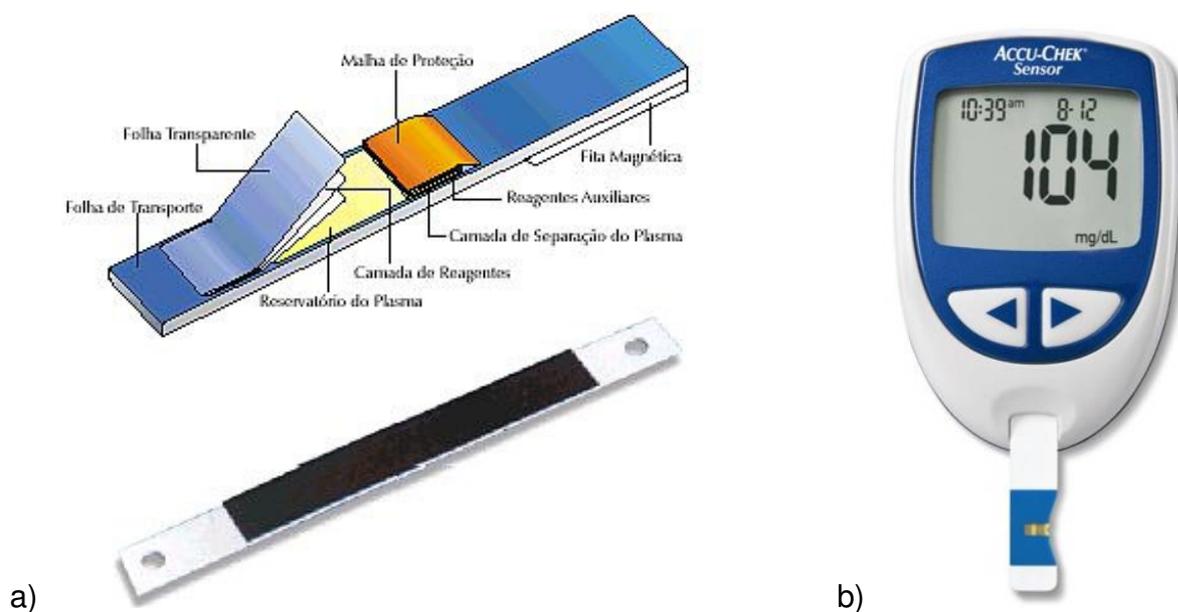


Figura 36 - a) Esquema de biossensor comercial para imobilização enzimática - vista superior e inferior; b) aparelho eletrônico para a leitura da concentração do analito.

Na área industrial, um estudo aplicado de biossensores pode ser realizado utilizando o modelo apresentado em eletrodos de platina, os quais podem desempenhar um ótimo papel no controle de processos e demais áreas, como mostrado no Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica. Em abatedouros e frigoríficos, por exemplo, o  $H_2O_2$  é utilizado como desinfetante e a presença deste no efluente pode indicar um excesso de utilização. O monitoramento do  $H_2O_2$  poderia ser realizado com o uso de biossensores.

De forma a ampliar as possibilidades de aplicação, é sugestão do autor a utilização não só da enzima HRPO na imobilização por eletropolimerização como também estudar outros biocomponentes e suas interações com polímeros.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – Gurunathan, K., Murugan, A.V., Marimuthu, R., Mulik, U.P., Amalnerkar, D.P., “Electrochemically synthesized conducting polymeric materials for application towards technology in electronics, aptoelectronics and energy storage devices”, *Materials Chemistry and Physics*, 61, 173-191, **1999**.
- 2 – Angelopoulos, M., “Conducting polymers in microelectronics”, *IBM J. RES. & DEV*, Vol. 45, nº. 1, **2001**.
- 3 – Gil, E., Kubota, L., “Alguns aspectos de imunoensaios aplicados à química analítica”, *Quim. Nova*, 22(6), 874-879, **1999**.
- 4 – Gizeli, E., Lowe, C., “Immunosensors”, *Current Opinion in Chemical Biology*, 7, 66-71, **1996**.
- 5 – Duke, C.B., Schein, L.B., “Organic solids: is energy-based theory enough?”, *Phys. Today*, 33, 42-48, **1980**.
- 6 – Meneguzzi, A., “Eletrosíntese de filmes de polímeros a partir de naftilaminas substituídas sobre metais oxidáveis e síntese química. Aplicação na proteção contra a corrosão.”, Porto Alegre, **2000**, 141 p. Tese de Doutorado em Engenharia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 7 – Jonas, F., Heywang, G., “Technical applications for conductive polymers”, *Electrochimica Acta*, 39, Nº 8/9, 1345-1347, **1994**.
- 8 – Basso, M.A., “Síntese e Caracterização de PDAN...”, Porto Alegre, **2000**, 106 p. Dissertação de Mestrado em Engenharia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 9 – V. Saxena, B.D. Malhotra, “Prospects of conducting polymers in molecular electronics”, *Current Applied Physics*, 3, 293-305, **2003**.
- 10 – Pereira, A.C., Santos, A., Kubota, L.T., “Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas”, *Quim. Nova*, 25, 1012-1021, **2002**.
- 11 – Gerard, M., Chaubey, A., Malhotra, B.D., “Application of conducting polymers to biosensors”, *Biosensors and Bioelectron*, 17, 345-359, **2002**.

