UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LÍVIA MARIA DE CASTRO SOUSA

Estudos sobre a imobilização da polifenoloxidase em filmes de polipirrol/poli-3-metiltiofeno e uso destes filmes em biossensores amperométricos

São Carlos
2013

LÍVIA MARIA DE CASTRO SOUSA

Estudos sobre a imobilização da polifenoloxidase em filmes de polipirrol/poli-3-metiltiofeno e uso destes filmes em biossensores amperométricos

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador(a): Profª. Dra. Débora Gonçalves

Versão Corrigida
original na unidade

São Carlos
2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Sousa, Lívia Maria de Castro

S725e Estudos sobre imobilização da polifenoloxidase em filmes de polipirrol/poli-3 metiltiofeno e uso destes filmes em biossensores amperométricos / Lívia Maria de Castro Sousa ; orientadora Debora Gonçalves. – São Carlos, 2013.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais - - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2013.

1. Tirosinase. 2. Biossensores. 3. Polipirrol (PPI). 4. Polimetiltiofeno (PMET). 5. Catecol. 6. Superoxidação. I. Titulo.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **LÍVIA MARIA DE CASTRO SOUSA.**

Título da dissertação: "Estudos sobre a imobilização da polifenoloxidase em filmes de polipirrol/poli-3-metiltiofeno e uso destes filmes em biossensores amperométricos".

Data da defesa: 07/06/2013

Comissão Julgadora:	**Resultado:**
Profª. Drª. **Débora Gonçalves (Orientadora)** (Instituto de Física de São Carlos/USP)	APROVADA
Dra. **Marli Leite de Moraes** (Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)	aprovada
Prof. Associado **Antonio José Felix de Carvalho** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)	aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materias:
Prof. Titular **Waldek Wladimir Bose Filho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Aos meus queridos pais e amados irmãos,
por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre perdoou cada momento que duvidei de sua força e me deu a determinação e a perseverança necessária para prosseguir com meus trabalhos e meus ideais da maneira cada vez melhor.
Aos meus pais Idelfonso e Mary e meus amados irmãos Iul Brinner e Lígia que me deram todas as condições, apoio, ensinamentos morais, confiança e principalmente amor para que eu pudesse conduzir minha vida da melhor maneira possível e realizar feitos como este.
A toda minha família, os quais tiveram cada qual à sua maneira, uma participação importante na realização de mais uma etapa importante da minha vida.
Especialmente à minha avó Geralda Maria da Conceição, que se tornou meu anjo da guarda junto aos outros entes queridos que olhem por mim de um lugar melhor.
A Renato Barbosa uma estela guia em minha vida apontando sempre as direções corretas através de todos os meus medos e inseguranças trazendo à tona sempre o melhor de mim.
A minha orientadora Profa. Débora Gonçalves pelos ensinamentos, confiança e paciência, agregando à minha formação além do conhecimento acadêmico. Muito Obrigada!
Aos meus amigos do grupo de polímeros do IFSC e em especial aos amigos da sala 18. Pessoas sempre prontas para o trabalho e para a descontração com um sorriso estampado no rosto. Obrigada queridos!
Agradeço a essas pessoas fundamentais para o andamento de qualquer trabalho e que também são responsáveis por mais esta etapa da minha vida. Muito obrigada Rosangela, Débora Balogh, Berto, Níbio, Ademir e Bruno pelo apoio técnico.
Obviamente, jamais poderia deixar de ressaltar a importância daqueles que fizeram e continuam fazendo parte da minha vida e são tão responsáveis por tudo que sou e que tenho quanto minha família. Não vou citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer-me de alguém, mas sei que todos vão saber que estão em um lugar especial das minhas doces lembranças. Agradeço a todos meus amigos da infância, da época do colégio, da graduação e da minha querida república “uai véi”, sem eles jamais seria o que sou hoje.
A CAPES pelo apoio financeiro.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Scchopenhauer

Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’

Geroge Bernard Shaw

RESUMO

SOUSA, C. M. L. **Estudos sobre a imobilização da polifenoloxidase em filmes de polipirrol/poli-3-metiltiofeno e uso destes filmes em biossensores amperométricos** 82p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Nesta dissertação, foram estudados os métodos de síntese de filmes poliméricos como matrizes hospedeiras da enzima tirosinase vislumbrando o desenvolvimento de biossensores mais seletivos e duradouros na detecção de compostos fenólicos. Os polímeros utilizados e preparados por cronoamperometria em acetonitrila foram: polipirrol (PPI), polimetiltiofeno (PMET) e copolímero PPI-PMET. Os filmes PPI-PMET apresentaram características intermediárias às dos filmes PPI e PMET, conforme se verificaram em espectros na região do infravermelho (FTIR), voltametria cíclica e microscopia de força atômica (AFM), evidenciando, assim, a formação de uma nova matriz polimérica. O processo de superoxidação do filme PPI-PMET foi estudado visando a uma imobilização mais eficiente da enzima, quando se obteve uma condição na qual a superoxidação ocorre somente nas cadeias de PPI. Biossensores amperométricos foram preparados a partir do uso da tirosinase extraída do abacate como fonte enzimática por imobilização física e realizada de maneiras diferentes em filmes não superoxidados e superoxidados. Foi feita a otimização das respostas dos filmes variando-se o pH, potencial de trabalho, concentração da enzima e tempo de imobilização da enzima para a detecção de catecol. Os resultados indicaram que a superoxidação do PPI nos filmes PPI-PMET favoreceu a imobilização da enzima, embora não fosse tão eficiente quando se comparou aos filmes com o PPI não superoxidado. Contudo, os biossensores, em geral, apresentaram grande sensibilidade ao catecol, com um limite de detecção baixo, da ordem de 0,12 μmol L^{-1}.

Palavras-chave: Tirosinase. Biossensores. Polipirrol (PPI). Polimetiltiofeno (PMET). Catecol. Superoxidação.

ABSTRACT

SOUSA, C. M. L. **Studies on the immobilization of polyphenoloxidase polypyrrole/poly-3-methylthiophene films and their use in amperometric biosensors** 82p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

The synthesis methods of polymer films as host matrices of the enzyme tyrosinase were studied in this dissertation. It was expected the development of selective and everlasting biosensors for the detection of phenolic compounds. The used polymers were prepared by chronoamperometry in acetonitrile as followed: polypyrrole (PPI), polymethylthiophene (PMET) and copolymer PPI-PMET. The PPI-PMET films showed intermediate characteristics as the PPI and PMET films, as observed in the infrared spectra (FTIR), cyclic voltammetry and atomic force microscopy (AFM), thus indicating the formation of a new polymeric matrix . The process of overoxidized of PPI-PMET film was studied in order to achieve a more efficient immobilization of the enzyme, whilst it was achieved a condition in which overoxidized occurs only in the PPI chain. Amperometric biosensors were prepared from the use of tyrosinase extracted from avocado as an enzyme source by physical immobilization and performed in different ways in both overoxidized and non-overoxidized films. It was performed the optimization of the responses of the films by varying pH, operacuonial potential, enzyme concentration and time in the enzyme immobilization for the detection of catechol. The results showed that the overoxidized PPI in the films PPI-PMET favored the immobilization of the enzyme, although not as efficient when compared to the films with nom overoxidized PPI. Neverthless, the catechol biosensors showed a high sensitivity with a low detection limit in the order of 0.12 μmol L^{-1}.

Keywords**:** Tyrosinase. Biosensors. Polypyrrole (PPY). Polymethylthiophene (PMET). Catechol. Overoxidized.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).....28

Figura 2. Estrutura (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula da histidina.....30

Figura 3. Reações catalisadas pela tirosinase.....31

Figura 4. Vantagens da enzima imobilizada em relação à enzima livre.....32

Figura 5. Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: (a) adsorção; (b) encapsulação; (c) ligação covalente, e (d) ligação covalente cruzada.....33

Figura 6. Estrutura das unidades monoméricas dos polímeros orgânicos condutores mais estudados.....35

Figura 7. Ilustração de uma célula eletroquímica mostrando os eletrodos de trabalho (a), de referência (b), calomelano (c) além da entrada (d) e saída (e) de N2.....40

Figura 8. Gráfico duplo-recíproco Lineaweaver-Burk.....43

Figura 9. Cronoamperogramas de síntese de PPI-PMET em solução 0,01 mol L-1 de pirrol e 0,1 mol L-1 de metiltiofeno em acetonitrila contendo 0,1 mol L-1 de NaClO4 em diferentes potenciais aplicados.....50

Figura 10. Cronoamperogramas de síntese dos filmes de PPI 0,01 mol L^{-1} (a) e PMET 0,1 mol L^{-1} (b) em acetonitrila contendo 0,1 mol L^{-1} $NaClO_4$ em diferentes potenciais vs Ag/AgCl. (c) comparação das curvas dos homopolímeros (PPI e PMET) e dos filmes de PPI-PMET.....51

Figura 11. Espectros de FTIR dos filmes de PPI, PMET e PPI-PMET sintetizados em acetonitrila contendo 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ no potencial de 1,8 V vs. Ag/AgCl.....53

Figura 12. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PPI-PMET, PMET e PPI em uma solução aquosa de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} a 50 mV s^{-1} no potencial de síntese de 1,8 V vs Ag/AgCl.....54

Figura 13. Imagens de AFM dos filmes PPI, PMET e PPI-PMET sintetizados por cronoamperometria utilizando potencial de 1,8 V em meio a $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} em acetonitrila.....56

Figura 14. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} em solução tampão fosfato pH 7 com catecol e sem catecol 0,1 mol L^{-1} para os filmes PPI (a), PMET (b) e PPI-PMET (c) e apenas com catecol para os filmes PPI, PMET e PPI-PMET (d).....57

Figura 15. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} dos filmes de PPI-PMET em meio de uma

solução aquosa de 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ (solução livre do monômero) nos seguintes intervalos de potencial: (A) -0,40 V até 0,92 V, (B) -0,40 V até 1,15 V, (C) sobreposição de (A) e (B) 59

Figura 16. Espectros de FTIR dos filmes PPI-PMET (a) antes da superoxidação e após, aplicando os intervalos de potenciais: (b) -0,40 V a 0,92 V e (c) -0,40 V a 1,15 V..... 60

Figura 17. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} em solução tampão fosfato pH 7 com catecol 0,1mol L^{-1} e sem catecol (Branco) dos biossensores que foram preparados sem a superoxidação (a) e com a superoxidação (b) dos filmes 63

Figura 18. Curvas J vs [PFO] obtidas em meio de catecol 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes: a) PPI-PMET/PFO_{sint} e b) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} 65

Figura 19. Curvas J vs Tempo de imobilização da PFO em meio de catecol 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes a)PPI-PMET/PFO_{temp} e b) PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp} 67

Figura 20. Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,05 mol L^{-1}) em tampão fosfato pH 7 (0,1 mol L^{-1}) 68

Figura 21. Curvas cinéticas de absorbância vs tempo obtidas a diferentes concentrações de catecol a uma quantidade fixa de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7 68

Figura 22. Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs inverso da concentração de catecol para determinação da velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten 69

Figura 23. Curvas J vs pH em uma solução contendo 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de catecol em diferentes concentrações de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes: (a)PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/PFO_{temp}, (c)PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} (d) PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp} 71

Figura 24. Estudo do potencial operacional sobre as respostas amperométricas para os filmes (a) PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/PFO_{temp}, (c) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e (d) PPI_{sup}PMET/PFO_{temp} em uma solução contendo 3,0 x 10^{-1} mol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} 72

Figura 25. AFM dos filmes de PPI-PMET não superoxidados e superoxidados com PFO imobilizada por maneiras diferentes 74

Figura 26. Cronoamperogramas dos filmes (a) PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/$PFO_{(6horas)}$, (c) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e (d) PPI_{sup}-PMET/$PFO_{(10min)}$ em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em diferentes concentrações de catecol 76

Figura 27. Curvas de calibração dos biossensores amperométricos (a) PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/$PFO_{(6horas)}$, (c) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e (d) PPI_{sup}-PMET/$PFO_{(10min)}$ em função da concentração de catecol 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomes dos filmes de PPI-PMET com suas características e a maneira que a PFO foi imobilizada 46

Tabela 2: Valores dos parâmetros: rugosidade média quadrática, diferença área superficial e morfologia dos grãos dos filmes dos homopolímeros (PPI e PMET) do PPI-PMET 55

Tabela 3: Valores de rugosidades dos filmes de PPI-PMET superoxidados e não superoxidados com enzima imobilizada em diferentes maneiras 73

Tabela 4: Características analíticas dos filmes PPI/PMET 78

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

PFO: Polifenol oxidase

Pt: Platina

PPI: Polipirrol

PMET: Polimetiltiofeno

ECS: Eletrodo de calomelano saturado

rpm: Rotação por minuto

E: Enzima

S: Substrato

ES: Enzima-substrato

P: Produto

V_{max}: Velocidade Máxima

K_m: Constante de Michaelis-Menten

ΔAbs: Variação da absorbância

Δt: Variação de tempo

V: Volume

UA: Unidade da atividade

UV: Ultravioleta

CA: Cronoamperometria

VC: Voltametria Cíclica

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

AFM: Microscopia de Força Atómica

Ag: Prata

AgCl: Cloreto de prata

$NaClO_4$: Perclorato de sódio

RMS: Rugosidade Média Quadrática

Ra: Rugosidade Média Aritmética

J: Corrente

λ: Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 25
1.1 MOTIVAÇÃO 25
1.2 INTRODUÇÃO 27
1.3 OBJETIVOS 37
CAPITULO 2 39
2.1 MATERIAIS 39
2.2 MÉTODOS 41
2.2.1 Cinética enzimática 41
2.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase 44
2.2.2 Imobilização enzimática 44
2.2.3 Técnicas eletroquímicas 46
2.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 47
2.2.5 Microscopia de força atômica (AFM) 48
CAPITULO 3 49
3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
3.1.1 Eletrossíntese dos filmes PPI-PMET 49
3.2 Caracterizações do PPI-PMET 52
3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR 52
3.2.2. Voltametria Cíclica 53
3.2.3 Microscopia de força atômica (AFM) 54
3.3 Resposta de referência dos filmes de homopolímeros e PPI-PMET em solução contendo catecol e sem a presença de catecol 57
3.4 Estudo da superoxidação do PPI e PMET nos filmes PPI-PMET 58
3.5 Respostas dos biossensores com e sem catecol 61
3.6 Otimização dos parâmetros de preparo dos biossensores 64
3.6.1 Resposta dos biossensores em função da concentração da enzima. 64
3.6.2 Resposta dos biossensores em função do tempo de imobilização da enzima. 65
3.6.3 Estudo da cinética enzimática 67
3.6.4 Efeito do pH 69
3.6.5 Efeito do potencial operacional 71
3.6.6 Imobilização enzimática 73

3.6.7 Resposta dos biossensores em função da concentração de catecol..... 75
3.6.8 Curvas analíticas 77
CAPÍTULO 4 81
4.1 CONCLUSÕES.....81
REFERÊNCIAS 83

CAPÍTULO 1

Este capítulo trata dos aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de biossensores dentro de um contexto histórico. Os objetivos e a motivação deste trabalho são também apresentados.

Esta dissertação foi dividida da seguinte forma: no CAPITULO 1 é apresentado o desenvolvimento histórico dos biossensores, a motivação e os objetos que nos levaram realização deste trabalho. No CAPITULO 2, destacam-se os materiais e métodos utilizados na preparação dos sistemas polímeros/enzima, além da parte instrumental. Os resultados e discussão são apresentados no CAPITULO 3. O CAPITULO 4 apresenta as conclusões desta dissertação.

1.1 MOTIVAÇÃO

Os compostos fenólicos são considerados uma fonte altamente poluente, pois causam problemas de poluição ambiental, em particular em solos e águas. As contaminações ocorrem pelo fato de os fenóis estarem presentes em muitos efluentes da indústria química, gerados a partir das atividades de produção de plásticos, corantes, tintas, drogas, antioxidantes, pesticidas, detergentes e, principalmente, papel e celulose (RUEDA et al., 2001). Os compostos fenólicos no meio ambiente se originaram também de fontes naturais, sendo gerados pela queima de florestas e de outros tecidos vegetais (PASSO, 2006). Os efeitos toxicológicos mais agudos do fenol atuam predominantemente sobre o sistema nervoso central, sendo que pode ocorrer morte após cerca de uma hora e meia de exposição. O envenenamento agudo por esse composto pode causar distúrbios gastrointestinais severos, falha no sistema circulatório, anemia hemolítica, edema pulmonar e convulsões (MANAHAN, 1994; SANTOS DE ARAUJO et al., 2006).

Devido ao seu potencial dano à saúde humana e a sua relativamente alta persistência no meio ambiente, os fenóis e os seus derivados estão presentes na lista de substâncias perigosas e altamente poluentes da Comissão Europeia (VINCENT; ANGELETTI; BJORSETH, 1991) e da Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (SVITEL, MIERTUS, 1998). No Brasil, a legislação federal estabelece um limite máximo diferenciado de fenóis totais em cada tipo de corpo d'água natural, limite este estabelecido pela resolução CONAMA 357/05. Além disso, em relação ao descarte de efluentes em corpos hídricos, essa resolução impõe uma concentração máxima de 0,5 mg L^{-1} de fenóis (BRASIL, 2005). Além da rigorosa imposição legal, o monitoramento ambiental constante e *in situ* dos fenóis no ambiente têm sido um problema prático importante.

As detecções de compostos fenólicos, até o presente momento, são geralmente realizadas por meio de técnicas de espectroscopia e cromatográficas que, porém, não permitem um monitoramento contínuo *in situ*, têm relativamente alto custo, são dispendiosas e necessitam de operadores treinados (ROSATO, 2000; ROSATO et al., 2001). Por isso, é interessante que se invista cada vez mais no desenvolvimento de tecnologias capazes de realizar essa monitoração como, por exemplo, em biossensores, dispositivos que combinam a especificidade de um elemento biológico ativo para um analito de interesse e a sensibilidade de um transdutor que converte o sinal proporcional à concentração do analito (MULCHANDANI; BASSI, 1995).

Trabalhos na literatura sobre biossensores para compostos fenólicos, em sua maioria, baseiam-se na utilização de uma enzima, a tirosinase, ou polifenoloxidase (PFO), adquirida comercialmente (FIORENTINO et al., 2010) e/ou como extrato bruto enzimático de tecidos vegetais. Biossensores à base de PFO têm sido preparados a partir do uso de glutaraldeído (TOPÇU; SEZGINTÜRK; DINÇKAYA, 2004), quitosana (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006), poliamida, Pt, carbono vítreo e pasta de carbono (SHAN et al., 2008). Porém, há relativamente poucos pesquisadores que se voltaram aos sistemas enzima/matriz polimérica. O interesse em polímeros como matrizes de enzimas se justifica pela perspectiva de se preparar sistemas com diferentes áreas, tamanhos, flexíveis, a um baixo custo, com materiais relativamente estáveis e em diferentes áreas de aplicação, tais como medicina, meio ambiente, alimentos e bebidas. Os polímeros que estão sendo mais utilizados em sensores enzimáticos são os denominados condutores, tais como a polianilina, politiofeno, polipirrol e os seus derivados (JANATA et al., 1998; COSNIER, 1999).

Portanto, tendo em vista o cenário da pesquisa envolvendo o sistema polipirrol (PPI)/polifenoloxidase (PFO), muito ainda deve ser feito para que se atinja o domínio das

técnicas de preparação dos filmes poliméricos e de imobilização da enzima para tornar viável a sua aplicação como biossensores estáveis ao longo tempo e para várias análises. Recentemente, o uso de copolímeros tem apontado como uma alternativa para melhorar tais características. Em relação ao material de estudo do presente trabalho, buscou-se obter biossensores com melhores desempenhos a partir do uso do copolímero de polimetiltiofeno (PMET) e polipirrol (PPI) como matriz hospedeira da PFO, na forma de extrato bruto do abacate para a análise de compostos fenólicos, como, por exemplo, o catecol.

1.2 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dos sensores e posteriormente biossensores se remota ao século XIX com os inícios da potenciometria, onde o primeiro trabalho foi reportado por Nerst no ano 1888 (NERNST; LOEB, 1888), quem conseguiu descrever o potencial redox de um sistema cujo eletrodo de trabalho era um metal imerso numa solução contendo íons do mesmo metal. Paralelamente a necessidade de quantificar o grau de acidez nas soluções fez que diferentes pesquisas fossem orientadas para esta área.

Assim o primeiro sensor par medir o pH foi proposto por Nernst em 1897 (NERNST; GLEICHGEWICHT, 1897), e modificado posteriormente nos trabalhos feitos por Cremer em 1906 (CREMER, 1906) e Haber & Klemensiewicz em 1909 (HABER; KLEMENSIEWICZ, 1909). Só no ano de 1935, este sensor foi comercializado pela empresa Beckman e Radiometer (FERNANDES; KUBOTA, 2001). Clark e Lions no ano de 1962 reportaram o primeiro biossensor conhecido como “eletrodo enzimático” onde a enzima glicose foi imobilizada num eletrodo para testar o O2. Neste dispositivo a glicose catalisa uma reação de oxidação, onde o consumo do oxigênio é proporcional à concentração do substrato (VIEIRA, 2007). Stefanec e Simon entre 1966 – 1967 (STEFANAC; SIMON, 1966 – 1967) reportaram o uso de polipeptídios como materiais eletroativos para a construção de biossensores.

Os biossensores estão inseridos dentro de uma área multidisciplinar para a qual não existe uma única classificação. Assim, a disseminação rápida de resultados a cerca desses materiais justificam as várias definições para o termo biossensor encontradas na literatura. De

forma geral, os biossensores são quaisquer dispositivos de detecção que incorpora tanto um organismo vivo, ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, DNA, etc), quanto um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento, de uma substância específica no ambiente (PATACAS, 2007). Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa pelo uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) em contato direto com o elemento de transdução (THÉVENOT et al., 2001). Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse e a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal quantificável; por exemplo, elétrico, sendo este sinal proporcional à concentração do analito, sendo este mecanismo representado na Figura 1. (SALGADO, 2001).