- 12 – Shirakawa, H., Louis, E.J., MacDiarmid, A.G., Chiang, C.K., Heeger, A.J., “Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene,  $(CH)_x$ ”, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 578, **1977**.
- 13 – Deshpande, M.V., Amalnerkar, D.P., “Biosensors prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers”, *Prog. Polym. Sci.*, 18, 623-649, **1993**.
- 14 – Guiseppi-Elie, A., Wallace, G.G., Matsue, T., “Chemical and biological sensors based on electrically conducting polymers” in *Handbook of Conducting Polymers*, chapter 34, 963-991.
- 15 – Brahim, S., Narinesingh, D., Guiseppi-Elie, A., “Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 53-59, **2002**.
- 16 – Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., “Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water”, *Enzyme and Microbial Technol.*, 32, 3-13, **2003**.
- 17 – Ziegler, C., Göpel, W., “Biosensor development”, *Current Opin. in Chem. Biology*, 2:585-591, **1998**.
- 18 – Razola, S.S., Ruiz, B.L., Diez, N.M., Kauffmann, J.M., “Hydrogen peroxide sensitive amperometric biosensor based on horseradish peroxidase entrapped in a polypyrrole electrode”, *Biosensors and Bioelectron.*, 17, 921-928, **2002**.
- 19 – Fiorito, P., Torresi, S., “Glucose amperometric biosensor based on the co-immobilization of GOx and ferrocene in poly(pyrrole) generated from ethanol/ water mixtures”, *J. Braz. Chem. Soc.*, 12, nº 6, **2001**.
- 20 – Patel, P.D., “(Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review”, *Trends Anal. Chem.*, vol. 21, no. 2, 96-115, **2002**.
- 21 – Adhikari, B., Majumdar, S., “Polymers in sensor applications”, *Prog. Polym. Sci.*, 29, 699-766, **2004**.
- 22 – Bidan, G., “Electroconducting conjugated polymers: new sensitive matrices to build up chemical or electrochemical sensors. A review”, *Sensors and Actuators B*, 6, 45-56, **1992**.
- 23 – Rosatto, S.S., “Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol à base de peroxidase e sílica modificada”. Campinas, **2000**, 116 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

- 24 – Schuhmann, W., Kranz, C., Wohlschläger, H., Strohmeier, J., “Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces”, *Biosensors & Bioelectronics*, 12, 1157-1167, **1997**.
- 25 – Piro, B., Dang, L.A., Pham, M.C., Fabiano, S., Tran-Minh, C., “A glucose biosensor based on modified-enzyme incorporated within electropolymerised poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT) films”, *J. Electroanal. Chem.*, 512, 101-109, **2001**.
- 26 – West, K., Jacobsen, T., Zachau-Christiansen, B., “Electrochemical synthesis of polypyrrole: influence of current density on structure”, *J. of Electroanal. Chem.*, 470, 144-156, **1999**.
- 27 – Bilger, R., Heinze, J., “Role of the formation potential on the redox processes of polypyrrole studied by an electrochemical quartz microbalance”, *Synthetic Metals*, 55, 1424-1429, **1993**.
- 28 – Stankovic, S., Stankovic, R., Ristic, M., Pavlovic, O., Vojnovic, M., “Some aspects of the electrochemical synthesis of polypyrrole”, *Reactive & Functional Polymers*, 35, 145-151, **1997**.
- 29 – Kiani, M.S., Mitchell, G.R., “The role of the counter-ion in the preparation of polypyrrole films with enhanced properties using a pulsed electrochemical potential”, *Synthetic Metals*, 48, 203-218, **1992**.
- 30 – Bakker, E., “Electrochemical Sensors”, *Anal. Chem.*, 76, 3285-3298, **2004**.
- 31 – Coche-Guerente, L., Cosnier, S., Innocent, C., Mailley, P., “Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives”, *Analyt. Chim. Acta*, 311, 23-30, **1995**.
- 32 – Lowe, C., Hin, B., Cullen, D., Evans, S.E., Stephens, L.D.G., Maynard, P., “Review – Biosensors”, *J. Chromatography*, 510, 347-354, **1990**.
- 33 – Davis, G., “Electrochemical techniques for the development of amperometric biosensors”, *Biosensors*, 1, 161-178, **1985**.
- 34 – Cosnier, S., “Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review”, *Biosensors and Bioelectron.*, 14, 443-456, **1999**.