O sistema de transdução deve ser adequado ao sensor de acordo com a natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse (LUONG e MALE et al., 2008).

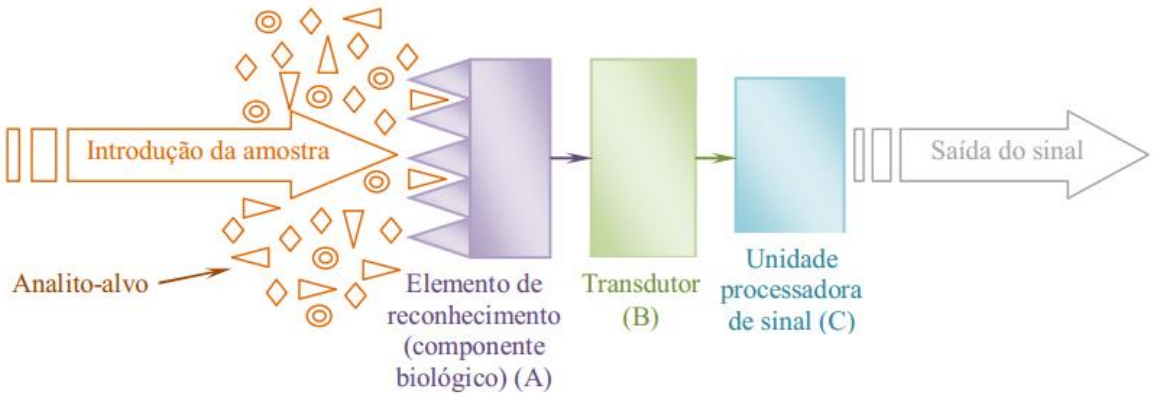


Figura 1. Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C)
Fonte: Adaptado por Calil (2011)

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 utilidade em aplicações práticas (TÜRKARSLAN, HAYAHAN et al., 2009).

Destaca-se a utilização dos seguintes transdutores: eletroquímicos, óticos, térmicos e de massa. Os transdutores eletroquímicos se destacam na construção de biossensores,

principalmente devido à sua simplicidade, ao seu amplo intervalo de linearidade e sua rápida resposta (BARSAN e BRETT, 2009; CONROY, HEARTY et al., 2009).

No caso do transdutor se basear em medidas eletroquímicas, os biossensores são classificados em: potenciométricos, amperométricos e condutimétricos, de acordo com os métodos de medidas. Os transdutores amperométricos e potenciométricos têm sido mais empregados na construção de biossensores por apresentarem maior sensibilidade (WANG, 1999). Nos potenciométricos, são medidas as variações de potencial elétrico do eletrodo na presença de um analito. Nos amperométricos, utilizados no presente trabalho, são medidas as variações de corrente elétrica produzidas por reações de oxidação e redução em uma superfície que é sensível à variação da concentração de um analito, isto é, a corrente gerada no eletrodo é uma resposta proporcional à variação de um analito que sofre reações catalisadas pela enzima. Nos condutimétricos, são medidas as variações de condutividade elétrica de uma superfície e que estão relacionadas à presença de um analito (THÉVENOT et al., 1999).

O uso do material biológico adequado na construção de biossensores para um determinado analito de interesse, resulta em sensores altamente seletivos e sensíveis e pode apresentar diversas vantagens em relação aos eletrodos convencionais, tais como: aumento da sensibilidade, seletividade e estabilidade, diminuição do limite de detecção do procedimento, baixo custo e facilidade na construção, resposta rápida, potencial para miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis (OLIVEIRA, 2007). Por isso, as enzimas, na forma purificada e como extratos brutos de plantas e de vegetais, de tecidos animais e de anticorpos, foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (ALFAYA; KUBOTA, 2008; DU; ZHOU, 2008).

As enzimas são catalisadoras especiais de origem biológica, que existem em todos os organismos vivos, aceleram várias reações metabólicas importantes para a vida sob condições fisiológicas de pH e de temperatura e têm uma massa molecular que varia de cerca de doze mil até acima de um milhão (LEHNINGER, 1989). Apresentam também um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente à ligação forte da molécula de substrato pelo seu sitio ativo da enzima, envolvendo fatores do meio ambiente reacional, tais como tamanho da molécula do substrato, polaridade, estereoquímica, grupos funcionais e energia de ligação relativa. Devido às essas características, as enzimas vêm sendo empregadas em biossensores aplicados nas áreas de química analítica, medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e ciências ambientais (ROSATTO et al., 2001).

Para os biossensores utilizados na análise de compostos fenólicos, a tirosinase, também conhecida como polifenoloxidase (PFO), é utilizada como bio-receptor e pertence à classe das oxidoredutases. Em presença de oxigênio molecular catalisa a oxidação de monofenóis e difenóis as correspondentes quinonas e pode ser encontrados em bactérias, fungos, plantas, frutos e em alguns insetos e crustáceos (LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003). A atividade enzimática obtida de vegetais varia em relação à espécie, período do ano, estado de amadurecimento e local de plantio. Está presente em altas concentrações em cogumelos, batata, pêssego, banana, manga, abacate, folhas de chá e café.

Descoberta em 1895 por Bourquelot e Bertrand, a PFO é distribuída com abundância na natureza, em muitas frutas e vegetais, sendo a responsável pelo efeito de escurecimento das mesmas (LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003; KIRALP; TOPPARE; YAGGI, 2004). No entanto, as investigações fundamentais sobre a estrutura química, cinética e mecanismo destas enzimas foram detalhadamente estudadas por diversos pesquisadores a partir de 1920 (BRUNETTI e FARIA-OLIVEIRA, 1981). A tirosinase, é uma enzima monooxigenase, contendo em sua forma oxigenada dois átomos de Cu (II), como sítios ativos, cada um coordenado a três moléculas de histidinas, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial mais fraca (DURAN, ROSA, D' ANNIBALE, GIANFREDA, 2002), como ilustra a Figura 2.

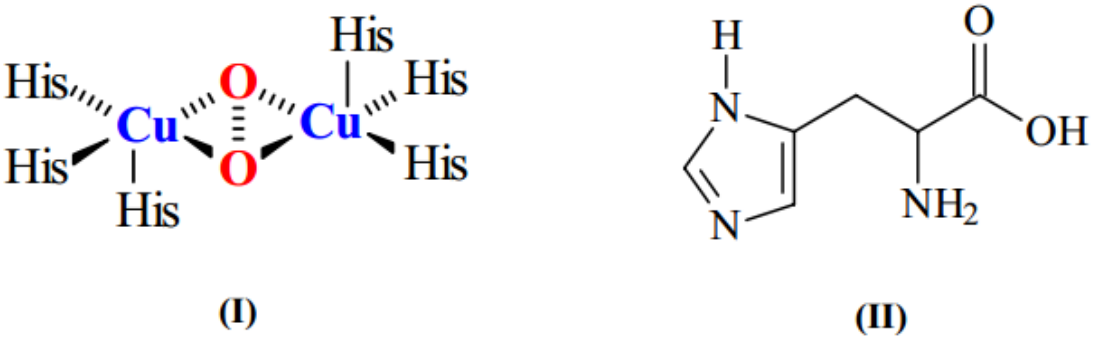


Figura 2. Estrutura (I) centro ativo da tirosinase e (II) molécula da histidina
Fonte: Decker e Tuczec (2000)

A PFO exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenolase) para *o*-difenóis, que são convertidos a *o*-quinonas (FENOLL et al., 2001). A Figura 3 mostra um mecanismo simplificado dessa enzima em presença de catecol e oxigênio molecular. O ciclo catalítico se inicia na forma *met*, onde o substrato liga-se após a desprotonação de um de seus grupos hidroxilas de forma monodentada ao átomo de Cu(II). Este processo é seguido pela oxidação do substrato com formação da primeira quinona e a

conseqüente forma reduzida da enzima. A incorporação de oxigênio molecular gera o estado *oxy* da enzima a qual reage com a segunda molécula de substrato que se coordena após a desprotonação de uma de suas hidroxilas. A oxidação do difenol a quinona regenera o estado *met* da enzima encerrando o ciclo catalítico (GERDEMANN; EICKEN; KREBS, 2002).

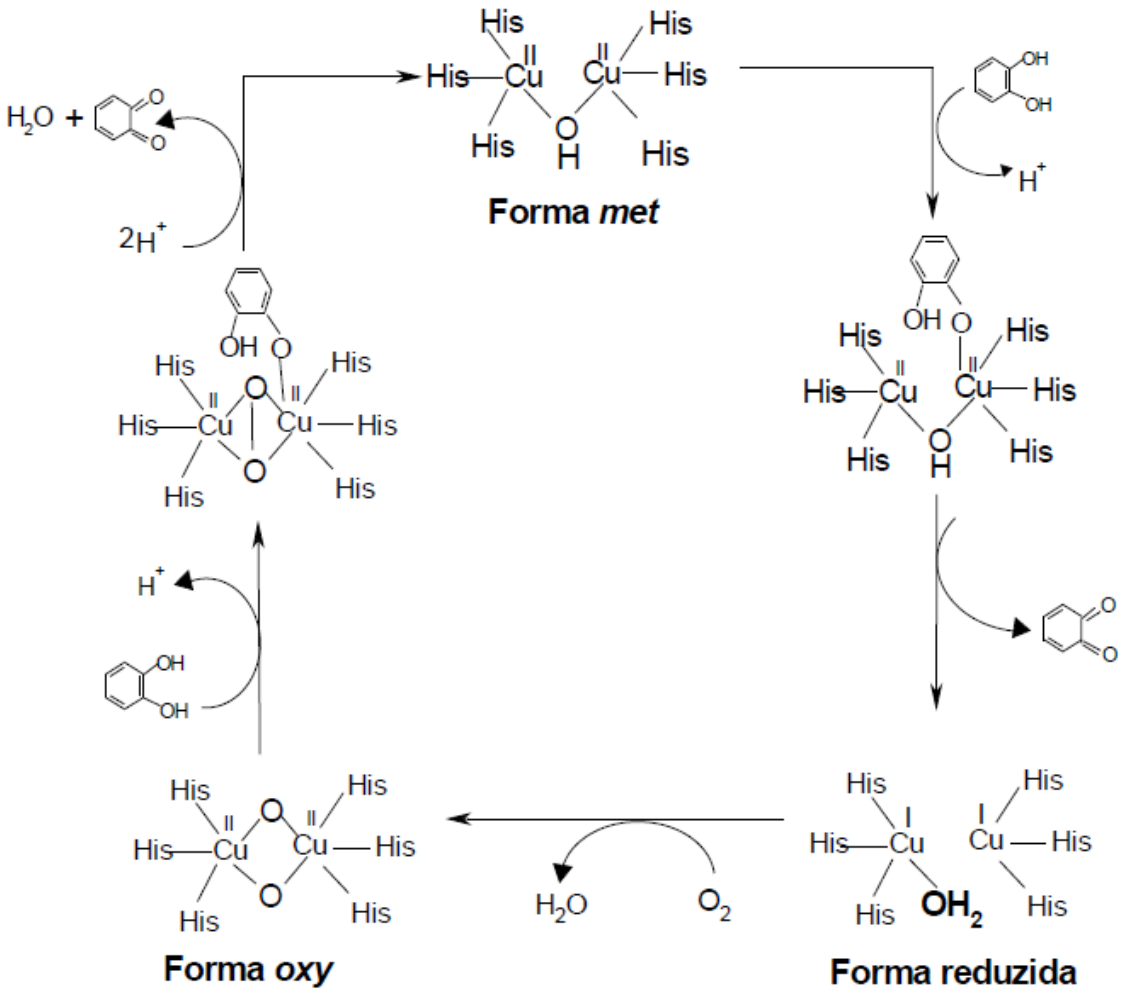


Figura 3. Reações catalisadas pela tirosinase
Fonte: Gerdemann; Eicken; Krebs (2002)

São indiscutíveis as vantagens da utilização de enzimas em diversas reações catalíticas. No entanto, existe uma diversidade de problemas quando essas enzimas são empregadas na prática para interesse industrial e na pesquisa científica. Estas dificuldades têm sido amenizadas com o desenvolvimento de novas técnicas de imobilização. No processo de imobilização de enzimas, o material biológico é fixado (aprisionado) em um suporte resultando na insolubilização da enzima em meio aquoso (FATIBELO-FILHO; CAPELATO, 1992; BLUM; COULET, 1991). Após a imobilização, as enzimas apresentam diversas vantagens em relação às enzimas livres, como mostra o esquema da Figura 4.

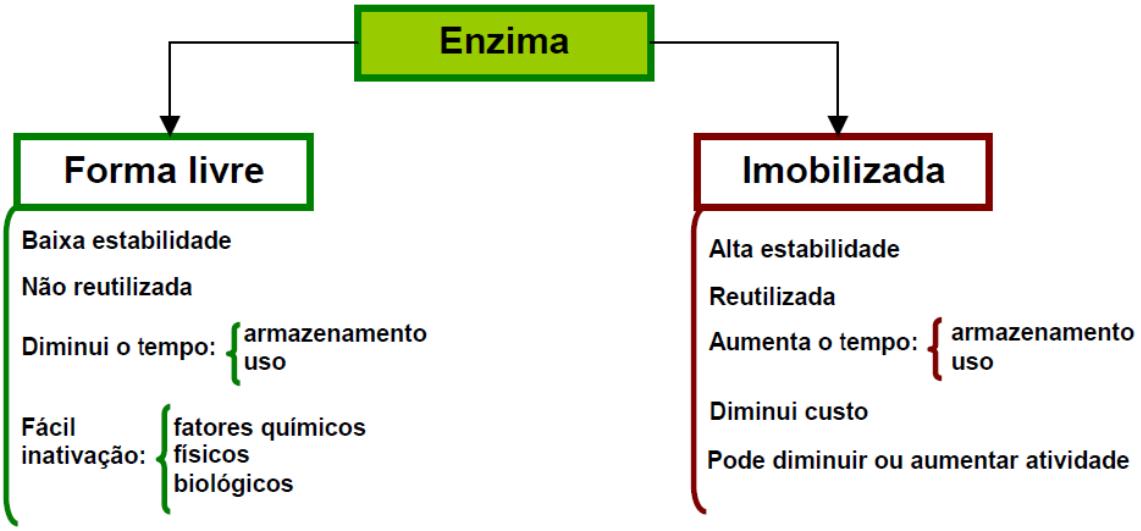


Figura 4. Vantagens da enzima imobilizada em relação à enzima livre
Fonte: FATIBELO-FILHO; CAPELATO, (1992); BLUM; COULET, (1991)

A imobilização de uma enzima é uma etapa crítica na construção de qualquer biossensor, pois ela deve estar ligada de maneira adequada ao transdutor e facilitar a transferência de elétrons. Com isto, é possível se ter um biossensor viável, com boa sensibilidade e estabilidade operacional (RODRIGUES, 2009). Diversos procedimentos têm sido empregados na construção de biossensores enzimáticos visando imobilizar eficientemente uma enzima em uma matriz e obter um biocatalisador com atividade e estabilidade não afetadas durante as medidas analíticas. Assim, os procedimentos de imobilização de material biológico podem ocorrer por adsorção, encapsulação, ligação covalente e ligação covalente cruzada (*crosslinking*) (LIN *et al*., 2006), apresentados na Figura 5.

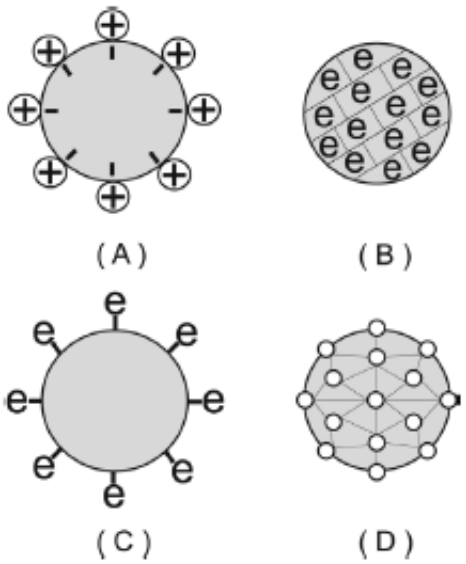


Figura 5. Esquema ilustrativo dos quatro tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: (a) adsorção; (b) encapsulação; (c) ligação covalente, e (d) ligação covalente cruzada
Fonte: Marques e Yamanaka (2008)

A adsorção física de uma enzima é o modo mais simples e rápido de imobilização e que se baseia em interações físicas entre a enzima e a superfície. Nesta situação, uma atividade muito próxima da natural é obtida, sendo que as principais vantagens da adsorção são o baixo custo e a facilidade de imobilização. Devido às forças de ligação (ponte de hidrogênio e Van der Waals) envolvidas e resultantes das variações de temperatura, pH e força iônica, o controle destes parâmetros é o principal problema, visto que as forças de atração podem ser facilmente diminuídas (KARUBE, 1992; ANDEESCU et al., 2002; UMAÑA; WALLER, 1986), acarretando na lixiviação da enzima para o meio eletrolítico, como verificado em eletrodos PPI/glicose oxidase (RETAMA et al., 2005).

A técnica de imobilização de enzima mais utilizada no preparo de biossensores é por ligação covalente, na qual a retenção da enzima na superfície da matriz ocorre por meio de ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície da matriz. A desvantagem nesta metodologia está na perda de parte da atividade enzimática por conta de alterações nas conformações dos sítios ativos da enzima (YANG et al., 2004; BÖYÜKBAYRAM et al., 2006).

A imobilização de uma enzima por confinamento, ou encapsulamento, ocorre pela incorporação, por aprisionamento, do material biológico presente na vizinhança de um eletrodo, durante o processo de preparo de um polímero sem que reações químicas afetem a atividade da enzima. O método possibilita controlar a espessura da camada polimérica por

meio de medidas da carga elétrica total durante a polimerização eletroquímica. A maior vantagem que esse método proporciona sobre os outros é a possibilidade de se gerar um polímero cobrindo a superfície de um eletrodo de geometria complexa, ou seja, um eletrodo com formato de difícil depósito do polímero (SYHG-YING et al., 2000).

Na imobilização por ligação cruzada, utiliza-se um reagente bifuncional, tal como o glutaraldeido, ou multifuncional, hexametileno di-isocianato, para a imobilização da enzima em vários tipos de matrizes (GIL; KUBOTA; YAMAMOTO, 1999). Ao usar essa técnica, é necessário que se preocupe com a acessibilidade do componente bioativo, tendo como vantagem à baixa atividade da enzima, que é mínima e o custo é moderado (VIEIRA, 2007).

Os estudos sobre os processos de imobilização de enzimas em diferentes tipos de matrizes avançaram muito nos últimos trinta anos. Uma das razões para a grande expansão da tecnologia da imobilização está ligada ao material de suporte, que pode, de fato, atuar sobre a estabilidade e eficiência da enzima imobilizada. No caso dos biossensores, a escolha de um método de imobilização depende do tipo de transdutor, natureza do analito e condições de operação do biossensor (SCOUTEN; LUANG; BROWN, 1995). Os biossensores tendo polímeros condutores como matrizes enzimáticas são bastante atrativos, pois muitas enzimas podem ser incorporadas ao polímero durante a deposição eletroquímica do polímero sobre um eletrodo apropriado (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Além disso, eles podem ser usados como materiais eletroativos em biossensores eletroquímicos devido a uma flexibilidade em suas estruturas químicas e características eletroativas (redox) (DESHPANDE; AMALNERKAR, 1993).

Os polímeros mais estudados como matrizes hospedeiras de enzimas é polipirrol, polianilina, politiofeno e os seus derivados. O polipirrol (PPI) é um dos mais aplicados como transdutor amperométrico, pois possui uma boa estabilidade química, versatilidade de aplicações e compatibilidade com uma ampla gama de espécies biológicas. A vantagem do PPI em relação a outros polímeros está também na ampla possibilidade de uso de solventes em sua síntese, sob condições mais brandas, ou seja, em mais baixos potenciais de oxidação, o que afeta diretamente as suas propriedades, tais como adesão, condutividade, morfologia, resistência mecânica e reatividade química (FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992).

Além do PPI, estudou-se, no presente trabalho, um politiofeno substituído, polimetiltiofeno, PMET. O politiofeno e seus derivados são química e eletroquimicamente estáveis no ar e na água, tanto em seus estados dopados quanto não-dopados (TOURILLON, 1986). Diferentemente do PPI e da polianilina, o politiofeno é geralmente sintetizado por oxidação eletroquímica do monômero em meio não-aquoso a mais altos potenciais em meio

de carbonato de propileno ou acetonitrila como solventes (BAZZAOUI; AEIYACH; LACAZE, 1994).

Outra característica dos politiofenos, e que merece atenção, é a sua elevada condutividade elétrica, podendo alcançar valores da ordem de 500 S cm^{-1}, no caso de serem preparados em condições de síntese otimizadas (SATO; SUSUMO; KAERIYAMA, 1986; RONCALI et al., 1986). Estudos sobre o politiofeno demonstraram que o aumento de sua condutividade está diretamente relacionado ao aumento do comprimento da conjugação principal do polímero, ou seja, polímeros com maiores tamanhos de cadeia conjugadas tendem a ser mais condutores (RONCALI et al., 1986; RONCALI et al., 1987). A Figura 6 ilustra as estruturas dos polímeros condutores mencionados anteriormente.