- 35 – Tatsuma, T., Ogawa, T., Sato, R., Oyama, N., “Peroxidase-incorporated sulfonated polyaniline-polycation complexes for electrochemical sensing of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>”, *J. Electroanal. Chem.*, 501, 180-185, **2001**.
- 36 – Gaspar, S. Habermüller, K., Csöregia E., Schuhmann, W., “Hydrogen peroxide sensitive biosensor based on plant peroxidases entrapped in Os-modified polypyrrole films”, *Sensors and Actuators B*, 72, 63-68, **2001**.
- 37 – Latonen, R., Kvarnström, C., Grzeszczuk, M., Ivaska, A., “Study of electrolyte effects on electrochemical synthesis and p-doping of poly(thienyl biphenyl) films”, *Synthetic Metals*, 130, 257-269, **2002**.
- 38 – Wang, B., Tang, J., Wang, F., “The effect of anions of supporting electrolyte on the electrochemical polymerization of aniline and the properties of polianiline”, *Synthetic Metals*, 13, 329-334, **1986**.
- 39 – Cass, A. E. G., Davis, G., Francis G.D., Hill, H.A.O., Higgins, I.J., Aston, W.J., Plotkin, E.V., Scott, L.D.L., Turner, A.P.F., “Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose”, *Anal. Chem.*, 56, 667-671, **1984**.
- 40 – Salmon, M., Diaz, A.F., Logan, A.J., Lrounbi, M., Bargon, J., “Chemical Modification of Conducting Polypyrrole Films”, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, 83, 265-276, **1982**.
- 41 – Hoa, D.T., Kumar, T. N., Punekar, N. S., Srinivasa, R. S., *et al*, “Biosensors based on Conducting Polymers”, *Anal. Chem.*, 64, 2645-2646, **1992**.
- 42 – Sethi, R., “Transducer aspects of biosensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 243-264, **1994**.
- 43 – Cammann, K., “Continuous Pollution Control by Chemical Sensors”, *Sensors and Actuators B*, 6, 19-24, **1992**.
- 44 – Riccardi, C., Costa, P., Yamanaka, H., “Imunossensor Amperométrico”, *Quim. Nova*, Vol. 25, Nº. 2, 316-320, **2002**.
- 45 – Fágáin, C.O., “Enzyme stabilization – recent experimental progress”, *Enzyme Microbial Technology*, 33, 137-149, **2003**.
- 46 – Fatibello, O., Vieira, I.C., “Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática”, *Quim. Nova*, Vol. 25, nº 3, 455-464, **2002**.
- 47 – Lowe, C., “An introduction to the concepts and technology of biosensors”, *Biosensors*, 1, 3-16, **1985**.