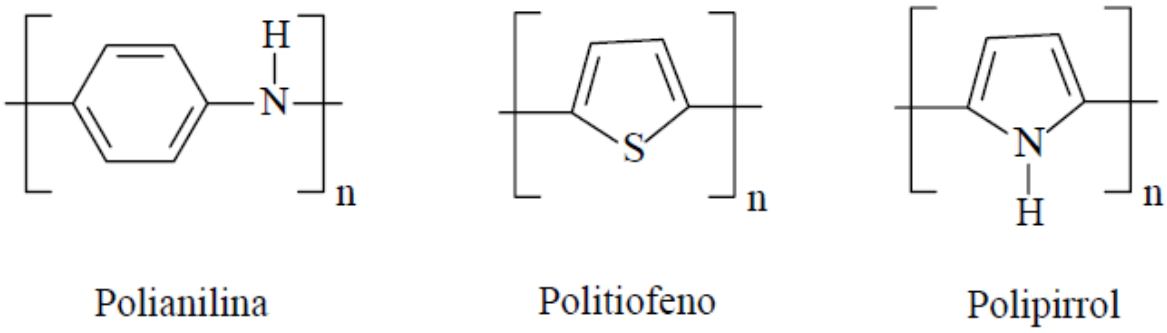


Figura 6. Estrutura das unidades monoméricas dos polímeros orgânicos condutores mais estudados
Fonte: Ferreira (2007)

A boa processabilidade, a flexibilidade estrutural e o relativamente baixo custo são algumas das vantagens que conferem a ampla aplicabilidade dos polímeros condutores (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002); além disso, eles podem ser sintetizados química ou eletroquimicamente. No presente trabalho, o PPI e PMET foram sintetizados por via eletroquímica. A escolha dessa técnica se deu pela possibilidade de se preparar sistemas com diferentes áreas, tamanho e de baixo custo (JANATA et al., 1998) proporcionando maior controle dos parâmetros de síntese dos polímeros utilizados.

Muitos dos polímeros mencionados exibem não só condutividade elétrica, como também interessantes propriedades ópticas e químicas. A diversidade de propriedades exibidas pelos polímeros condutores amplia as aplicações tecnológicas. No entanto, devido à baixa processabilidade em solução destes polímeros, limita-se o uso em determinadas aplicações, nas quais se necessita de materiais na forma de filmes uniformes, homogêneos. Ao longo da última década, a copolimerização eletroquímica aponta como uma possibilidade para se

melhorar as propriedades físicas e mecânicas dos polímeros. Essa forma de polimerização origina materiais com propriedades intermediárias entre dois ou mais homopolímeros e que são predominantes solúveis a partir do uso de compostos aromáticos. Além disto, condições mais brandas de eletrossíntese podem ser usadas (KUWAHARA et al., 2005).

São exemplos de biossensores fabricados eletroquimicamente à base de copolímeros o polipirrol/polisilox preparados com a PFO e o poli-3-metiltiofeno/politiofeno-3-ácido acética, tendo a glicose oxidase imobilizada por meio de ligações covalentes com glutaraldeído. O primeiro trabalho ressalta a importância da escolha do eletrólito suporte, que influencia tanto a atividade da enzima quanto a morfologia do filme. Os autores do segundo trabalho sugeriram que a condutividade da matriz polimérica influencia a eficiência do biossensor de glicose (ARSLAN et al., 2005; SHIMOMURA et al., 1998; KUWAHARA et al., 2005).

Nos últimos anos, vários materiais biológicos, tais como células bacterianas, tecidos animais e de plantas, têm sido testados como componentes biocatalíticos de biossensores, isso porque sempre é uma opção atraente substituir uma enzima purificada, de alto custo, por materiais orgânicos naturalmente ricos em enzimas (extrato bruto) (FATIBELLO-FILHO; CRUZ, 2002). Embora o uso de extratos brutos em biossensores possa apresentar certa desvantagem na seletividade do método analítico, ainda tem se mostrado extremamente econômico, simples e, geralmente, com um tempo de vida longo (VIEIRA; FATIBELLO-FILHO, 1998).

Sabendo da potencialidade de melhora no desempenho de biossensores amperométricos a partir do uso de copolímeros, e que não há trabalhos disponíveis na literatura sobre a utilização de copolímeros polimetiltiofeno/polipirrol como matrizes hospedeiras de PFO para a detecção de compostos fenólicos, estas foram as principais motivações do presente trabalho.

1.3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho de Mestrado foram:

- Preparar filmes de copolímeros (polirrirol/polimetiltiofeno) em meio de acetonitrila e caracterizar estes filmes para utilização como matriz para a imobilização da PFO e construção de biossensores amperométricos para a detecção de catecol.
- Analisar o comportamento dos filmes dos copolímeros (polipirrol/polimetiltiofeno) superoxidados em diferentes intervalos de potenciais a fim de melhorar as condições de imobilização da enzima na matriz polimérica.
- Preparar biossensores amprerométricos à base de extrato bruto de abacate (*Persea americana*) como fonte enzimática e de filmes dos copolímeros (polipirrol/polimetiltiofeno) por adsorção física a partir de diferentes maneiras de imobilização para cada um dos filmes.
- Otimizar as respostas dos biossensores a partir das variações dos seguintes parâmetros: concentração e tempo de imobilização da enzima, pH, potencial operacional e concentração de catecol durante a obtenção das respostas do biossensores.
- Avaliar as respostas dos biossensores na detecção de catecol.

CAPITULO 2

Neste capítulo, são apresentados os procedimentos experimentais utilizados para o preparo dos filmes PPI-PMET, destacando-se suas caracterizações, diferentes maneiras de imobilização da enzima polifenol oxidase (PFO) nos filmes de PPI-PMET e otimização dos parâmetros do biossensores, discriminando os equipamentos utilizados em todas as etapas do trabalho.

2.1 MATERIAIS

Para o preparo do eletrólito suporte, perclorato de sódio ($NaClO_4$), foram utilizados dois solventes, acetonitrila, seca com peneira molecular, utilizada na etapa das síntese dos filmes, e água, obtida pelo sistema de purificação do tipo Milli-Q, que apresenta uma resistividade de 18 MΩ e pH 5,7, utilizada na etapa das respostas eletromímicas e no processo de superoxidação dos filmes.

O 3-metiltiofeno e o pirrol foram utilizados como monômeros para o preparo dos filmes PPI-PMET, sendo adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich. O pirrol foi purificado por destilação em pressão reduzida, para eliminar impurezas, e armazenado ao abrigo de luz e do calor a uma temperatura de 22 °C, para impedir processos de oxidação. O analito utilizado foi o catecol, obtido pela Sigma-Aldrich, contendo massa molecular de 110,11g mol^{-1}, densidade 1.344 g cm^{-3}, ponto de fusão 105 °C e ponto de ebulição 245,5 °C.

A PFO como extrato bruto de abacate (*Persea americana*) foi obtida de acordo com o procedimento descrito por Lupetti, Ramos e Fatibello-Filho (2003), que sugeriu um método simples e rápido de obtenção. Neste método, 25 g de polpa de abacate foi homogeneizada com 100 mL de tampão fosfato (pH 7,0) e 2,5 g de agente protetor PolyclarSuper R, em um liquidificador durante três min. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugado a 15000 rpm durante 30 min a 4°C (LUPETTI; RAMOS; FATIBELLO-FILHO, 2003).

Os filmes de PPI-PMET foram preparados por eletrodeposição utilizando um

potenciostado-galvanostato EGG&PAR modelo 283. A célula eletroquímica usada era convencional de compartimento único com três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência, calomelano saturado, ECS, e contra-eletrodo, uma placa de Pt, tendo uma tampa de teflon que serviu para afixar os eletrodos. A Figura 7 ilustra a célula de vidro de compartimento único com capacidade de 10 mL e utilizada para a realização dos experimentos eletroquímicos.

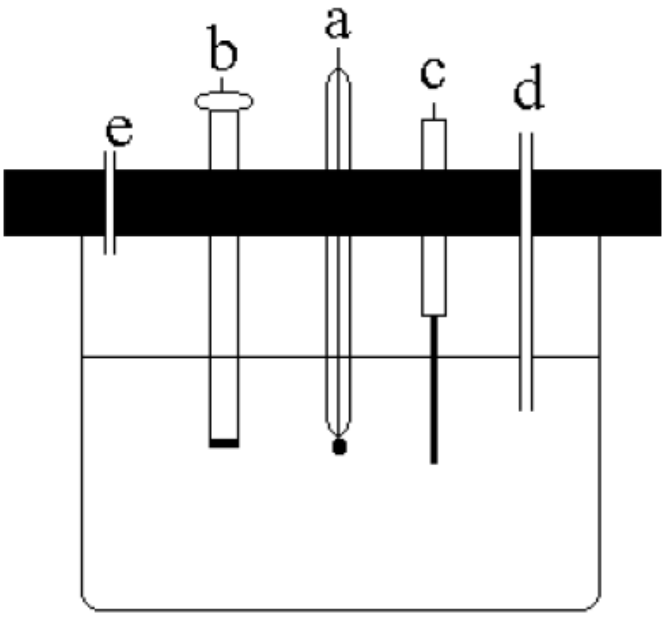


Figura 7. Ilustração de uma célula eletroquímica mostrando os eletrodos de trabalho (a), de referência (b), calomelano (c) além da entrada (d) e saída (e) de N2
Fonte: Ferreira (2007)

Os polimentos das superfícies dos eletrodos de trabalho e do contra-eletrodo foram realizados de forma manual, utilizando uma flanela embebida em uma suspensão de alumina de 1,0 μm, 0,3 μm e 0,05 μm. Foram utilizadas três soluções de alumina com diferentes tamanhos de partículas, a fim de se obter melhor polimento dos eletrodos. Realizada essa etapa, os eletrodos foram lavados com água Mili-Q e afixados na célula eletroquímica para eletropolimerização.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Cinética enzimática

Em 1913, uma teoria geral das reações enzimáticas e cinéticas foi desenvolvida por Michaelis-Menten (MICHAELIS; MENTEN, 1913) e que foi fundamental para o entendimento do comportamento e propriedades de enzimas, bem como dos mecanismos de ação dentro e fora das células.

Segundo a teoria Michaelis-Menten (1913), uma enzima (*E*) se combina com um substrato (*S*) formando um complexo intermediário enzima-substrato (*ES*) e que depois se quebra para formar o produto (*P*) e regenerar a enzima. O mecanismo para uma reação enzimática, envolvendo apenas um substrato, é ilustrado segundo a Equação 1.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E \qquad (1)$$

Onde K_1 é a etapa de formação do complexo, K_{-1} e K_2 são as constantes de quebra.

A equação de Michaelis-Menten expressa à relação entre a velocidade inicial de uma reação, catalisada pela enzima, e a concentração de substrato (LEHNINGER, 1989). Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática pode ser expressa como (2):

$$V_0 = \frac{V_{máx} \cdot [S]}{K_m + [S]} \qquad (2)$$

Onde $V_{máx}$ é a velocidade máxima, quando toda enzima está presente como ES (enzima-substrato) e K_m é a constante de Michaelis-Menten (3):

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \qquad (3)$$

Os valores dos parâmetros K_m e V_{max} podem ser obtidos a partir do gráfico da velocidade em função da concentração do substrato. O perfil da curva demonstra que, uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da concentração de substrato até atingir um valor limite, a partir do qual a adição de mais substrato não afeta mais a velocidade.

A equação de Michaelis-Menten pode ser alterada algebricamente e ser utilizada na forma de outras equações úteis para a análise dos resultados experimentais. Uma transformação muito empregada e simples é a inversão dos dois lados da equação de Michaelis-Menten. Essa equação é reescrita de uma forma mais apropriada para que sejam obtidos os valores de K_m e $V_{máx}$ (4). A partir da linearização, tem-se:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{máx}} \qquad (4)$$

Esta é a equação de Lineweaver-Burk, que permite com que se obtenha um gráfico linear de $1/V_0$ em função de 1/[S] com inclinação (coeficiente angular) $K_m/V_{máx}$ e intercepção no eixo-y de $1/V_{máx}$ e de $-1/K_m$ no eixo-x, como mostra a Figura 8.

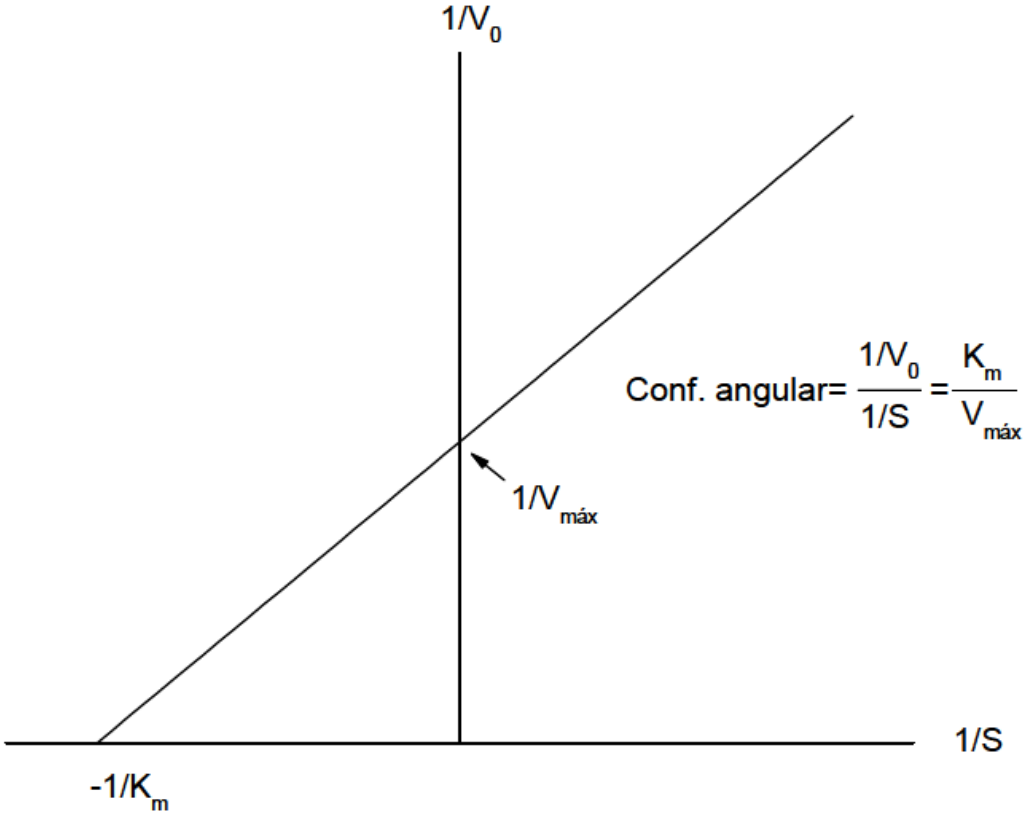


Figura 8. Gráfico duplo-recíproco Lineaweaver-Burk
Fonte: Lehninger (1989)

Desta maneira, por meio das equações de Michaelis-Menten é possível se checar a cinética da catálise de uma enzima imobilizada em um biossensor em função da resposta amperométrica.

Na cinética química, a velocidade de uma reação depende fortemente de dois fatores: temperatura e pH. O aumento da temperatura está relacionado ao aumento da velocidade da reação, ou seja, da energia térmica do sistema e da quantidade de moléculas com energia próxima à da energia de ativação. Porém, existe um fator limitante para o aumento da temperatura, pois como as enzimas são derivadas de proteínas, pode ocorrer desnaturação da proteína a partir de determinada temperatura e, assim, perde-se atividade enzimática. Outro fator importante para a cinética enzimática é o valor do pH, pois a concentração de íons H^+ presentes em solução, possibilita a melhora, retardo ou até mesmo a não ocorrência, de determinada reação enzimática (MURRAY et al.,2003; CHAMPE; HARVEY; FERRIER,, 1994).

2.2.2 Determinação da atividade enzimática da polifenol oxidase

O processo de extração da PFO, a partir do uso do fruto de abacate, foi o mesmo descrito por Lupetti, Ramos e Fatibello-Filho (2003), como já foi descrito anteriormente. O extrato bruto de abacate pode conter impurezas que dificultam a quantificação da atividade da enzima; assim, a atividade enzimática é expressa em termos de unidade de atividade (UA), definida arbitrariamente como a quantidade de enzima capaz de aumentar 0,001 unidades da absorbância por minuto. A atividade enzimática é geralmente calculada a partir do uso da equação (5), que relaciona a variação da absorbância (*Δabs*) e a variação do tempo (*Δt*), caminho óptico da cubeta (b), em determinado volume de amostra (v) (SUMMER; MYRBÃCK, 1951):

$$A = \frac{\Delta Abs \times 30 \times 1000}{\Delta t \times b \times v} \qquad (5)$$

No presente trabalho, a atividade enzimática da PFO na forma de extrato bruto de abacate foi determinada a partir do monitoramento da absorção de luz da solução contendo a enzima (PFO) a um comprimento de onda de 410 nm na região do UV-VIS. O comprimento de onda foi escolhido depois de se observar experimentalmente a formação de uma banda de absorção típica da *o*-quinona na faixa de comprimento de onda escolhido para a varredura. Uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 10 mm foi utilizada para se realizar as medidas durante os primeiros 180 s após a adição de 2,8 mL de uma solução de catecol 0,1 mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}a pH 7 em temperatura ambiente.

2.2.2 Imobilização enzimática

Com a proposta de síntese de uma nova matriz polimérica de PPI-PMET, tornou-se necessário, nesta etapa, o estudo da imobilização da PFO neste filme. O que se observou, na

maioria das vezes, é que a enzima perdia com o tempo a atividade catalítica em meio da solução aquosa e ela não podia ser recuperada de tal solução e nem ter a sua atividade regenerada. Os desenvolvimentos das técnicas de imobilização de enzimas visaram diminuir estas dificuldades.

A imobilização da enzima junto a uma matriz inerte pode ser realizada de maneira a conservar as suas propriedades catalíticas por um tempo maior do que quando a enzima está em sua forma livre, ou seja, não imobilizada, podendo, assim, ser utilizada continuamente em um maior número de análises (KLIBANOV, 1979). Dentre os métodos de imobilização mais empregados na construção de biossensores destacam-se: adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada e microencapsulação (DE LA GUARDIA, 1995).

Com objetivo da imobilização física da tirosinase nos filmes de PPI-PMET, estudamos o processo de superoxidação do PPI nos filmes de PPI-PMET pelas técnicas de voltametria cíclica e FTIR. A superoxidação foi estudada em dois intervalos de potencial: -0,4 até 0,92 V e -0,4 até 1,15 V em 50 mV em uma solução aquosa de 0,1mol L^{-1} de $NaClO_4$. Antes e após aplicar os potenciais de superoxidação, os filmes foram caracterizados por FTIR. Após o estudo de superoxidação do PPI nos filme de PPI-PMET, procedeu-se com a imobilização física da tirosinase.

Os filmes foram divididos em dois grupos, os que não foram e os que foram superoxidados. Para cada grupo, a imobilização da PFO foi realizada de uma maneira diferente. Nos filmes que não foram superoxidados, a enzima foi imobilizada de duas formas: no momento da síntese dos filmes polipirrol/polimetiltiofeno (PPI-PMET) por amperometria e depois da síntese, sendo os filmes imersos por certo tempo em uma solução contendo o extrato bruto.

Nos filmes submetidos à superoxidação, a PFO também foi imobilizada de duas formas: durante a superoxidação dos filmes de PPI-3PMET, por voltametria cíclica, e depois da superoxidação, sendo os filmes superoxidados imersos por certo tempo na solução contendo extrato bruto. Diante do número de filmes que foram estudados no presente trabalho, criou-se a Tabela 1, nomeando estes filmes para facilitar a leitura do texto da dissertação.

Tabela 1: Nomes dos filmes de PPI-PMET com suas características e a maneira que a PFO foi imobilizada

Filmes	Características	Imobilização da PFO	Nomes
PPI-PMET	PPI não superoxidado	Na síntese	PPI-PMET/PFO_{sint}
		Depois da síntese por certo tempo	PPI-PMET/PFO_{temp}
	PPI superoxidado	Na superoxidação	PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}
		Depois da superoxidação por certo tempo	PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}

2.2.3 Técnicas eletroquímicas

A maior parte dos estudos eletroquímicos envolve a variação de corrente como produto da energia elétrica produzida ou consumida para promover uma reação química (DENARO, 1974). Diante das técnicas eletroquímicas que surgiram, e das que foram aperfeiçoadas nos últimos anos, pode-se citar importância destas no preparo de novos materiais e na caracterização de filmes e de interfaces (GREEF et al., 1985). Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas de cronoamperometria e voltametria cíclica.

A cronoamperometria (CA) é uma técnica de análise quantitativa, pois possibilita a determinação da concentração de um analito, tendo como base a medida da intensidade de corrente de eletrólise, mantendo-se o potencial constante durante o tempo da medida. Essa técnica tem como base o registro da corrente gerada pela oxidação ou redução de espécies em solução devido a um potencial externo aplicado, sendo ele de oxidação ou de redução em função do tempo (FERREIRA, 2007). Neste trabalho, a técnica de cronoamperometria foi utilizada na síntese dos filmes e nas etapas de otimização das respostas dos biossensores, tais como na obtenção dos valores de pH, potencial operacional, concentração da enzima, tempo de imobilização da enzima e detecção do catecol.

Os filmes do PPI, PMET e PPI-PMET foram sintetizados por via eletroquímica sobre Pt em eletrólito de suporte. Para tal, utilizou-se uma célula eletroquímica convencional contendo os eletrodos de trabalho (Pt), referência (Ag/AgCl) e contra-eletrodo (Pt). Foram realizadas várias sínteses em diferentes potencias utilizando a técnica de cronoamperometria por 10s em solução de acetonitrila contendo 0,01M de pirrol e 0,1M 3-metiltiofeno em 10 mL

de perclorato de sódio 0,1M e os potenciais trabalhados na síntese foram: 1,3V; 1,5 V; 1,7V; 1,8V; 1,9V; 2,0V e 2,15V *vs*. Ag/AgCl.

A voltametria cíclica (VC) se baseia na aplicação, a um eletrodo de trabalho, de um potencial elétrico variável com o tempo em relação ao potencial de um eletrodo de referência. O potencial inicial aplicado aumenta linearmente até atingir um valor máximo, chamado potencial de inversão e, em seguida, decresce até alcançar um valor final de potencial (FERREIRA, 2007). O potencial é variado continuamente com o tempo e leva à ocorrência de reações de oxidação e redução de espécies eletroativas no conjunto solução, substrato e filme. Essa variação de corrente pode ser medida em função do potencial aplicado, que é chamado voltamograma cíclico. Uma característica importante dessa técnica é a sua versatilidade de uso, que serve tanto para a síntese, quanto para a caracterização de filmes poliméricos (DENARO, 1974; GREEF et al., 1985). A VC foi utilizada no trabalho para obtenção das respostas eletroquímicas dos filmes estudados em soluções livres de monômeros.

Inicialmente, foi escolhido o pH 7 para realizar a resposta dos filmes com e sem a enzima (tirosinase) imobilizada, baseado no estudo realizado por KIRALP et al., 2003 no qual os autores mostraram que a atividade da tirosinase imobilizada em PPI é maior em pH próximo de 7. Assim, foram obtidos os voltamogramas dos filmes de PPI, PMET, PPI-PMET e dos biossensores formados, sendo que as medidas foram realizadas no intervalo de potencial de -0,3 V até 0,8 V em 50 mV s^{-1} em uma solução contendo 10 mL de tampão fosfato pH 7 sem e com catecol 0,1M, sendo que foi utilizado 100 µL de catecol (solução preparada por 0,11g de catecol 0,1M em 10 mL de tampão fosfato pH7) .

2.2.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Um espectrômetro no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) típico é dividido em uma fonte de luz na região do infravermelho, um interferômetro com espelho móvel, detector, conversor analógico para digital e computador. Para o seu funcionamento, uma fonte de luz incide no interferômetro e se separa em dois feixes, um deles incide no espelho fixo e o outro, no espelho móvel. Os feixes de luz que foram refletidos se sobrepõem, gerando um feixe que incide sobre a amostra e que é detectado pelo detector. A variação da distância do espelho móvel implica em interferências construtivas e destrutivas do feixe de luz

que incide sobre o detector. O sinal detectado é convertido de analógico para digital e, em seguida, é feita a transformada de Fourier da variação do sinal pelo deslocamento do espelho para intensidade em função da frequência (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

De modo geral, a técnica de espectroscopia no infravermelho permite com que se estude a interação da luz na região do infravermelho do espectro eletromagnético com a matéria, o qual se torna importante para a determinação da estrutura química de materiais (SMITH, 1998). Essa técnica foi utilizada no presente trabalho para as caracterizações dos filmes PPI, PMET e PPI-PMET e para o estudo da superoxidação dos filmes de PPI na matriz polimérica PPI-PMET.

2.2.5 Microscopia de força atômica (AFM)

A técnica de AFM se baseia na possibilidade de se varrer uma ponta de prova da superfície da amostra nas três direções (x, y e z); essa varredura é realizada por meio de um dispositivo composto por algumas cerâmicas piezelétricas de varredura (PEREIRA-DA-SILVA; BALOGH; FARIA, 2000). A ponta de prova realiza um movimento relativo horizontal (direção xy) sobre a amostra. Em contato com a superfície, sua interação se dá através do relevo, por meio de uma força elétrica, força magnética, por gradiente térmico, etc., sendo que a ponta de prova envia sinais ao sensor de medida da ponta de prova (óptico, elétrico, magnético ou térmico). O sensor transforma este sinal em voltagem, que é aplicada ao material piezelétrico, que se contrai, ou se dilata, dependendo do sinal da voltagem, alterando a posição Z da amostra, sensibilizando novamente a ponta de prova e fechando o circuito de retroalimentação (PEREIRA-DA-SILVA; BALOGH; FARIA, 1999). O computador e interface eletrônica comandam e estabelecem automaticamente os parâmetros do experimento.

Por permitir a obtenção de imagens de superfície de amostras nas mais variadas condições, o AFM se tornou um dos equipamentos mais completos para o estudo de materiais em micro e nano escala. Diante destas informações, essa técnica foi utilizada no presente trabalho para a caracterização dos filmes PPI, PMET e PPI-PMET e comparação da superfície dos filmes preparados para imobilização da PFO por maneiras diferentes.

CAPITULO 3

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes à preparação e caracterização dos filmes de polipirrol/polimetiltiofeno (PPI-PMET) e das diferentes maneiras de imobilização da enzima, polifenol oxidase (PFO), nas matrizes poliméricas superoxidadas e não superoxidadas para aplicação em biossensores. Será discutido como algumas variáveis, tais como concentração e tempo de imobilização da enzima, pH e potencial operacional, influenciam o comportamento eletroquímico dos filmes poliméricos. Além disto, serão discutidos o comportamento dos biossensores quando em presença de catecol e as suas respectivas curvas analíticas.

3.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1 Eletrossíntese dos filmes PPI-PMET

A Figura 9 mostra o cronoamperograma obtido durante a síntese dos filmes em diferentes potenciais sobre eletrodos de Pt. Nota-se, nessas curvas, no início da polimerização a corrente aumenta até um máximo e depois diminui de maneira diferente a cada potencial aplicado. As curvas referentes aos potenciais 1,8 V, 1,9 V e 2,0 V apresentaram um comportamento semelhante, quando são comparadas umas com as outras, pois se observa uma região praticamente constante, comum a uma resposta de corrente estável. Diante destas observações, é possível se prever que estes são os potenciais de síntese mais adequados para a formação do filme PPI-PMET.

Além disso, a curva referente ao potencial de 2,15 V também apresenta uma região constante, entretanto, devido ao alto potencial aplicado, os valores de correntes são muito próximos de zero, ou seja, nestas condições, foi obtido um filme pouco condutor pela sua superoxidação.

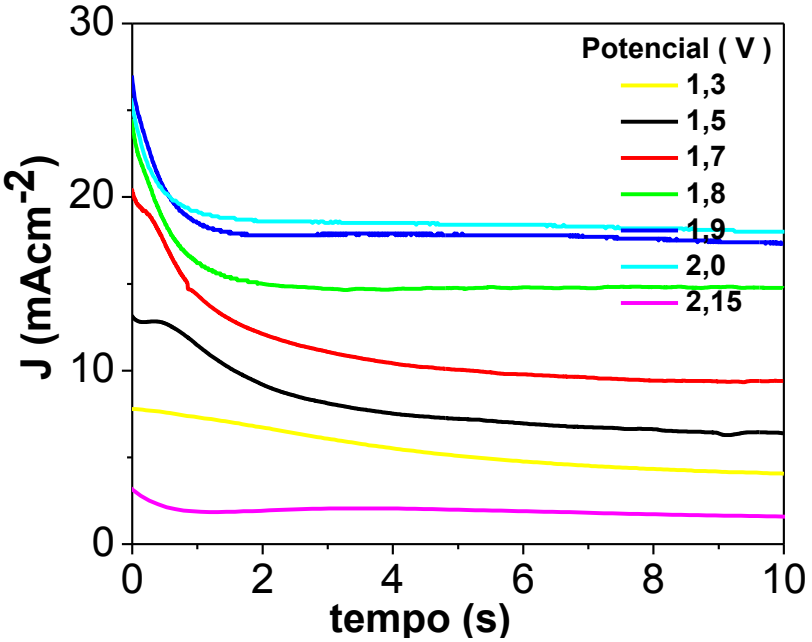


Figura 9. Cronoamperogramas de síntese de PPI-PMET em solução 0,01 mol L-1 de pirrol e 0,1 mol L-1 de metiltiofeno em acetonitrila contendo 0,1 mol L-1 de NaClO4 em diferentes potenciais aplicados

Com o intuito de se comparar as sínteses da nova matriz polimérica e dos homopolímeros, foi realizada a síntese dos homopolímeros (PPI e PMET) aplicando-se 1,8V, 1,9V e 2,0V em $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte e em concentrações de monômeros idênticas às utilizadas nas condições da Figura 9. A Figura 10 apresenta os cronoamperogramas obtidos para estas sínteses.

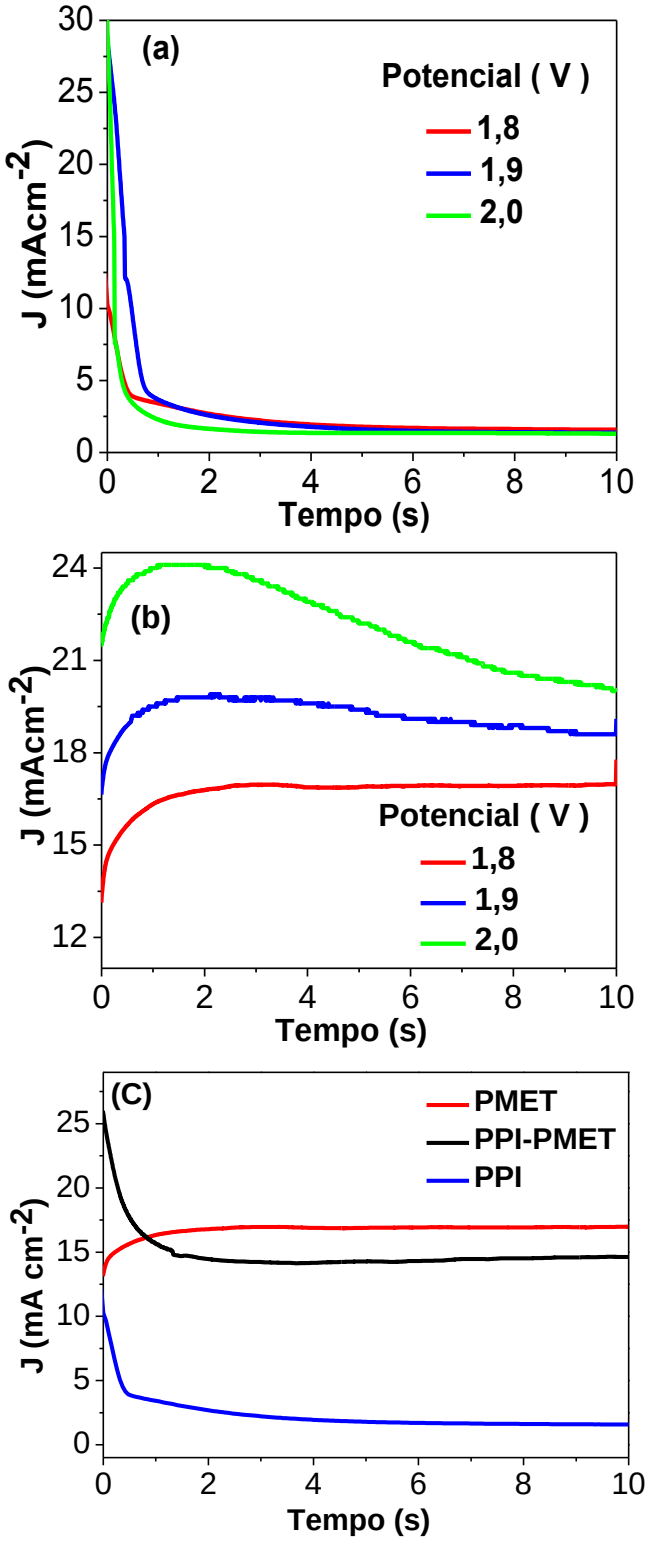


Figura 10. Cronoamperogramas de síntese dos filmes de PPI 0,01 mol L^{-1} (a) e PMET 0,1 mol L^{-1} (b) em acetonitrila contendo 0,1 mol L^{-1} $NaClO_4$ em diferentes potenciais vs Ag/AgCl. (c) comparação das curvas dos homopolímeros (PPI e PMET) e dos filmes de PPI-PMET

Analisando a curva para a síntese do filme de PPI, Figura 10 (a), nota-se um

comportamento similar ao da curva referente ao potencial de 2,15 V da Figura 9, indicando a formação de filmes poucos condutores, possivelmente superoxidados. Já na Figura 10 (b), observa-se inicialmente um aumento da corrente e uma forma diferente das curvas mostradas anteriormente; depois, nota-se a formação de uma região estável na curva referente ao potencial de 1,8 V, o que indica que, neste potencial, pode haver a formação de um polímero condutor (PMET). A parte inicial do cronoamperograma está associada ao processo de nucleação dos filmes e indica que os filmes de PPI e PMET apresentam estágios iniciais de nucleação diferentes.

A Figura 10 (c) mostra que, nas mesmas condições de sínteses, os filmes dos homopolímeros apresentam comportamentos distintos e o filme de PPI-PMET, um comportamento intermediário entre os observados para os filmes PPI e PMET, com a formação de um novo material polimérico.

3.2 Caracterizações do PPI-PMET

3.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR

A Figura 11 apresenta os espectros dos filmes de PPI-PMET e dos homopolímeros obtidos sobre Pt em acetonitrila contendo 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ em 1,8V como potencial operacional de síntese. Pode-se observar que o espectro de PPI-PMET, além dos dois picos novos em torno de 1450 cm^{-1}e 800 cm^{-1}, apresenta mais cinco novos picos em torno de 1380 cm^{-1}, 1325 cm^{-1}, 1285 cm^{-1}, 1280 cm^{-1} e 710 cm^{-1}, indicando a formação de um novo material polimérico com características de ambos os homopolímeros.

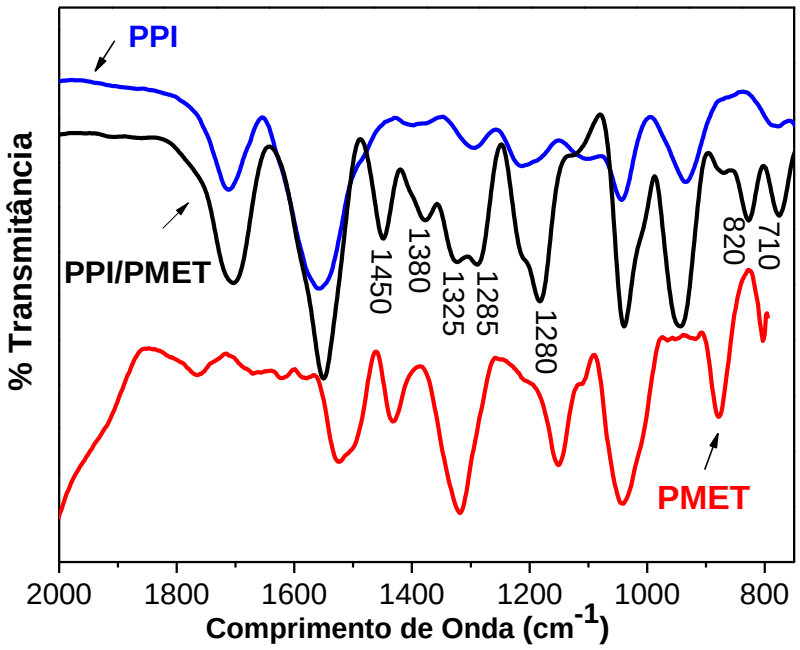


Figura 11. Espectros de FTIR dos filmes de PPI, PMET e PPI-PMET sintetizados em acetonitrila contendo 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ no potencial de 1,8 V vs. Ag/AgCl

3.2.2. Voltametria Cíclica

Analisando os voltamogramas da Figura 12, nota-se que, para o filme de PPI, um par redox de baixa definição em torno de 100 mV e para o filme de PMET, apenas um pico anódico em torno de 600 mV. Já o voltamograma do filme de PPI-PMET, obtido também no potencial de síntese de 1,8 V, não apresentou um pico definido, nem na região do filme PPI nem na do filme PMET. Portanto, verifica-se, nos voltamogramas da Figura 12, uma resposta característica, própria, do filme de PPI-PMET em relação aos seus homopolímeros.

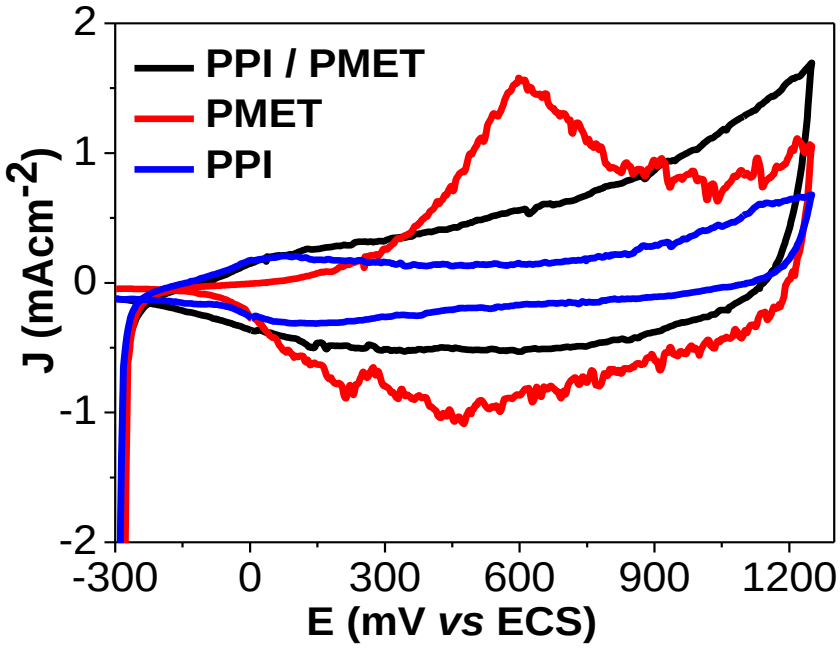


Figura 12. Voltamogramas cíclicos dos filmes de PPI-PMET, PMET e PPI em uma solução aquosa de $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} a 50 mV s^{-1} no potencial de síntese de 1,8 V vs Ag/AgCl

3.2.3 Microscopia de força atômica (AFM)

Os filmes de PPI, PMET e PPI-PMET foram caracterizados também por AFM e as imagens obtidas podem ser vistas na Figura 13.

Nessas imagens, quanto mais clara for a região, maior será a altura do ponto observado, que corresponde ao máximo no eixo z; consequentemente, as regiões mais escuras são referentes aos "vales" ou depressões. De modo geral, pode-se dizer que a morfologia dos grãos dos filmes dos homopolímeros (PPI e PMET) muda se comparados ao filme PPI-PMET.

Os valores de RMS (rugosidade média quadrática), diferença na área superficial e morfologia dos grãos dos filmes de PPI, PMET e PPI-PMET estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores dos parâmetros: rugosidade média quadrática, diferença área superficial e morfologia dos grãos dos filmes dos homopolímeros (PPI e PMET) do PPI-PMET

Filme	PPI	PMET	PPI-PMET
Rms (nm)	**9,52**	**57,30**	**35,80**
Diferença de área superficial (%)	**8,33**	**51,80**	**29,40**
Morfologia dos grãos (nm)	**39,88**	**133,64**	**210,21**

Os resultados obtidos demonstram que os valores da rugosidade média e da área superficial dos filmes PPI-PMET estão entre os valores obtidos para os filmes PPI e PMET. Observou-se também que o valor da morfologia dos grãos dos filmes PPI-PMET foi maior do que a somatória dos valores da morfologia dos núcleos dos homopolímeros (PPI e PMET).

Outra característica peculiar foi também observada para os filmes PPI-PMET, os grãos maiores observados na imagem surgem com a sobreposição de vários grãos menores, sendo que nos filmes de PPI são observados somente grãos menores e no PMET apenas maiores. Portanto, podemos novamente sugerir que, nas condições de síntese estudada para os filmes PPI-PMET, houve a formação de uma nova matriz polimérica.