- 48 – Aizawa, M., “Principles and applications of electrochemical and optical biosensors”, *Analytica Chimica Acta*, 250, 249-256, **1991**.
- 49 – Von Woedtke, T., Fischer, U., Abel, P., “Glucose oxidase electrodes: effect of hydrogen peroxide on enzyme activity”, *Bios. & Bioelectron.*, 9, 65-71, 1994.
- 50 – Ruzgas, T., Csöregi, E., Emnéus, J., Gorton, L., Marko-Varga, György, “Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application”, *Anal. Chim. Acta*, 330, 123-138, 1996.
- 51 – Anh, D., Olthuis, W., Bergveld, P., “Hydrogen peroxide detection with improved selectivity and sensitivity using constant current potentiometry”, *Sensors and Actuators B*, 91, 1-4, **2003**.
- 52 – Evtugyn, G.A., Budnikov, H.C., Nikolskaya, E.B., “Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination”, *Talanta*, 46, 465-484, **1998**.
- 53 – D’Auria, S., Lakowicz, J.R., “Enzyme fluorescence as a sensing tool: new perspectives in biotechnology”, *Anal. Biotech.*, 12, 99-104, **2001**.
- 54 – Fernandes, K.F., Lima, C.S., Pinho, H., Collins, C.H., “Immobilization of horseradish peroxidase onto polyaniline polymers”, *Process Biochemistry*, 38, 1379-1384, **2003**.
- 55 – Mota, I., Alvarez, J.M., Fernandes, I., “Dicionário da Imunologia; *Atheneu Editora* São Paulo, **1999**.
- 56 – Gooding, J., Wasiowycha, C., Barnett, D., “Electrochemical modulation of antigen-antibody binding”, *Biosens. and Bioelectron.*, Article in Press, **2004**.
- 57 – Karyakin, A.A., Vuki, M., Lukachova, L.V., Karyakina, E.E., Orlov, A.V., Karpachova, G.P., Wang, J., “Processable polyaniline as an advanced potentiometric pH transducers”, *Anal. Chem.*, 71, 2534-2540, **1999**.
- 58 – Schuhmann, W., “Conducting polymers and their application in amperometric biosensors”, *Mikrochim. Acta*, 121, 1–29, **1995**.
- 59 – Bourdillon, C., Thomas, V., Thomas, D., “Electrochemical study of D-glucose oxidase autoinactivation”, *Enzyme Microb. Technol.*, Vol. 4, 175-180, **1982**.
- 60 – Killard, A., Smyth, M., “Creatinine biosensors: principle and design”, *Tib. Oct.*, 18, 433-437, **2000**.30
- 61 – Doretto, L., Ferrara, D., Lora, S., “Enzyme-entrapping membranes for biosensors obtained by radiation-induced polymerization”, *Bios. & Bioelectron.*, 8, 443-450, **1993**.
- 62 – Dong, S., Chen, X., “Some new aspects in biosensors”, *Rev. in Molec. Biotech.*, 82, 303-323, **2002**.

- 63 – Koncki, R., Hulanicki, A., Gigb, S., “Biochemical modifications of membrane ion-selective sensors”, *Trends in Anal. Chem.*, vol. 76, nº. 9, 528-536, **1997**.
- 63 – Página da internet: [http://www.lanacion.com.ar/Archivo/nota.asp?nota\\_id=815024](http://www.lanacion.com.ar/Archivo/nota.asp?nota_id=815024) (acessada em 16/01/2007).
- 64 – Lei, Y., Chen, W., Mulchandani, A., “Review - Microbial biosensors”, *Analytica Chimica Acta*, 568, 200-210, **2006**.
- 65 – Berkenpas, E., Millard, P., Cunha, M.P., “Detection of *Escherichia coli* O157:H7 with langasite pure shear horizontal surface acoustic wave sensors”, *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 2255-2262, **2006**.
- 66 – Alocilja, E.C., Radke, S.M., “Market analysis of biosensors for food safety”, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841-846, **2003**.
- 67 – Oh, S., “Immunosensors for food safety”, *Trends Food Science & Technology*, 41, 98-103, **1993**.
- 68 – Kirstein, D., Kirstein L., Scheller, F., “Amperometric nitrate biosensors on the basis of *Pseudomonas stutzeri* nitrate reductase”, *J. of Electroanal. Chem.*, 474, 43–51, **1999**.
- 69 – Medyantseva, E., Khaldeeva, E., Glushko, N., Budnikov, H., “Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum*”, *Anal. Chim. Acta*, 411, 13-18, **2000**.
- 70 – Kauffmann, J-M , Viré, J-C., “Pharmaceutical and biomedical applications of electroanalysis – A critical review”, *Analytica Chimica Acta*, 273, 329-334, **1993**.
- 71 – D’Orazio, P., “Biosensors in clinical chemistry – Review”, *Clinica Chimica Acta*, 334, 41-69, **2003**.
- 72 – Connolly, P., “Clinical diagnostics opportunities for biosensors and bioelectronics”, *Biosensors & Bioelectronics*, 10, 1-6, **1995**.
- 73 – Malhotra, B.D., Chaubey, A., “Biosensors for clinical diagnostics industry”, *Sensors and Actuators B*, 91, 117–127, **2003**.
- 74 – Wang, J., “Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring – a review”, *J. of Pharm. and Biomedical Analysis*, 19, 47-53, **1999**.
- 75 – Halámek, J., Makover, A., Skládal, P., Scheller, F., “Highly sensitive detection of cocaine using a piezoelectric immunosensor”, *Biosens. Bioelectron.*, 17, 1045-1050, **2002**.
- 76 – Brooks, S.L., Higgins, I.J., Newman, J.D., Turner, A.P.F., “Biosensors for process control”, *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 946-955, **1991**.