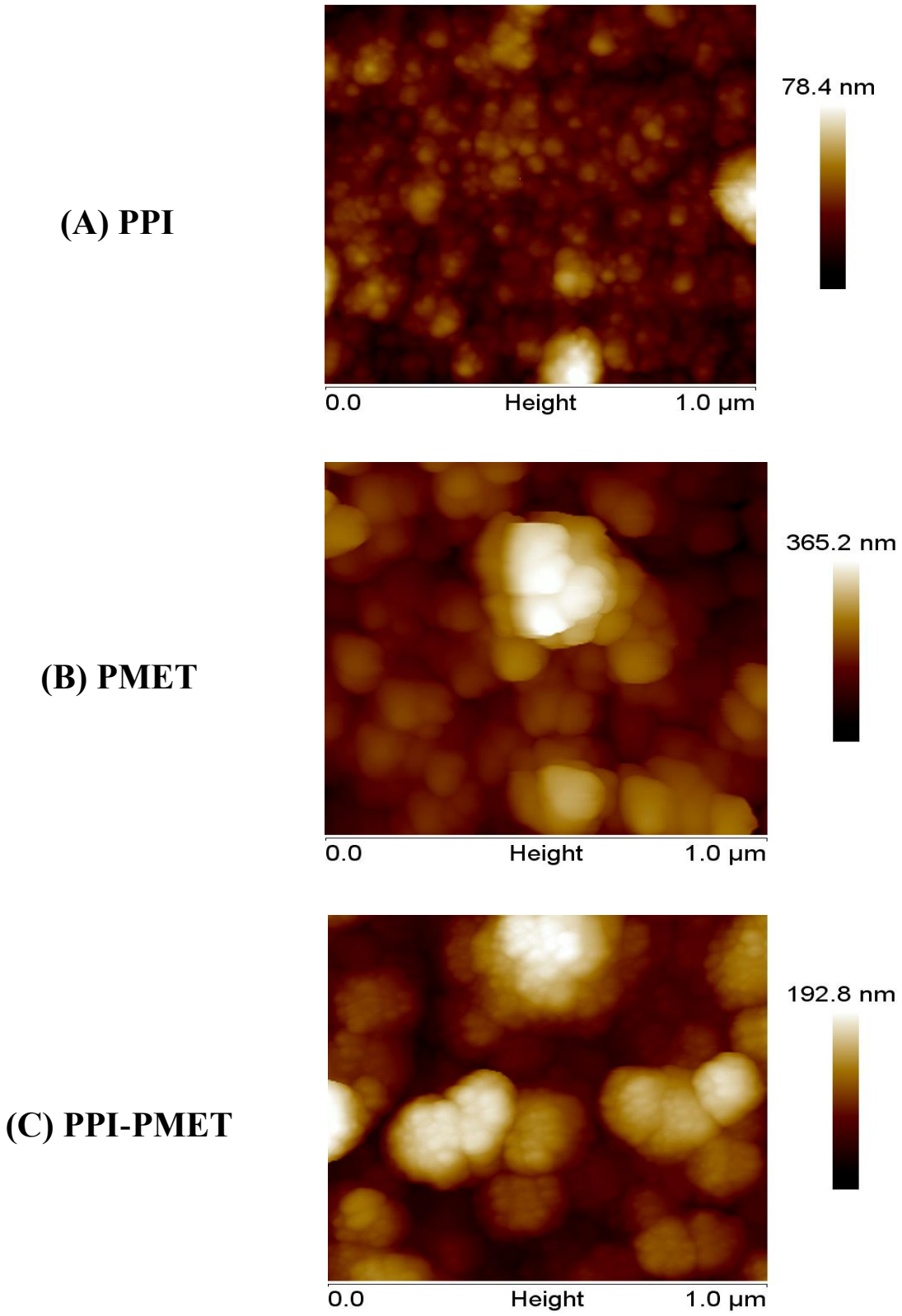


Figura 13. Imagens de AFM dos filmes PPI, PMET e PPI-PMET sintetizados por cronoamperometria utilizando potencial de 1,8 V em meio a $NaClO_4$ 0,1 mol L^{-1} em acetonitrila

3.3 Resposta de referência dos filmes de homopolímeros e PPI-PMET em solução contendo catecol e sem a presença de catecol

Na Figura 14 podem ser observados os voltamogramas obtidos para os filmes poliméricos em presença e na ausência de um composto fenólico, neste caso, catecol. Para todos os filmes, observou-se um aumento da corrente em presença de catecol 0,1 mol L^{-1}. Na Figura 14 (a) nota-se que o PPI responde em presença de catecol em torno de 400 mV na região anódica e -50 mV na região catódica. Já o PMET responde em torno de 200 mV na região anódica e em torno de 100 mV na catódica. Evidenciando novamente a característica própria do filme de PPI-PMET, com picos anódico e catódico intermediários aos observados dos homopolímeros, em torno de 300 mV e 50 mV, respectivamente. Para melhor visualização, na Figura 14 (d) são apresentados os voltamogramas dos três filmes na presença de catecol, onde se evidencia o aumento da corrente de resposta no filme de PPI-PMET.

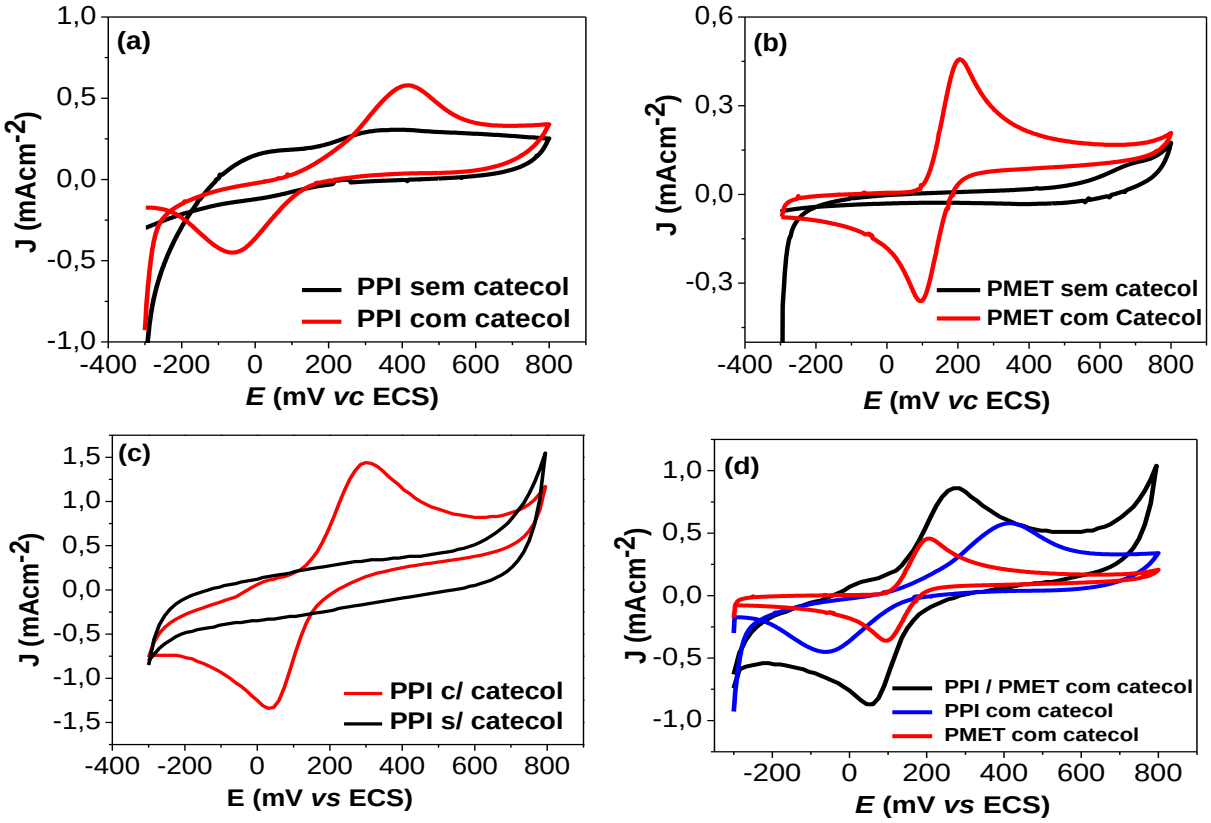


Figura 14. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} em solução tampão fosfato pH 7 com catecol e sem catecol 0,1 mol L^{-1} para os filmes PPI (a), PMET (b) e PPI-PMET (c) e apenas com catecol para os filmes PPI, PMET e PPI-PMET (d)

3.4 Estudo da superoxidação do PPI e PMET nos filmes PPI-PMET

Para a imobilização física da tirosinase nos filmes de PPI-PMET, estudou-se o processo de superoxidação do PPI e PMET pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e FTIR.

Analisando os voltamogramas da Figura 15, observa-se que a superoxidação dos filmes de PPI-PMET ocorre a potenciais positivos relativamente altos; há uma diminuição nos valores de corrente com o aumento do número de ciclos pelo próprio efeito de diminuição da condutividade dos filmes, ou seja, houve uma quebra das duplas ligações das estruturas dos polímeros que constituem os filmes. Na Figura 15 (a) observa-se um processo na região anódica em torno de 800 mV *vs* Ag/AgCl, que se desloca para valores positivos com o aumento do número de ciclos, e um processo na região catódica em torno de 400 mV *vs* Ag/AgCl, que se desloca para valores positivos. Já na Figura 15 (b), há o aparecimento de um processo na região anódica em torno de 300 mV *vs* Ag/AgCl e na região catódica, um processo largo em de 200 mV *vs* Ag/AgCl. Para melhor visualizar estes processos, as curvas das Figuras 15 (a) e 15 (b) foram sobrepostas na Figura 14 (c).

Com a sobreposição dos voltamogramas, observa-se a diminuição do processo redox em potencial catódico nas curvas (a) e (b) em função dos números de ciclos, restando apenas outro pico em torno de 300 mV *vs* Ag/AgCl na curva (a) e nenhum pico na curva (b). Sabendo que trabalhos encontrados na literatura sugerem que o processo de superoxidação do PPI em solução aquosa é coincidente com o potencial de eletrólise de oxidação da água dando origem ao grupo carbonila no anel do PPI, pode-se considerar que ocorre a interrupção da conjugação da cadeia (LI; QIAN, 1999) e a superoxidação do PMET ocorre em regiões de mais altos potenciais positivos. Este processo é facilitado em meio não-aquoso em presença de pequena quantidade de água (BRASCH; BECK, 1996), sendo possível se sugerir que, em um menor intervalo de potencial, ocorre a superoxidação somente das cadeias de PPI, Figura 15 (a), e a um intervalo de potencial maior, a superoxidação das cadeias de ambos, PPI e PMET, Figura15 (b).

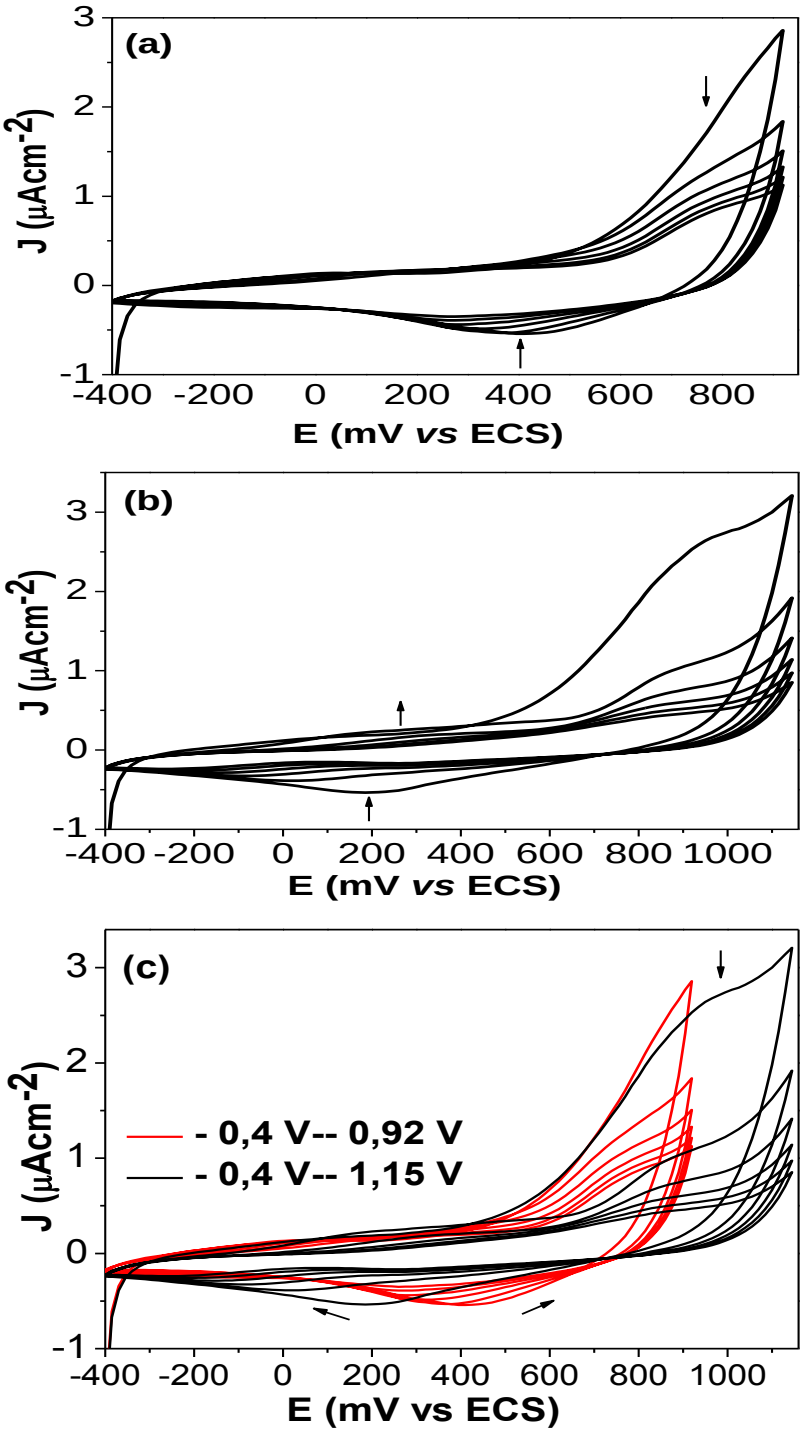


Figura 15. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} dos filmes de PPI-PMET em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ (solução livre do monômero) nos seguintes intervalos de potencial: (A) -0,40 V até 0,92 V, (B) -0,40 V até 1,15 V, (C) sobreposição de (A) e (B)

Na Figura 16 estão apresentados os espectros de FTIR dos filmes de PPI-PMET antes e após as superoxidação. O pico característico do PPI, em 1565 cm $^{-1}$, referente às ligações C-

C, C=C aromática (GIACOMINI; TICIANELLI, 1999), pode ser observado somente no espectro do filme de PPI-PMET, Figura 16 (a). Em ambos os espectros dos filmes de PPI-PMET superoxidados, Figura 16 (a) e 16 (b), este pico praticamente desaparece, indicando uma diminuição destas ligações pela quebra da conjugação das cadeias poliméricas do PPI após a formação de grupos carbonilas.

O pico em torno de 1713 cm^{-1}, referente aos grupos carbonilas do PPI oxidado, foi observado em todos os espectros, indicando que durante a copolimerização ocorre em menor proporção a superoxidação do PPI. Entretanto, no espectro do filme de PPI-PMET superoxidado em um menor intervalo de potencial, Figura 16 (b), o pico em 1713 cm^{-1} tem a mesma forma do pico para o filme de PPI superoxidado (GE et al., 1994) podendo indicar que, nestas condições, somente a estrutura do PPI foi superoxidada. No espectro do filme de PPI-PMET superoxidado em um maior intervalo de potencial, Figura 16 (c), observa-se um pico em 1660 cm^{-1} característico de grupos carbonilas nos filmes de PMET superoxidado (BRASCH; BECK, 1996). É importante mencionar que a este pico pode estar superposto o pico em 1719 cm^{-1} do grupo carbonila referente à superoxidação do PPI. Além disto, dois picos intensos, em torno de 1110 cm^{-1} e 1307 cm^{-1}, referentes às vibrações simétrica e assimétrica de grupo sulfônico, foram encontrados no espectro do filme de PPI-PMET superoxidado em um maior intervalo de potencial, indicando também a superoxidação do PMET (BRASCH; BECK, 1996).

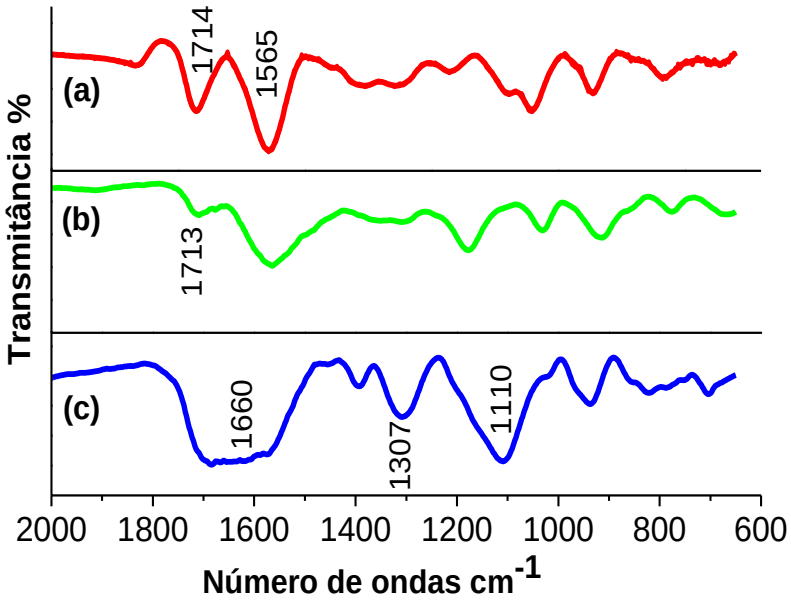


Figura 16. Espectros de FTIR dos filmes PPI-PMET (a) antes da superoxidação e após, aplicando os intervalos de potenciais: (b) -0,40 V a 0,92 V e (c) -0,40 V a 1,15 V

Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos pela técnica de voltametria cíclica apresentados no presente trabalho. A superoxidação somente das cadeias de PPI nos filmes do copolímero é bastante interessante, pois o PPI superoxidado possui grupos carbonilas que atraem espécies positivamente carregadas, indicando a possibilidade da imobilização física da tirosinase (SHIMOMURA et al., 1998). Ademais, a suposta diminuição da condutividade devido à superoxidação das cadeias do PPI pode ser suprida pela condutividade do PMET, que terá cadeias conjugadas sem a presença considerável de defeitos mesmo após a aplicação deste potencial relativamente alto. Embora, não tenhamos medido a condutividade elétrica destes filmes, este resultado é o esperado e merece estudos detalhados.

A partir dos resultados discutidos anteriormente, escolheu-se uma varredura de potenciais entre -0,40 V até 0,92 V para a superoxidação somente das cadeias do PPI nos filmes de PPI-PMET. Após a superoxidação do PPI nos filmes de PPI-PMET, procedeu-se com a imobilização física da tirosinase, obtida a partir do extrato bruto de abacate segundo Lupetti, Ramos e Fatibello-Filho (2003).

A fim de identificar a eficiência do método de superoxidação do PPI nos filmes de PPI-PMET para a imobilização PFO, comparamos o mesmo com os filmes PPI-PMET não superoxidados, sendo que a imobilização da enzima em ambos os filmes foi realizada de duas formas: i) para os filmes de PPI-PMET que não foram superoxidados, a PFO foi imobilizada na síntese e após a síntese, sendo o filme imerso no extrato bruto por 2 h, ii) nos filmes tendo o PPI superoxidado, a PFO foi imobilizada no momento e depois da superoxidação, sendo o filme também imerso no extrato bruto por 2 h. Desta forma, foram obtidos quatro diferentes biossensores: PPI-PMET/PFO_{sint}, PPI-PMET/PFO_{temp}, PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, PPI_{sup}PMET/PFO_{temp}.

3.5 Respostas dos biossensores com e sem catecol

Para um biossensor amperométrico, é necessária a identificação do melhor potencial de trabalho para se obter a sua resposta amperométrica em função da concentração do analito; além disso, o potencial de trabalho é extremamente importante para as etapas de otimização dos biossensores. Neste potencial, espera-se que haja um papel insignificante das espécies interferentes nas respostas de corrente. Assim, nota-se nos voltamogramas da Figura 17 uma

resposta típica dos biossensores obtidas sem e com a presença de catecol para filmes de PPI-PMET superoxidados (a) e não superoxidados (b) e com a enzima imobilizada de maneira diferente para cada um dos filmes (na síntese, depois da síntese, na superoxidação e depois da superoxidação).

Nas Figuras 17 (a) e (b) observa-se a diferença das respostas de corrente dos biossensores sem e com a presença do catecol. Na Figura 16 (a) nota-se na varredura anódica e catódica dos filmes PPI-PMET/PFO_{sint}e PPI-PMET/PFO_{termp}em presença de catecol uma variação marcante da densidade de corrente. Os filmes que foram superoxidados, Figura 16 (b), também apresentaram uma resposta voltamétrica com uma variação marcante de corrente entre a curva do filme obtido sem catecol em relação aos filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e PPI_{sup}-PMET/$_{PFOtemp}$.

Desta forma, podemos dizer que a presença da enzima nos filmes poliméricos em catecol como analito possibilitou com que fosse possível se identificar os potenciais dentro das regiões de trabalho apropriadas, em torno de 0,3 V e 0,4 V para os filmes não superoxidados (a) e superoxidados (b), respectivamente.

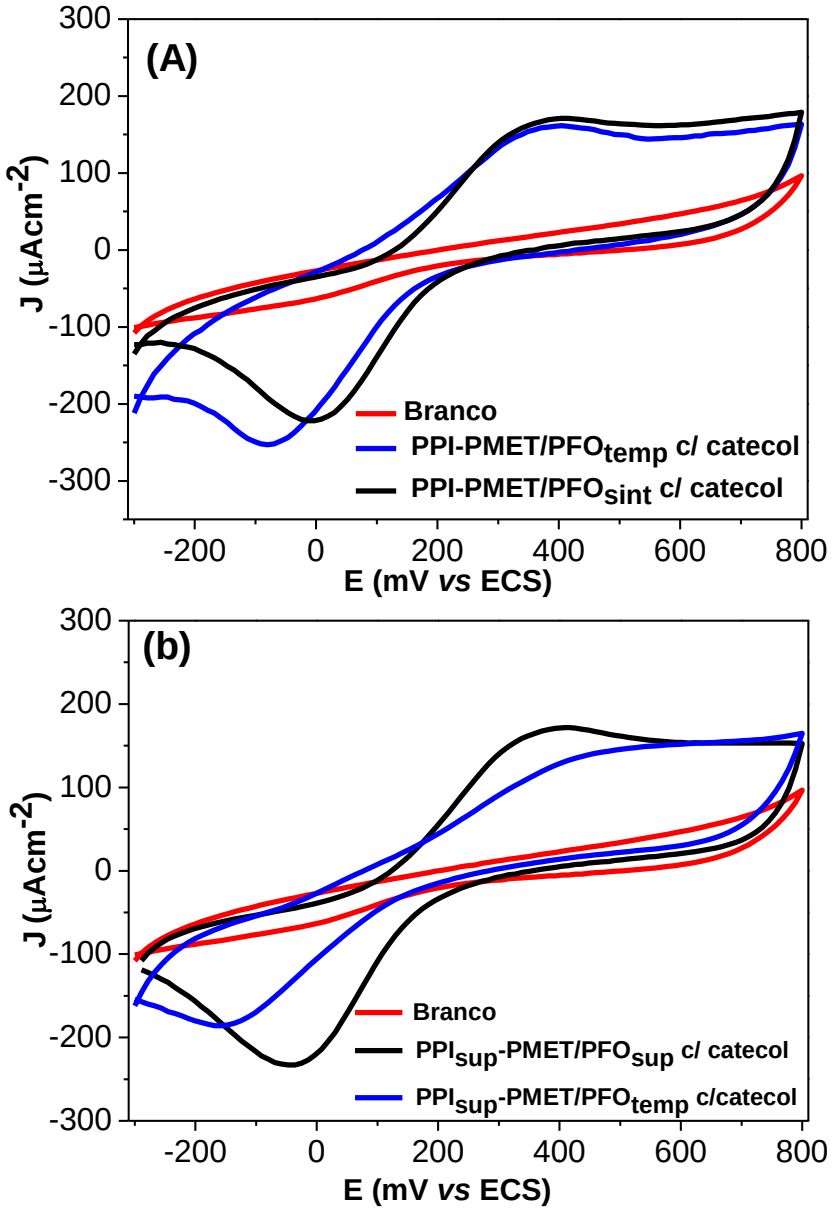


Figura 17. Respostas voltamétricas a 50 mV s^{-1} em solução tampão fosfato pH 7 com catecol 0,1mol L^{-1} e sem catecol (Branco) dos biossensores que foram preparados sem a superoxidação (a) e com a superoxidação (b) dos filmes

3.6 Otimização dos parâmetros de preparo dos biossensores

Quando um biossensor é construído, procedimentos importantes são necessários a fim de se avaliar as suas melhores condições de operação. No processo de imobilização de enzimas, busca-se manter a atividade enzimática, pois, durante a imobilização, podem ocorrer mudanças no comportamento cinético das enzimas provocado por fatores físicos e químicos e que afetam diretamente uma reação enzimática. Portanto, a otimização das condições operacionais dos biossensores são de extrema importância para se alcançar melhores desempenhos.

3.6.1 Resposta dos biossensores em função da concentração da enzima.

Foram construídos biossensores após variar as concentrações da enzima utilizadas durante a imobilização, na faixa de 20 a 180 U mL^{-1}; foram obtidas as curvas de densidade de corrente anódica máxima para cada biossensor em função da concentração de enzima, comumente chamada de curvas de sensibilidade. A imobilização da PFO nos filmes de PPI-3PMET foi realizada por adsorção física, conforme Figura 18.

Na Figura 18 (a) é possível se observar três regiões distintas; entre 120 U mL^{-1} a 140 U mL^{-1} estão os maiores valores de densidade de corrente. Portanto, optou-se por trabalhar com uma concentração de enzima de 140 U mL^{-1} para os filmes PPI-PMET/PFO_{sint}.

Para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, a Figura 18 (b) apresenta duas regiões distintas, sendo a região com maiores valores de densidade de corrente entre 100 U mL^{-1} a 160 U mL^{-1}; neste caso, a concentração de trabalho escolhida foi de 120 U mL^{-1}.

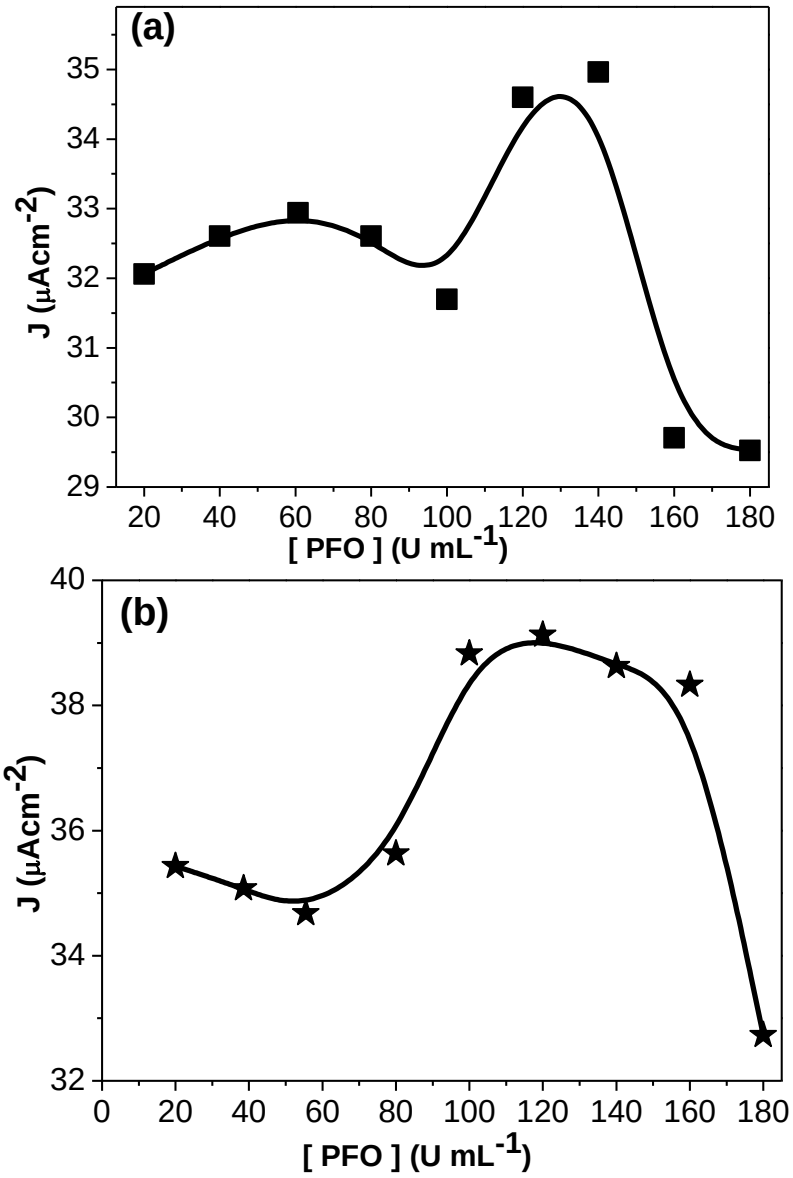


Figura 18. Curvas J vs [PFO] obtidas em meio de catecol 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes: a) PPI-PMET/PFO_{sint} e b) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}

3.6.2 Resposta dos biossensores em função do tempo de imobilização da enzima.

Um fator importante na construção de um biossensor com bom desempenho é o conhecimento respeito de qual é a melhor maneira de se imobilizar a enzima sobre uma matriz, diminuindo fatores que levam a uma perda de atividade catalítica, ou seja,

desnaturação da enzima. Visando estudar qual era a melhor maneira de se imobilizar a PFO nos filmes de PPI-PMET, preparados conforme Tabela 1, procedeu-se com a otimização do tempo de imobilização (Figura 19).

A Figura 19 (a) mostra o efeito do tempo de imobilização da PFO nos valores de densidade de corrente durante o preparo dos filmes de PPI-PMET/PFO_{temp}, que aumenta bruscamente até 120 para maiores tempos de imobilização. Portanto, a faixa de valores máximos do tempo de imobilização da enzima foi de 60 min a 360 min, optando-se pelo tempo de 360 min (6 h) para a imobilização da PFO após a síntese do PPI-PMET.

Para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 19 (b), é possível se observar um pequeno aumento da densidade de corrente até 10 min e, em seguida, um decaimento brusco, tendendo a uma estabilização. Neste caso, utilizou-se 10 min como o tempo necessário para a imobilização da enzima os filmes de PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}.

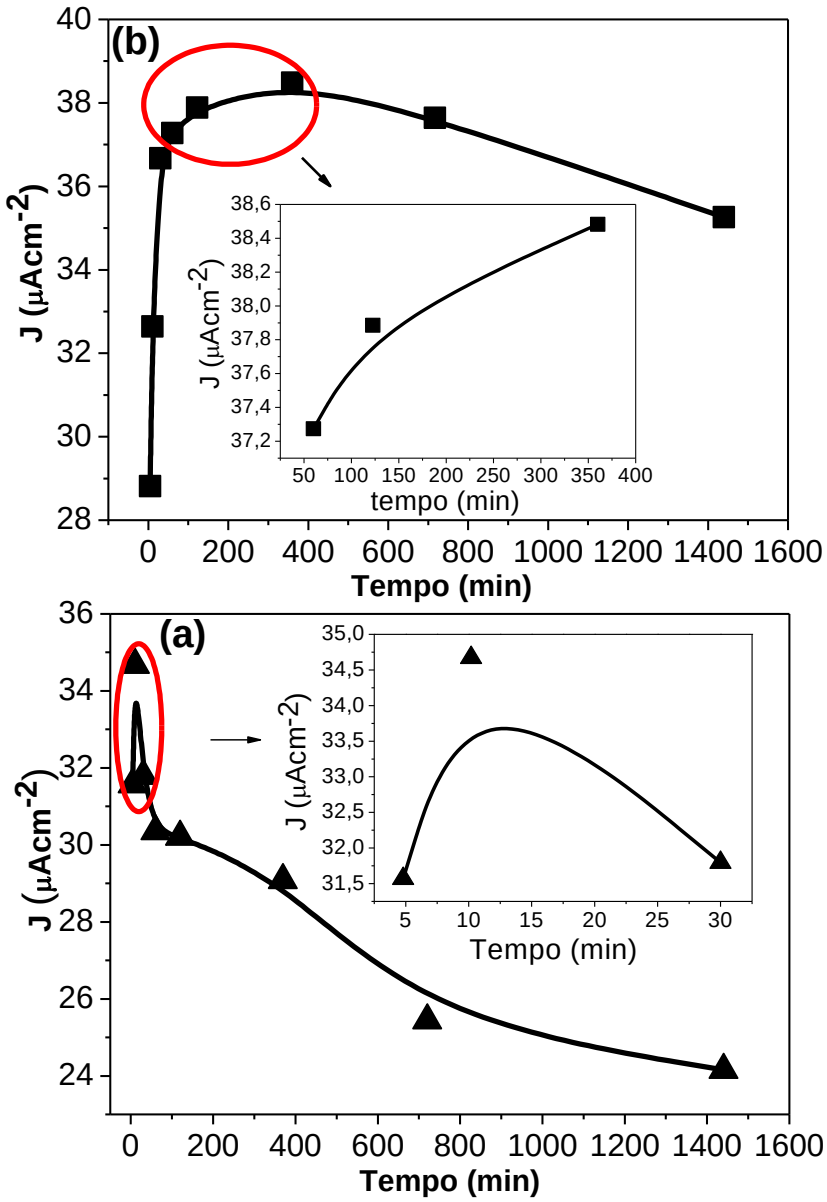


Figura 19. Curvas J vs Tempo de imobilização da PFO em meio de catecol 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes a)PPI-PMET/PFO_{temp} e b) PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}

3.6.3 Estudo da cinética enzimática

A Figura 20 mostra o espectro na região do UV-VIS para uma solução contendo catecol como substrato e PFO. Neste espectro, observa-se uma banda de absorção bem definida por volta de 410 nm e que é típica de estruturas do tipo quinonas. A PFO em solução

catalisa a oxidação do catecol em quinonas, produzindo uma solução amarelada.

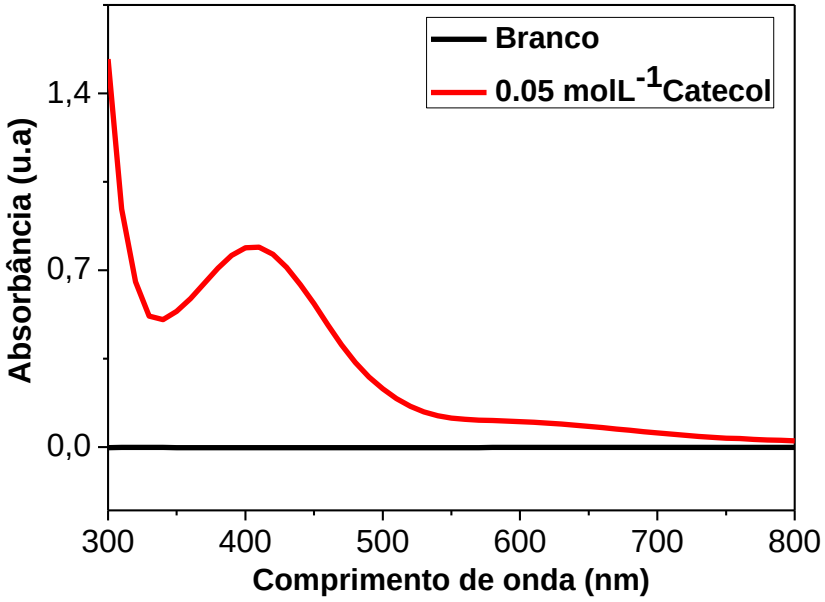


Figura 20. Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,05 mol L^{-1}) em tampão fosfato pH 7 (0,1 mol L^{-1})

O monitoramento da variação da absorbância em função do tempo foi utilizado para se acompanhar à cinética enzimática a um comprimento de onda fixa, 410 nm. A Figura 21 mostra as curvas obtidas para as diferentes concentrações escolhidas de catecol.

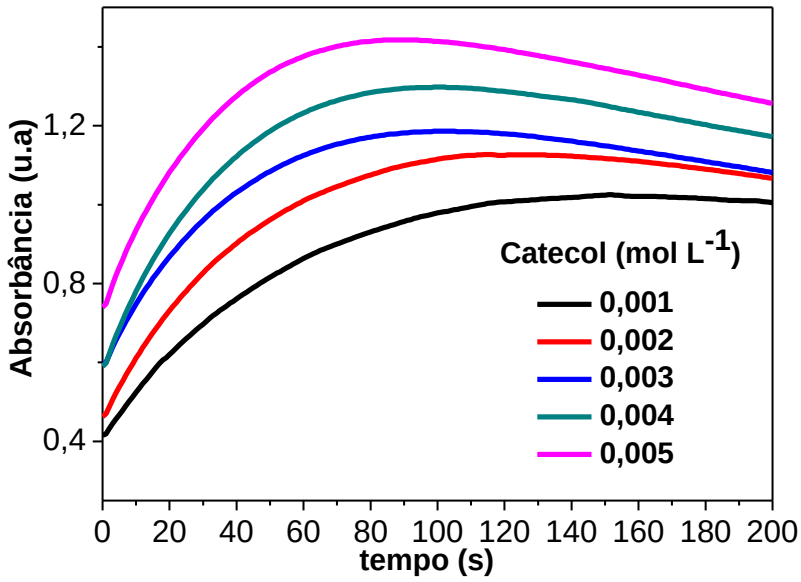


Figura 21. Curvas cinéticas de absorbância vs tempo obtidas a diferentes concentrações de catecol a uma quantidade fixa de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} a pH 7

O método Lineweaver-Burk foi utilizado para se encontrar os valores dos parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}), mantendo constantes a temperatura e o pH das soluções enquanto se variava a concentração do substrato (Figura 22). Foram encontrados os valores de K_m= 3,7 mmol L^{-1} e V_{max}= 23 mmol s^{-1} para a enzima livre (não imobilizada) em catecol. O valor de K_m representa a afinidade de enzima pelo substrato, no caso, catecol; quanto menor for o valor de K_m, maior será a afinidade, o que reflete na sensibilidade do biossensor. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois se verificou que o valor de K_m encontrado para enzima livre era menor do que o valor de K_m (4,0 mmol L^{-1}) encontrado na literatura (ARSLAN et al., 2005).

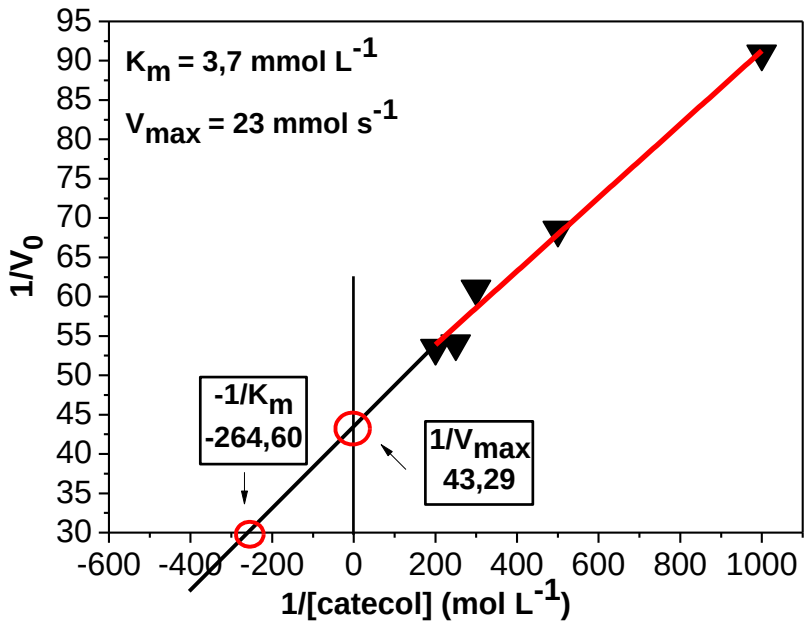


Figura 22. Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs inverso da concentração de catecol para determinação da velocidade máxima e constante de Michaelis-Menten

3.6.4 Efeito do pH

A densidade de corrente anódica máxima foi obtida no valor de potencial operacional de 0,3 V em função do pH no intervalo de 5,0 a 9,0. A escolha desta faixa de operação foi determinada após se considerar que muitas enzimas, devido a problemas relacionados à desnaturação, atuam em ambientes restritos de pH e temperatura (LI; HUANG; LIU, 1998). Além disso, há relatos na literatura sobre o pH ótimo de atuação de PFO, entre 6 e 7 (GUI et

al., 2007; LIU et al., 2007), sendo a enzima inativa em pH 4,0 ou abaixo. Estes valores podem variar ligeiramente em função do tamanho e quantidades de proteínas ligadas à enzima e também com a fonte de origem do substrato.

Inicialmente, observa-se que curvas com comportamentos diferentes são obtidas para os filmes PPI-PMET/PFO_{sint} e PPI-PMET/PFO_{temp}**,** Figura 23 (a) e 23 (b). Para os filmes PPI-PMET/PFO_{sint}, Figura 23 (a), observa-se na curva J *vs* pH um crescimento praticamente linear da densidade de corrente entre pH 5,0 até 8,0, sendo o valor máximo em pH 8,0. Em seguida, observa-se uma diminuição da densidade de corrente até pH 9,0. Portanto, o pH 8,0 foi o escolhido como o melhor para estes filmes.

Para os filmes PPI-3PMET/PFO_{temp}, Figura 23 (b), foram observadas duas regiões com um patamar, a primeira na região de pH 6,0 e a segunda, pH 8,5. Assim, o pH 8,5, na segunda região da curva, foi escolhido como o pH ótimo, ou de trabalho. Para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 23 (c) e 23 (d), foram também obtidas curvas distintas. Na curva J *vs* pH para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, Figura 23 (c), observa-se um valor máximo de densidade de corrente em pH 7,5, sendo este valor de pH o escolhido para medidas posteriores. Já para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 23 (d), a curva possui uma região quase linear entre os pHs 5,0 e 8,0, e um aumento na densidade de corrente por volta dos pHs 8,0 e 8,5 decrescendo até pH 9,0. A partir desta análise, optou-se por trabalhar com uma solução em pH 8,5 para estes filmes.

Para todos os filmes, o pH ótimo foi encontrado entre 7,5 e 8,5, o que mostra um grande deslocamento do pH ótimo para regiões alcalinas. Nesta região ocorre uma diminuição na quantidade de H^+ na interface dos filmes que, eventualmente, pode ocorrer, o retorno da atividade de enzima (FOSCHINI, 2009). Por isso, os resultados das respostas de corrente entre os pH 7,5 e 8,5 para os filmes estudados são mais intensos do que o pH ótimo da enzima livre (pH 6,0 e 7,0). Resultado semelhante foi encontrado por Lacroix et al. (1998), sendo o pH ótimo encontrado de 9,0 para um biossensor de PFO imobilizadas em filmes de PPI funcionalizado com poli(dimetilsiloxano), com uma resposta de corrente 80% maior que o pH ótimo da enzima livre.

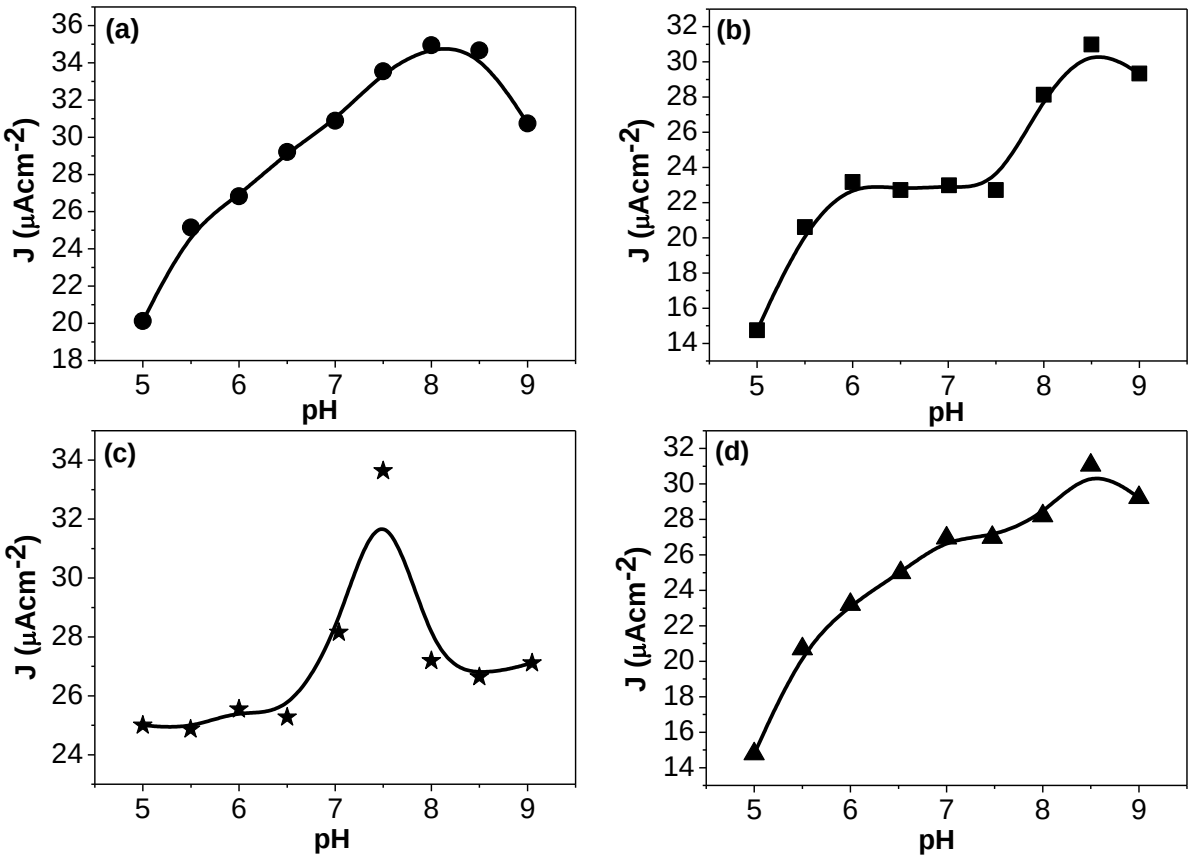


Figura 23. Curvas J vs pH em uma solução contendo 3,0 x 10^{-4} mol L^{-1} de catecol em diferentes concentrações de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e 0,1 mol L^{-1} de $NaClO_4$ para os filmes: (a)PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/PFO_{temp}, (c)PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} (d) PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}

3.6.5 Efeito do potencial operacional

Outro parâmetro também importante em estudos sobre biossensores é a escolha do potencial operacional, contribuindo para que se busque um aumento da sensibilidade e seletividade dos biossensores. Antes de iniciar as etapas de otimização, foram feitas as detecções por voltametria cíclica de diferentes concentrações de catecol. Diante dos resultados obtidos, observa-se que os filmes PPI-PMET/PFO_{sint}, PPI-PMET/PFO_{temp}, PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, apresentaram valores de potencial operacional diferentes uns do outro e, por isso, escolheu-se uma faixa de valores de potencial.