- 77 – Gronow, M., “Biosensors”, *TIBS*, 336-340, **1984**.
- 78 – Scheper, T., Brandes, W., Grau, C., Hundeck, H.G., Reinhardt, B., Ruther, F., Plotz, F., Schelp, C., “Applications of biosensor systems for bioprocess monitoring”, *Analytica Chimica Acta*, 249, 25-34, **1991**.
- 79 – Mello, L.D., Kubota, L.T., “Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries”, *Food Chemistry*, 77, 237–256, **2002**.
- 80 – Venugopal, V., “Biosensors in fish production and quality control”, *Biosensors & Bioelectronics*, 17, 147-157, **2002**.
- 81 – Farré, M., Barceló, D., “Toxicity Testing of Wastewater and Sewage Sludge by Biosensors, Bioassays and Chemical Analysis”, *Trends Anal. Chem.*, Vol. 22, No. 5, 299-310, **2003**.
- 82 – Wang, J., Rivas, G., Cai, X., Palecek, E., Nielsen, P., “DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review”, *Anal. Chimica Acta*, 347, 1-8, **1997**.
- 83 – Palecek, E., Fojta, M., Tomschik, M., Wang, J., “Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage”, *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 621-628, **1998**.
- 84 – Junhui, Z., Hong, C., Ruifu, Y., “DNA based biosensors”, *Biotechnology Advances*, Vol. 15, n° 1, 43-58, **1997**.
- 85 – Wang, J., “DNA biosensors based on Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review”, *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 757-762, **1998**.
- 86 – Marty, J.-L., Garcia, D., Rouillon, R., “Biosensors: Potential in Pesticide Detection”, *Trends Anal. Chem.*, Vol. 14, No. 7, 329-333, **1995**.
- 87 – Mazzei, F., Botrè, F., Botrè, C., “Acid phosphatase/ glucose oxidase-based biosensors for the determination of pesticides”, *Anal. Chimica Acta*, 336, 67-75, **1996**.
- 88 – Rogers, K.R, Williams, L.R., “Biosensors for Environmental Monitoring: a regulatory perspective” , *Trends in Anal. Chem.*, vol. 14, 289-294, **1995**.
- 89 – Rogers, K.R., “Biosensors for Environmental Applications”, *Biosensors & Bioelectronics*, 10, 533-541, **1995**.
- 90 – Sadik, O., Van Emon, J., “Applications of Electrochemical Immunosensors to Environmental Monitoring”, *Biosensors & Bioelectronics* ,Vol. 11 N°. 8, **1996**.
- 91 – Karube, I., Nomura, Y., Arikawa, Y., “Biosensors for Environmental Control”, *Trends in Anal. Chem.*, vol. 14, 295-299, **1995**.

- 92 – Dennison, M. J., Turner, A.P.F., “Biosensors For Environmental Monitoring”, *Biotech. Adv.*, 13, 1-12, **1995**.
- 93 – Marco, M.-P., Gec, S., Hammock, B.D., “Immunochemical techniques for environmental analysis”, *Trends Anal. Chem.*, Vol. 14, No. 7, 341-350, **1995**.
- 94 – Rosatto, S., Freire, R., Duran, N., Kubota, L., “Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental”, *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 1, 77-86, **2001**.
- 95 – Scheller, F.W., Schubert, F., Renneberg, R., “Biosensors: Trends and Commercialization”, *Biosensors*, 1, 135-160, **1985**.
- 96 – Thévenot, D., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G., “Electrochemical biosensor: recommended definitions and classification”, *Biosensors and Bioelectron.*, 16, 121-131, **2001**.
- 97 – Willner, I., Willner, B., “Biomaterials integrated with electronic elements: en route to bioelectronics”, *Trends in Biotech.*, 19, 222-230, **2001**.
- 98 – Schroth, P., Schöning, M.J., Schütz, S., “Coupling of insect antennae to field-effect transistors for biochemical sensing”, *Electrochimica Acta*, 44, 3821-3826, **1999**.
- 99 – Schütz, S., Schöning, M.J., Schroth, P., “An insect-based BioFET as a bioelectronic nose”, *Sensors and Actuators B*, 65, 291-295, **2000**.
- 100 – Schroth, P., Schöning, M.J., Kordos, P., “Insect-based BioFETs with improved signal characteristics”, *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 303-308, **1999**.
- 101 – Faia, P.M., Pereira, M.A., Nunes, A.M., Furtado, C.S., “Electronic Noses, a Different Approach to the Sensitivity and Selectivity Issues”, *J. Europ. Cer. Soc.*, 19, 883-886, **1999**.
- 102 – Gomila, G., Errachida, A., Ruiza, O., Pajotb, E., Minicb, J., “Advances in the production, immobilization, and electrical characterization of olfactory receptors for olfactory nanobiosensor development”, *Sensors and Actuators B*, 116, 66-71, **2006**.
- 103 – Bartlett, P., Whitaker, R.G., “Strategies for the development of amperometric enzyme electrodes”, *Biosensors*, 3, 359-379, **1988**.
- 104 – Kirstein, D., Kirstein, L., Scheller, F., “Enzyme Electrode for Urea with Amperometric Indication: Part I – Basic Principle”, *Biosensors*, 1, 117-130, **1985**.
- 105 – Lippa, P., Sokoll, L., Chan, D., “Immunosensors – principles and applications to clinical chemistry”, *Clinica Chimica Acta*, 314, 1-26, **2001**.