Para os filmes PPI-PMET/PFO_{sint} e PPI-PMET/PFO_{temp}, Figura 24 (a) e 24 (b), a varredura do potencial operacional foi escolhida em uma faixa de -0,1 V até 0,7 V até se obter a melhor resposta amperométrica, que corresponde a 0,3 V e 0,5 V, respectivamente. Em

ambas as curvas, observa-se um aumento da densidade de corrente até um valor máximo de 0,3 V para os filmes PPI-PMET/PFO_{sint} e 0,5 V para os filmes PPI-PMET/PFO_{temp}; após estes valores, ambas as curvas apresentam uma pequena queda para potenciais mais positivos, o que leva à conclusão que a enzima pode ter se desnaturado e perdido a sua atividade.

Observa-se comportamentos distintos nas curvas dos filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 24 (c) e 24 (d). As curvas dos filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, Figura 24 (c), apresentaram um aumento da densidade de corrente entre os valores de potencial de 0,0 V a 0,5 V, permanecendo constante para os próximos valores. Já para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 24 (c), a densidade de corrente aumentou até 0,5 V e teve uma queda significativa para valores mais positivos de potencial. Assim, o potencial escolhido para alcançar maior sensibilidade nas respostas dos filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e PPI_{sup}-PMET/PFO_{temp}, Figura 24 (c) e 24 (d), foi 0,5 V, pra ambos os casos.

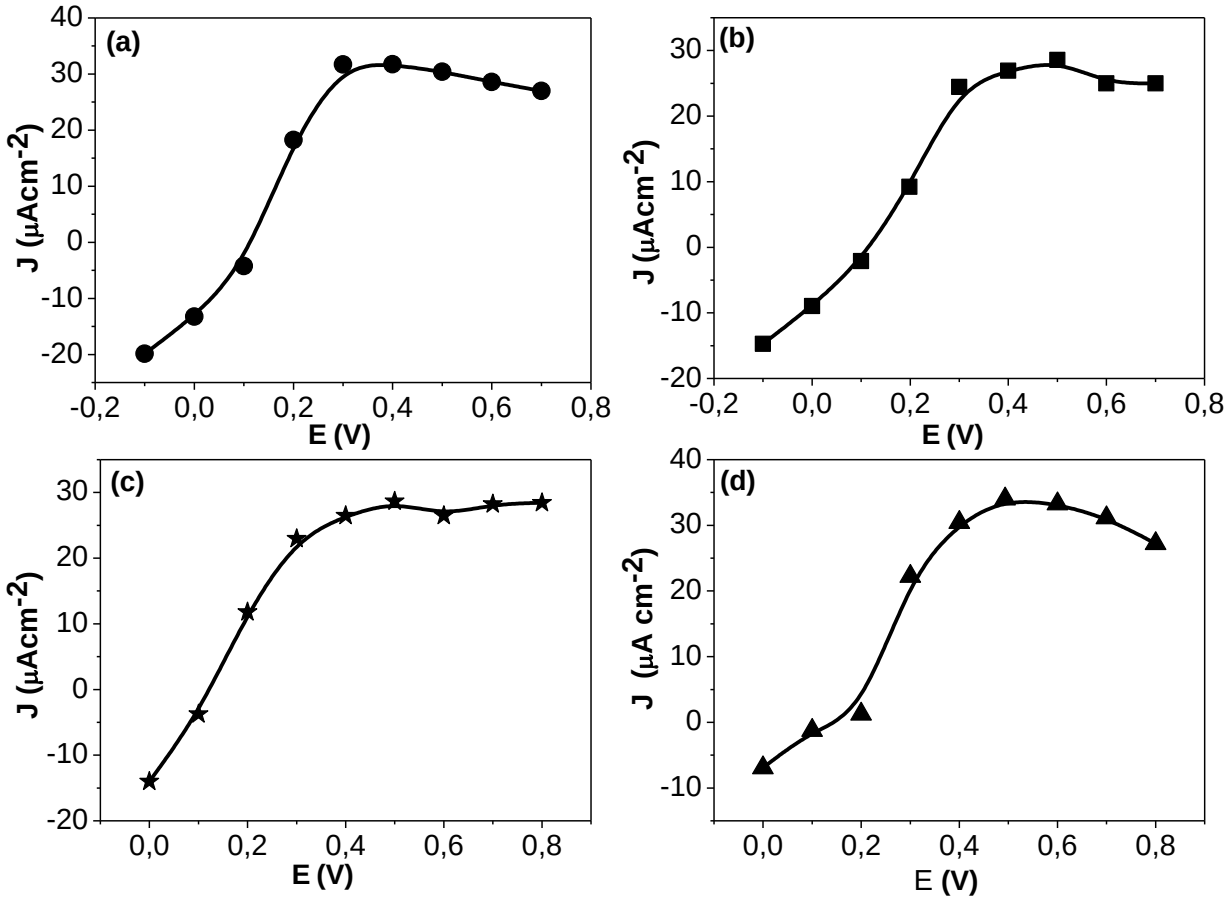


Figura 24. Estudo do potencial operacional sobre as respostas amperométricas para os filmes (a) PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/PFO_{temp}, (c) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e (d) PPI_{sup}PMET/PFO_{temp} em uma solução contendo 3,0 x 10^{-1} mol L^{-1} de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}

3.6.6 Imobilização enzimática

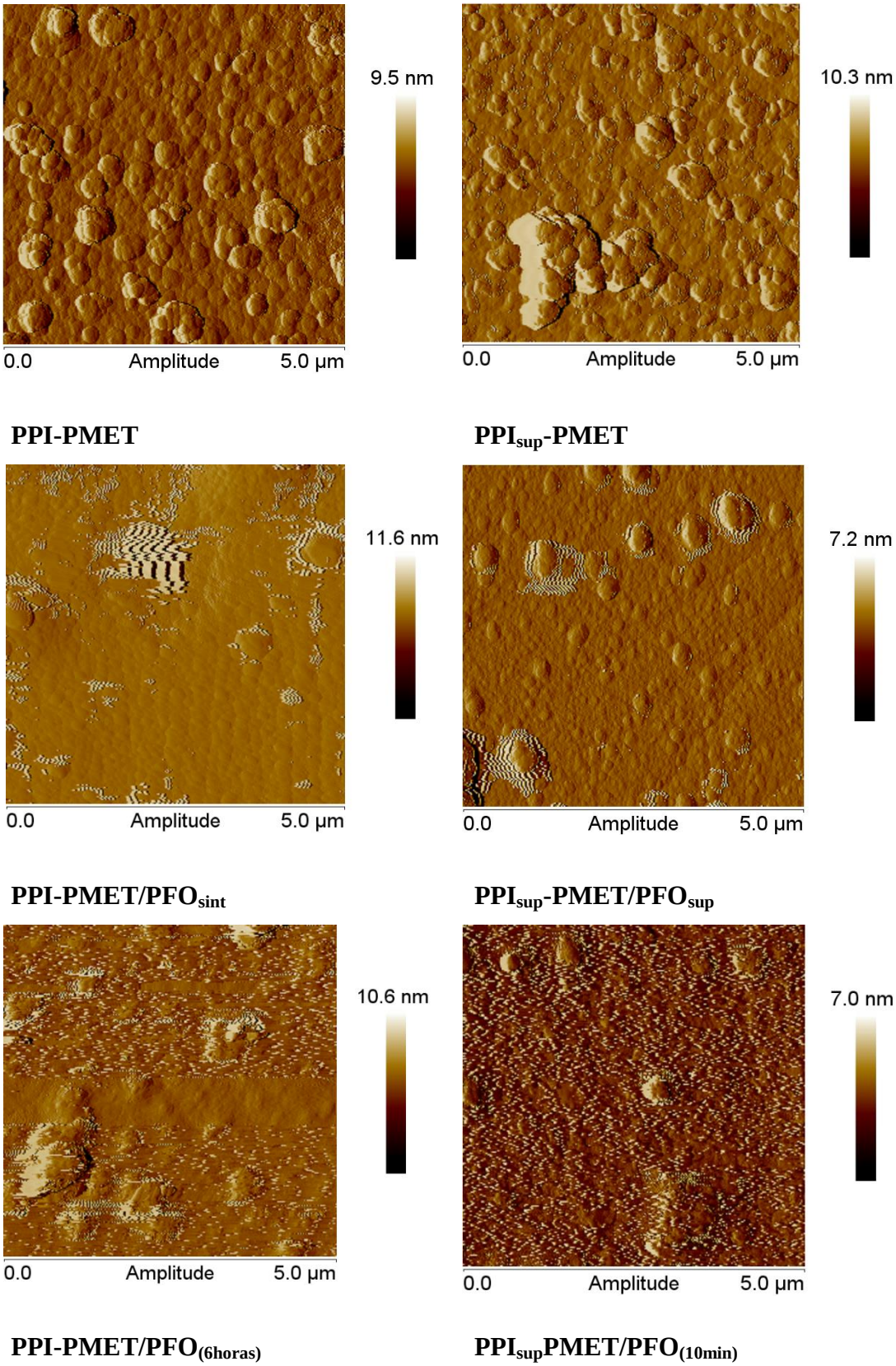
A imobilização da PFO nos filmes de PPI-PMET foi realizada por adsorção física de quatro maneiras distintas. Para os filmes de PPI-PMET que não sofreram superoxidação, realizou-se a imobilização da PFO de duas formas: a enzima foi adicionada à solução de eletropolimerização juntamente com os monômeros (PPI e PMET) e eletrólito suporte, na segunda, a imobilização de PFO ocorreu depois da síntese dos filmes PPI-PMET, sendo estes imersos por tempo determinado em uma solução contendo PFO.

Para os filmes de PPI-3PMET que sofreram tratamento de superoxidação do PPI a imobilização enzimática também foi realizada de duas maneiras: para os filmes de PPI-PMET já sintetizados, precedeu-se com a superoxidação das cadeias do PPI nos filmes com a enzima adicionada à solução eletrolítica, depois, a enzima foi imobilizada após este tratamento, sendo os filmes tratados imersos em uma solução contento PFO por certo tempo.

Diante das diferentes maneiras de imobilização da PFO nos filmes de PPI-PMET superoxidados e não superoxidados estudou-se a morfologia dos filmes por AFM; as imagens obtidas podem ser vistas na Figura 25. Pode-se observar nas imagens uma mudança significativa na morfologia dos filmes PPI-PMET superoxidados e não superoxidados quando a enzima foi imobilizada de maneiras diferentes, confirmando a imobilização da PFO. Os valores de Rms (rugosidade média quadrática) e Ra (rugosidade média aritmética) dos filmes de PPI-PMET superoxidados e não superoxidados com a enzima imobilizada por maneiras diferentes estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de rugosidades dos filmes de PPI-PMET superoxidados e não superoxidados com enzima imobilizada em diferentes maneiras

Tratamento dos filmes	Filmes	Rms (nm)	Ra (nm)
	PPI-PMET	1,23	0,69
Não superoxidados	PPI-PMET/PFO_{sint}	1,15	0,52
	PPI-PMET/$PFO_{(6horas)}$	1,32	0,76
	PPI_{sup}-PMET	1,42	0,80
Superoxidados	PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}	0,80	0,41
	PPI_{sup}PMET/$PFO_{(10min)}$	1,06	0,77



PPI-PMET **PPI_{sup}-PMET**

PPI-PMET/PFO_{sint} **PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}**

PPI-PMET/$PFO_{(6horas)}$ **PPI_{sup}PMET/$PFO_{(10min)}$**

Figura 25. AFM dos filmes de PPI-PMET não superoxidados e superoxidados com PFO imobilizada por maneiras diferentes

Os resultados obtidos mostraram que o filme de PPI-PMET possui uma rugosidade menor do que a que foi encontrada para o filme PPI_{sup}-PMET. Foram observados também núcleos bem pequenos em toda a imagem de AFM no filme PPI_{sup}-PMET que podem estar relacionados à presença de cadeias superoxidadas do PPI. Quando as morfologias dos filmes não superoxidados e superoxidos são analisadas após a imobilização da enzima, verifica-se que, para aos filmes que não foram superoxidados, a rugosidade aumentou quando a enzima foi imobilizada por 6 h em relação ao filme na qual a enzima foi imobilizada durante a síntese. O mesmo efeito foi observado para os filmes superoxidados. Observou-se também que ambos os filmes na presença da PFO e que foram superoxidados apresentaram uma rugosidade menor do que a observada para o filme superoxidado sem a presença de enzima. Já para os filmes que não foram superoxidados, o valor da rugosidade superficial na presença de enzima foi maior quando a enzima foi imobilizada por 6 h depois da síntese, resposta esta diferente à dos filmes que foram superoxidados.

3.6.7 Resposta dos biossensores em função da concentração de catecol.

As respostas eletroquímicas dos filmes de PPI-PMET/PFO com a enzima imobilizada foram obtidas em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1}, tendo os valores de pH, potencial, concentração enzimática e tempo de imobilização da enzima já afixados, pois foram otimizados anteriormente. De acordo com os cronoamperogramas da Figura 26, observa-se que, para todos os filmes, as respostas eletroquímicas mostram um aumento gradual para as mais baixas concentrações adicionadas de catecol.

As respostas amperométricas dos filmes que não foram superoxidados, Figuras 26 (a) e 26 (b), mostram as diferenças no aumento gradual e nos valores da densidade de corrente referentes às adições de catecol. Na Figura 26 (a), pode-se observar um aumento gradual nas respostas de corrente até uma concentração de catecol de 100 μmol L^{-1}, mantendo-se constante para concentrações maiores, o que pode indicar um efeito de saturação pela presença de grandes quantidades de catecol. Já na Figura 26 (b), o aumento da densidade de corrente com o aumento da concentração de catecol não é visível, demonstrando uma rápida saturação do filme.

Analisando as Figuras 26 (c) e 26 (d), referentes às respostas dos filmes que foram

superoxidados, observa-se uma pequena diferença entre as curvas. Houve um aumento na densidade de corrente até uma concentração de catecol de 120 µmol L^{-1}, Figura 26 (c). Na Figura 26 (d) o aumento da densidade de corrente é observado praticamente para todas as adições de catecol, indicando que a saturação ocorreu apenas as mais altas concentrações de catecol.

Outra maneira de obter a resposta dos biossensores em função da concentração de catecol é por titulação. No presenta trabalho, tentamos realizar a resposta dos biossensores por titulação, mas por motivos da sensibilidade dos filmes e da montagem de sistema de medida, a titulação não ocorreu com sucesso.

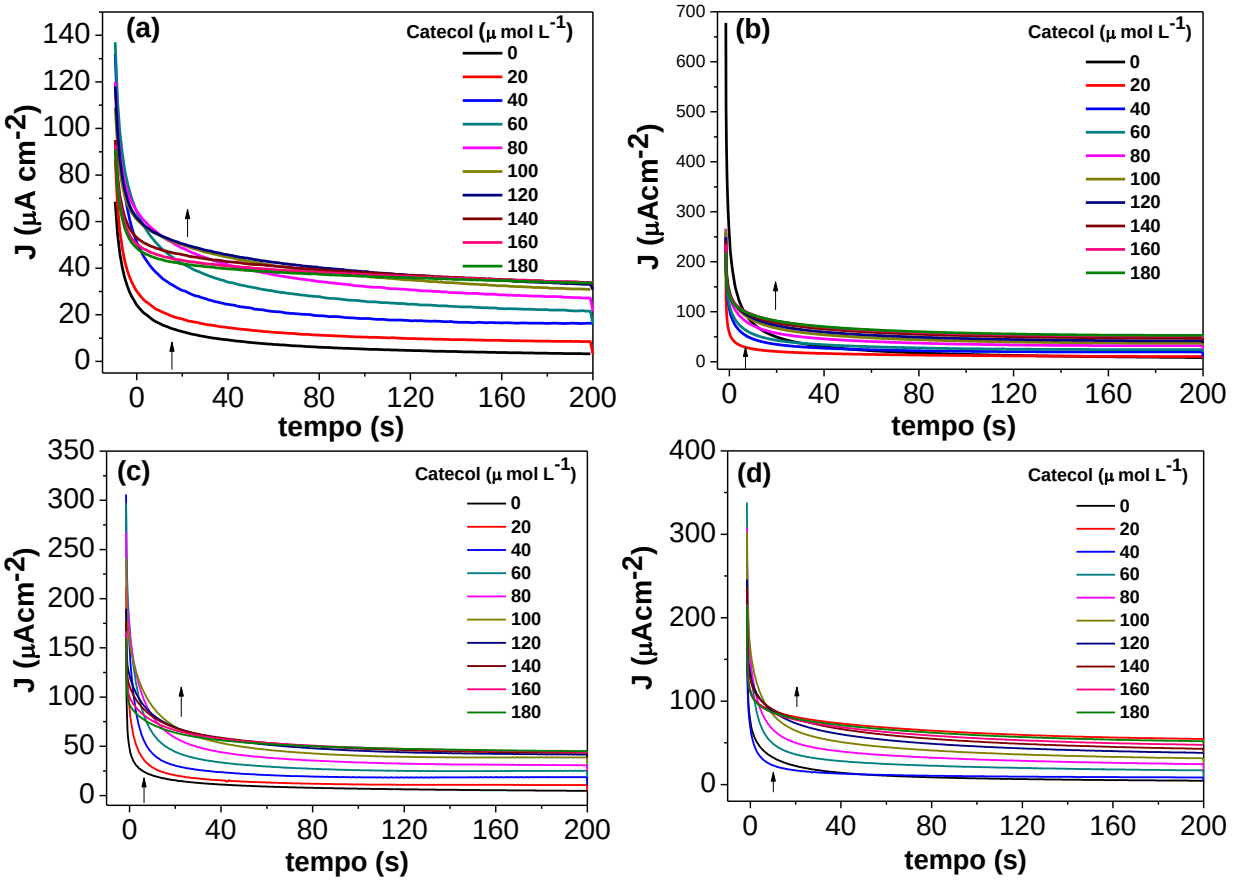


Figura 26. Cronoamperogramas dos filmes (a) PPI-PMET/PFO_{sint}, (b) PPI-PMET/$PFO_{(6horas)}$, (c) PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup} e (d) PPI_{sup}-PMET/$PFO_{(10min)}$ em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em diferentes concentrações de catecol

3.6.8 Curvas analíticas

Depois de escolher as melhores condições de preparo (valores de pH, concentração da enzima, tempo de imobilização da enzima e potencial) para os biossensores estudados no presente trabalho, foi possível se obter as curvas analíticas de corrente *vs* concentração de catecol, que fornecem dados importantes sobre sensibilidade, limite de detecção e intervalo linear das respostas dos biossensores.

A Figura 27 (a), referente ao filme PPI-PMET/PFO_{sint} possui um crescimento gradual da resposta com o aumento da concentração de catecol de 0,0 a 100 μmol L^{-1}, estabilizando para maiores concentrações e o que demonstra que o catecol não deve ter sofrido oxidação às *o*-quinonas partir de uma reação catalisada pela enzima. O limite de detecção obtida por este biossensor foi de 0,14 μmol L^{-1}. Analisando ainda os filmes não superoxidados, mas com a PFO imobilizada por 6 h depois da síntese, Figura 27 (b) pode-se observar que o alcance linear foi maior, entre 0,0 a 160 μmol L^{-1}, iniciando uma resposta mais estável por volta de 180 μmol L^{-1} e que forneceu um valor de limite de detecção de 0,10 μmol L^{-1}.

Analisando as respostas amperométricas dos filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, Figura 27 (c), obteve-se um limite de detecção de 0,11 μmol L^{-1} e um alcance linear de 0,0 a 120 μmol L^{-1}, que permanece constante até 180 μmol L^{-1}. Já para os filmes PPI_{sup}-PMET/$PFO_{(10min)}$, Figura 27 (d), obteve-se um alcance linear entre 0,0-100 μmol L^{-1}, com uma ligeira estabilidade da curva para concentrações maiores. O limite de detecção pra estes filmes foi de 0,13 μmol L^{-1}, um valor um pouco maior do que o encontrado para os filmes PPI_{sup}-PMET/PFO_{sup}, Figura 27 (c).