- 106 – Huang, T.S., Tzeng, Y., Liu, Y.K., Chen, Y.C., “Immobilization of antibodies and bacterial binding on nanodiamond and carbon nanotubes for biosensor applications”, *Diamond and Rel. Materials*, 13, 1098-1102, 2004.
- 107 – Mattos, I.L., Shiraishi, K.A., Braz, A.D., Fernandes, J.R., “Peróxido de hidrogênio: importância e determinação”, *Quim. Nova*, Vol. 26, Nº 3, 373-380, **2003**.
- 108 – Rover Júnior, L., “Construção e avaliação de biossensor amperométrico para salicilato usando salicilato hidroxilase imobilizada em matriz de polipirrol com glutaraldeído”. Campinas, **1999**, 150 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
- 109 – Tatsuma, T., Gondaira, M., Watanabe, T., “Peroxidase-incorporated polypyrrole membrane electrodes”, *Anal. Chem.* 64, 1183-1187, **1992**.
- 110 – Abel, P.U., von Woedtke, P., Schulz, B., Bergann, T., Schwock, A., “Stability of immobilized enzymes as biosensors for continuous application in vitro and in vivo”, *J. Molec. Cat. B: Enzym.*, 7, 93–100, **1999**.
- 111 – Adami, M., Sartore, M., Rapallo, A., Nicolini, C., “Possible developments of a potentiometric biosensor”, *Sensors and Actuators B*, 7, 343-346, **1992**.
- 112 – Schuhmann, W., Lehn, C., Schmidt, H., “Comparison of native and chemically stabilized enzymes in amperometric enzyme electrodes”, *Sensors and Actuators B*, 7, 393-398, **1992**.
- 113 – Sargent, A., Loi, T., Gal, S., Sadik, O.A., “The electrochemistry of antibody-modified conducting polymers electrodes”, *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 243-264, **1994**.
- 114 – Geniès, E. M., “Processing techniques to electronic conducting polymers”, *New J. Chem.*, 15, 373-377, **1991**.
- 115 – Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., “Electrochemical Immobilisation Of Enzymes – Part I. Theory”, *J. Electroanal. Chem.*, 224, 21-35, **1987**.
- 116 – Bartlett, P.N., Whitaker, R.G., “Electrochemical Immobilisation of Enzymes – Part II. Glucose Oxidase Immobilised In Poly-N-Methylpyrrole”, *J. Electroanal. Chem.*, 224, 37-48, **1987**.
- 117 – Gibson, T.D., Hulbert, J.N., Parker, S.M., “Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system”, *Biosens. Bioelectron*, 7, 701-708, **1992**.

118 – Shin, Min-Chol, Kim, Hak-Sung, “Electrochemical characterization of polypyrrole/ glucose oxidase biosensor: Part I. Influence of enzyme concentration on the growth and properties of the film”, *Biosensors and Bioelectron.*, 11, 161-169, **1996**.

119 – Ferreira, C.A., Aeiych, S., Delamar, M., Lacaze, P.C., “Electropolymerization of pyrrole on iron electrodes – influence of solvents and electrolyte on the nature of the deposits”, *J. Electroanal. Chem.*, 284, 351-369, **1990**.