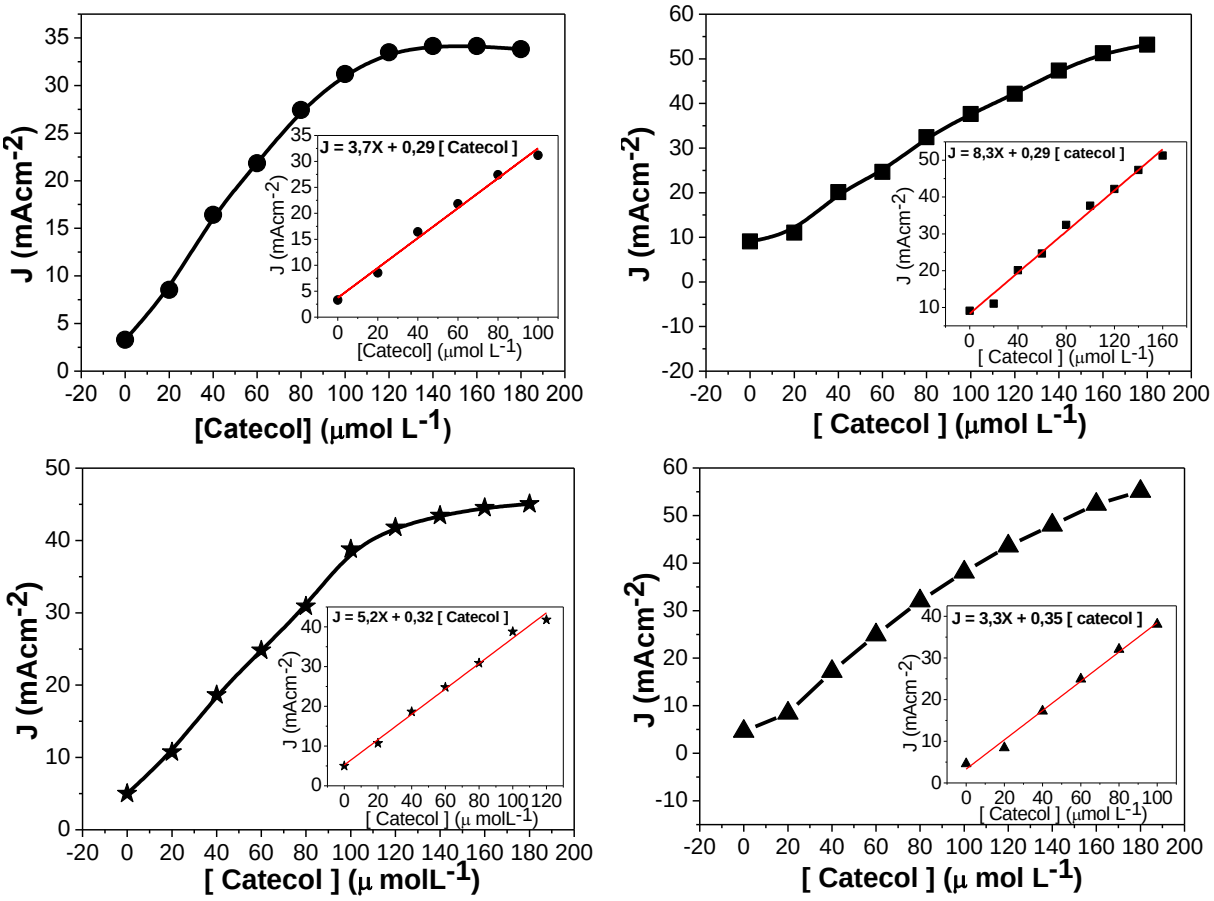


Figura 27. Curvas de calibração dos biossensores amperométricos (a) PPI-PMET/PFO$_{sint}$, (b) PPI-PMET/PFO$_{(6horas)}$, (c) PPI$_{sup}$-PMET/PFO$_{sup}$ e (d) PPI$_{sup}$-PMET/PFO$_{(10min)}$ em função da concentração de catecol

Com o intuito de melhor apresentar os resultados de alcance linear e limite de detecção obtidos a partir das curvas analíticas dos bissensores amperométricos (Figura 27), construiu-se a Tabela 4.

Tabela 4: Características analíticas dos filmes PPI/PMET

Filmes		Alcance linear (μmol L^{-1})	Limite de detecção (μmol L^{-1})
Não superoxidados	**PPI-PMET/PFO$_{sint}$**	0,0—100	0,14
	PPI-PMET/PFO$_{(6horas)}$	0,0—160	0,10
Superoxidados	**PPI$_{sup}$-PMET/PFO$_{sup}$**	0,0—120	0,11
	PPI$_{sup}$-PMET/PFO$_{(10min)}$	0,0—100	0,13

Aumento linear das respostas dos biossensores com a concentração de catecol, observado na Tabela 4, indica que moléculas de catecol não foram oxidadas a *o*-quinonas em uma reação catalisada pela enzima, já que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração de catecol. Foi observado também, que os biossensores apresentaram intervalo de alcance linear alto e limite de detecção baixo se comparados aos valores da literatura, que utilizou o PPI como matriz hospedeira da PFO, sendo que o alcance linear foi entre 10-80 $\mu mol\ L^{-1}$ e limite de detecção 8,3 $\mu mol\ L^{-1}$, RODRIQUES, 2007.

CAPÍTULO 4

4.1 CONCLUSÕES

Foram estudadas várias condições de síntese de uma nova matriz polimérica a partir de pirrol e metiltiofeno. Para este estudo fizeram-se análises comparativas com os homopolímeros e com base nos resultados obtidos pôde-se concluir que se obteve uma nova matriz polimérica com características intermediárias as dos homopolímeros PPI e PMET, sendo o potencial de síntese encontrado de 1,8 V.

Outro estudo realizado neste trabalho mostrou como a forma de imobilizar a PFO nos filmes poliméricos pode influenciar nas características de construção do biossensor e, consequentemente, na sua sensibilidade. Os filmes de PPI-PMET, onde a PFO foi imobilizada na síntese, e depois da síntese por um tempo, na superoxidação e depois da superoxidação por um tempo determinado, mostrando viabilidade para construção de biossensores na análise de compostos fenólicos.

Para a otimização das respostas dos biossensores, vários parâmetros foram estudado: pH, potencial operacional e concentração da enzima a fim de se obter melhores respostas amperométricas na detecção de catedol.

Os filmes que não foram superoxidados apresentaram seguintes respostas: com a enzima imobilizada na síntese, os filmes apresentaram um limite de detecção de 0,14 μmol L^{-1} sendo as respostas obtidas utilizando uma solução tampão fosfato 0,1 μmol L^{-1} com pH 8, 140 Um L^{-1} de enzima, utilizando um potencial de trabalho operacional de 0,3 V. Para os filmes onde a enzima foi imobilizada por 6 h depois da síntese, o limite de detecção foi de 0,10 μmol L^{-1} em uma solução contendo tampão fosfato 0,1 μmol L^{-1} com pH 8,5 e um potencial de trabalho operacional de 0,5 V.

Já para os filmes superoxidados, os resultados obtidos foram: com a enzima imobilizada no momento da superoxidação os filmes apresentaram um limite de detecção de 0,11 μmol L^{-1} em solução tampão fosfato 0,1 μmol L^{-1} em pH 7,5, 120 Um L^{-1} de enzima, utilizando um potencial operacional de 0,5 V. Os filmes onde a enzima foi imobilizada por 10 min depois da superoxidação, obteve-se limite de detecção de 0,13 μmol L^{-1} em uma solução contendo tampão fosfato 0,1 μmol L^{-1} com pH 8,5 e um potencial de trabalho operacional de

0,5 V.

Portanto, pode-se concluir que o tratamento de superoxidação dos filmes PPI-PMET é viável para favorecer a imobilização da PFO, mais também é não tão eficiente se são comparados aos filmes que não foram superoxidados. Contudo, os quatros biossensores estudados no presente trabalho mostraram grande sensibilidade ao catecol, uma vez que apresentaram um limite de detecção bem baixo.

REFERÊNCIAS

ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T.A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v.25, n.5, p.835-841, 2008.

ANDREESCU, S. et al. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solventes. **Talanta,** v.57, n.1, p.169-176, Apr. 2002.

ARSLAN, A. et al. Imobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.35, n.1, p.163-167, 2005.

BARSAN, M. M.; BRETT, C. M. A. A new modified conducting carbon composite electrode as sensor for ascorbate and biosensor for glucose. **Bioeletrochemistry**, v.76, n.1-2, p.135-140, 2009.

BARSCH, U.; BECK, F. Anodic overoxidation of polythiophenes in wet acetonitrile electrolytes. **Electrochimica Acta**, v.41, n.11/12, p.1761-1771, 1996.

BAZZAOUI, E.L.A.; AEIYACH, S.; LACAZE, P.C. Low potential electropolymerization of thiopheno in aqueous perchloric acid. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v.364, p.63-69, 1994.

BLUM, L. J.; COULET, P. R. **Biosensor Principles and Applications**, Marcel Dekker: New York, 1991.

BÖYÜKBAYRAM, A.E. et al. Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine. **Bioeletrochemistry**, v.69, n.2, p.164-171, Oct. 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do meio Ambiente. (2005). Resolução n° 357, de 17 de março de 2005. Dispões sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

BRUNETTI, J. L.; FARIA-OLIVEIRA, O. M. M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase E.C.:1.11.1.7 e suas aplicações em análise clínicas. **Rev. Ciênc. Farm**. v.15, p.49-52, 1981.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Lippincott's illustrated reviews**: biochemistry. Philadelpia: J.B. Lippincott, 1994.

CONROY, P. J.; HEARTY, S. et al. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.20, n.1, p.10-26, 2009.

COSNIER, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films: a review. **Biosensors & Bioelectronics**, v.14, n.5, p.443-456, May 1999.

CREMER, M. Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von Polyphasischen Elektrolytketten. **Z. Biol**., v.47, p.56, 1906.

DE LA GUARDIA, M. Biochemical sensors. **Microchimica Acta**, v.120, p.243- 255,1995.

DECKER, H.; TUCZEK, F. Tyrosinase/ catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, n.8, p.392-397, Aug. 2000.

DENARO, A.R. **Fundamentos de eletroquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1974. v.1.

DESHPANDE, M.V.; AMALNERKAR, D.P. Biosensor prepared from electrochemically-synthesized conducting polymers. **Progress in Polymer Science**, v.18, n.4, p.623-649, 1993.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue a nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.614, p.149–156, 2008.

DURAN, N.; ROSA, M. A.; D' ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phonoloxidases) immobilized on different supports: A Review. **Enzyme and Microbial Technology,** v. 31, p.907-931, 2002.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v.15, p.28-39, 1992.

FATIBELLO-FILHO, O.; CRUZ, V.I. Uso analítico de tecidos e extratos brutos vegetais como fontes enzimáticas. **Química Nova**, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

FENOLL, L.G. et al. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinone. **Biochimica et Biophysica Acta**: protein surfasse and molecular enzymology, v.1548, n.1, p.1-22, 2001.

FERNANDES, J. C. B.; KUBOTA, L. T. Electrodos ions-seletivos: Histório, mecanismo de resposta, seletividade e revisão dos conceitos. **Química Nova**, v.24, p.120 – 130, 2001.

FERREIRA, A.R.E. **Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação como biossensores amperométricos na análise de compostos fenólicos**. 2007. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

FIORENTINO, D. et al. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor for o-diphenols. **Biosensors and Bioelectronics**, v.25, n.9, p.2033-2037, May 2010.

FOSCHINI, M. **Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

GE, H. et al. Study of oveoxidized polypyrrole using X-ray photoelectron spectroscopy. **Polymer**, v.35, n.3, p.504-508, 1994.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B.D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v.17, n.5, p.345-359, May 2002.

GERDEMANN, C.; EICKEN, B.; KREBS, B. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. **Acc. Chem. Res**. v. 35, p.183-191, 2002.

GIACOMINI, T.M.; TICIANELLI, A.E. Influência da acidez do meio sobre a síntese e o comportamento redox do polipirrol. **Química Nova**, v.22, n.5, p.639-644, 1999.

GIL, E.S.; KUBOTA, L.T.; YAMAMOTO, Y.I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados a

química analítica. **Química Nova**, v.22, n.6, p.874-881, 1999.

GREEF, R. et al. **Instrumental methods in electrochemistry**. New York: John Wiley, 1985.

GUI, F. et al. Inactivation of polyphenol oxidases in cloudy apple juice exposed to supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1678-1685, 2007.

HABER, F.; KLEMENSIEWICZ, Z. Über elektrische Phasengrenzkräft. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v.28, p. 385, 1909.

JANATA, J. et al. Chemical sensors. **Analytical Chemistry**, v.70, n.12, p.179-208, May 1998.

KARUBE, I. In: SYDENHAM, P.H.; THOM, R. (Ed.). **Handbook of measurement science**. Chichester: John Wiley.

KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes. **International Journal of Biological Macromolecules** v. 33, n. 1/3, p.37-41, Nov. 2003.

KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAGGI, Y. Determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes fabricated by immobilization of polyfenol oxidase in conducting copolymer. **Designer Monomers and Polymer**, v.7, n.1/2, p.3-10, 2004.

KLIBANOV, A.M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v.93, p.1-25, 1979.

KUWAHARA, T. et al. Glucose sensing with glucose oxidase immobilized covalently on the films of thiophene copolymers. **Synthetic Metals**, v.152, n.1/3, p.29-32, Sept. 2005.

LACROIX, J.C. et al. Modeling the growth and molecular structure of electrically conducting polymers: application to polypyrrole. **Chemistry – a european journal**, v.4, n.9, p.1667-1677, 1998.

LEHNINGER, A.L. **Principios de bioquímica**. 5.ed. São Paulo: Sarvier,1989. Cap.9.

LI, Y.; QIAN, R. Electrochemical overoxidation of conducting polypyrrole nitrate film in aqueous solutions. **Electrochimica Acta**, v.45, n.11, p.1727-1731, Feb. 1999.

LIN, T.; HUANG, K.; LIU, C. Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor based on localized surface plasmon resonance. **Biosensors & Bioelectronics**, v.22, n.4, p.513-518, Oct. 2006.

LIU, X. et al. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (Bet vulgaris L.) extract with high pressure carbon dioxide. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.1, p.24-31, Jan. 2008.

LUONG, J. H. T; MALE, K.B. et al. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v.26, n.5, p. 492-500. 2008.

LUPETTI, K.O.; RAMOS, L.A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistemas de análise por injeção de fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**, v.26, n.2, p.197-201, 2003.

MANAHAN, S.E. **Environmental chemistry**. 6thed. Boca Raton: Lewis, 1994.

MARQUES, P.R.B.O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1791-1799, 2008.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M.L. Kinetics of invertase action. **Biochemische Zeitschrift**, v.49, p.333-369, 1913.

MULCHANDANI, A.; BASSI, A.S. Principles and applications of biosensors for bioprocess monitoring and control. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.15, n.2, p.105-121, 1995.

MURRAY, R.K. et al. **Harper's illustrated biochemistry**. New York: McGraw-Hill, 2003.

NERNST, W,; LOEB, K. Z. Zur kinetic de in lösung betindichen körper. Zwetitc abhandlung überführungszahlen und leitvermögen einiger silbersalze. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v.2, p.948 – 963, 1888.

NERNST, W.; GLEICHGEWICHT, U. C. Elektromotorische Wirksamkeit und Elektrolytisch Abscheidung von Metallgemischen. **Zeitschrift für Physikalische chemie**, v.22, p.539 – 542, 1897.

OLIVEIRA, I. R.W. Z. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomimétricos para determinação de compostos fenólicos**. 2007. 174p. (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

OLIVEIRA, I.R.W.Z.; VIEIRA, I.C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v.29, n.5, p.932-939, 2006.

PASSOS, C.T. **Estudo da biodegradação do fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp**. 2006. 84p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

PATACAS, R.C. **Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 139 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, 2007.

PEREIRA DA SILVA, M.A.; BALOGH, D.T.; FARIA, R.M. Morfological characterization of polyaniline films by atomic force microscopy. **Acta Microscopica**, v.8, supplement A, p.281, 1999.

PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; BALOGH, D. T.; FARIA, R. M. Caracterização de depósito de polianilina por centrifugação (spin coating) usando microscopia de força atômica. In: ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MADEIRA CONDENSADA, 23., 2000, São Lourença. **Livro de resumos...** [S.l.:s.n.], 2000. P.389.

RETAMA, B.J. et al. Biosensors based on acrilic microgels: a comparative study of immobilized glucose oxidase and tirosinase. **Biosensenso and Bioelectronics**, v.20, n.11, p.2268-1175, May 2005.

RODRIGUES, C.V. **Influência do contra-íon na eletrossíntese do polipirrol em sua resposta como biossensor eletroquímico após imobilização da polifenol oxidase**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

RONCALI, J. et al. Poly mono, - bi and trithiophene: effect of oligomer chain-length on the polymer properties. **Synthetic Metals**, v.15, n.4, p.323-331, Sept. 1986.

RONCALI, J.; GARREU, R.; YASSAR, A.; MARQUE, P.; GARNIER, F.; LEMAIRE, M.

Effects of steric factors on the electrosynthesis and properties of conducting poly (3-alkylthiophenes). **Journal of Physical Chemistry**, v.91, n.27, p.6706-6714, Dec. 1987.

ROSATTO, S.S. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada**. 2000. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostra de interesse ambiental. **Química Nova**, v.24, n.1, p.77-86, 2001.

RUEDA, M. et al. Soft calibration in flow system with electrochemical detection: application to the determination of phenolic compounds. **Analytical Chimica Acta**, v.446, n.1/2, p.267-277, Nov. 2001.

SALGADO, A.M. **Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SANTOS DE ARAUJO, B. et al. Uptake and transformation of phenol and chlorophenols by hairy root cultures of *Daucus carota*, *Ipomoea batatas* and *Solanum aviculare*. **Chemosphere**, v.63, n.4, p.642-651, Apr. 2006.

SATO, M.; SUSUMO, T.; KAERIYAMA, K. Electrochemical preparation of conducting poly(3-methylthiophene): comparison with polythiophene and poly (3- ethylthiophene). **Synthetc Metals**, v.14, n.4, p.279-288, May 1986.

SCOUTEN, W.H.; LUONG, J.H.T.; BROWN, S. Enzyme or protein immobilization techiniques for application in biosensor design. **Trends in Biotechnology**, v.13, n.5, p.178-185, 1995.

SHAN, D. et al. A Highly reversible and sensitive tyrosinase inhibition-based amperometric biosensor for benzoic acid monitoring. **Sensors and Actuators B**: chemical, v.134, n.2, p.1016-1021, Sept. 2008.

SHIMOMURA, M. et al. Covalent immobilization of glucose oxidase on film prepared by electrochemical copolymerization of thiophene-3-acetic acid and 3-methylthiophene for glucose sensing. **Polymer**, v.39, n.11, p.2079-2082, 1998.

SILVA, C.M.L. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e ureia com**

foco na aplicação ambiental. 2011. 154 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de janeiro, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. v.6.

SKOOG, D.A. **Princípios de análise instrumental**. 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SMITH, B.C. **Infrared spectral interpretation**: a systematic approach. New York: CRC Press, 1998.

STEFANAC, Z.; SIMON, W. Ion specific electrochemical behavior of macrotretolides in menbranes. **Microchemical journal**, v.12, p.125 – 132 1967.

SUMMER, J.B.; MYRBÃCK, K. **The Enzymes-chemistry and mechanism action**. New York: Academic, 1951. v.3, Cap.57.

SVITEL, J.; MIERTUS, S. Development of tyrosinase-base biosensor and its applications for monitoring of bioremediation of phenol and phenolic compounds. **Environmental Science and Technolology**, v.32, n.6, p.828-832, Mar. 1998.

SYNG-YING, F.; SHI-HUI, S.; DE-HONG, Z. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-m-aminophenol film. **Talanta**, v.51, n.1, p.151-158, Jan. 2000.

THÉVENOT R, D.R. et al. Electrochemical biosensors:recommended definitions and classification. **Pure & Applied Chemistry**, v.71, n.12, p.2333-2348, 1999.

THÉVENOT R. D.; TOTH, R. A.; DURST, G.; WILSON, S. Eletrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, n.1/2, p.121-131, Jan. 2001.

TOPÇU, S.; SEZGINTÜRK, M.K.; DINÇKAYA, E. Evaluations of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. **Biosensors and Bioelectronics**, v.20, n.3, p.592-597, Oct. 2004.

TOURILLON, G. Polythiophene and its derivatives. In: SKOTHEM, T.A. **Handbook of**

conducting polymers. New York: M.Dekker, 1986. v.1, p.293-350.

TÜRKARSLAN, Ö; KAYAHAN, S. K. et al. A new amperometric cholesterol biosensor based on poly(3,4-ethylenedioxypyrrole). **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.136, n.2, p.484-488, 2009.

UMAÑA, M.; WALLER, J. Protein-modified electrodes. The Glucose oxidase/polypirrole syste. **Analytical Chemistry**, v.58, n.4, p.2979-2983, 1986.

VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Flow injection spectrophotometric determination of total phenols using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L) Lam.) as enzymatic source. **Analytica Chimica Acta**, v.366, n.1/3, p.111-118, June 1998.

VIEIRA, S. B. **Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de hepatopatitas**. 2007. 62 p. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

VIEIRA, S.N. **Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção de hepatopatias**. 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

VINCENT, G.; ANGELETTI, G.; BJORSETH, A. **In Organic micropollutants in the aquatic environmental**. Dordrecht: Klumer, 1991.

WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.19, n.1-2, p.47-53, 1999.

YANG, Y. et al. An Amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cystiamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators**: chemical, v.102, n.1, p.162-168, Sept. 2004.