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

Valquiria da Cruz Rodrigues Barioto

**Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e
polifenol oxidase e aplicados como biossensores**

São Carlos

2014

VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES BARIOTO

Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores

Versão Corrigida

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Débora Gonçalves

São Carlos

2014

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.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

BARIOTO Valquiria

B252f Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores / Valquiria da Cruz Rodrigues Barioto; orientadora Débora Gonçalves. São Carlos, 2014.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência 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, 2014.

**1. polipirrol. 2. Polifenol oxidase. 3. Fitase.
4. imobilização enzimática. 5. Palavra-chave. 6. lipossomo. I. Título.**

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel **VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES BARIOTO**.

Título da tese: "Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores".

Data da defesa: 17/03/2014.

Comissão Julgadora:

Resultado: APROVADA

Profa. Dra. **Debora Gonçalves (Orientadora)**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADA

Dra. **Ana Rita de Araújo Nogueira**
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)

APROVADA

Profa. Dra. **Maria Del Pilar Taboada Sotomayor**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-Araraquara)

APROVADA

Profa. Dra. **Marystela Ferreira**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar-Campus Sorocaba)

APROVADA

Dra. **Débora Terezia Balogh**
(Instituto de Física de São Carlos/IFSC)

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Waldek Wladimir Bose Filho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Denis Vinicius Coury**

Dedicatória

Aos meus pais Valdomiro e Geracy pelo amor, carinho e por me ensinar sempre o caminho certo.

Ao meu marido Victor Luiz pelo amor, paciência e incentivo durante todos os momentos deste trabalho.

Ao meu filho Victor que me ensinou o amor incondicional.

Agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Débora Gonçalves, pela orientação e apoio durante todos estes anos.

À Profa. Dra. Marli Leite de Moraes, pela grande amizade sincera, paciência em compartilhar seus conhecimentos e apoio profissional que foi muito importante para minha formação.

À Dra. Juliana Coatrini Soares, pela colaboração, discussões, dedicação e amizade.

Aos meus irmãos, cunhados(as), sobrinhos(as), sogra, sogro, tias e madrinhas por estarem sempre ao meu lado compartilhando momentos de alegria e descontração.

Aos amigos de sala: Adriana, Analine, Andrey, Rafaela, Juliana, Josiane, Leonardo, Livia, Vananélia, Washington, Yurica e aos demais do grupo de polímeros por compartilharem momentos de alegria.

Aos funcionários do grupo de polímeros: Ademir, Berto, Débora Balogh, Felipe, Níbio, Rosangela e Simone pela amizade e apoio técnico.

Aos órgãos de financiamento: CNPq, Capes e Fapesp.

A todos aqueles que de alguma forma tiveram colaboração direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Resumo

Rodrigues, V. C. **Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização das enzimas fitase e polifenol oxidase e aplicados como biossensores.**

Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados na imobilização de duas enzimas diferentes em filmes de polipirrol (PPI) eletrodepositados, a fitase e a polifenol oxidase (PFO), esta última na forma de extrato bruto do fruto de abacate. Como a fitase hidrolisa cataliticamente ácido fítico (AF) em íons fosfatos, foram preparados biossensores por imobilização da enzima sobre filmes de PPI para a detecção indireta de ácido fítico via íons fosfatos. Foram utilizados dois métodos de imobilização; no primeiro, a enzima, fitase, foi imobilizada ao filme de PPI por imersão do filme em uma solução contendo a enzima por um período de 2 h, no segundo, a fitase foi encapsulada em lipossomos de dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e depois foi imobilizada nos filmes de PPI depositados em eletrodos impressos. O segundo método se mostrou melhor para a detecção de ácido fítico, pois levou a um maior alcance linear e um baixo valor de limite de detecção. Neste caso, verificou-se que o DPPG preservou a integridade enzimática e levou a biossensores mais estáveis e sensíveis. Já para a PFO, que catalisa a oxidação de compostos fenólicos a quinonas, foram preparados biossensores para a detecção indireta de catecol. Para esta enzima, foram utilizados três métodos de imobilização: adsorção, ligação cruzada e confinamento, sendo o último que levou a melhores respostas. O método de confinamento consiste na adição da enzima, juntamente com o monômero, à solução de eletropolimerização, quando se procede com a metodologia normal de preparo dos filmes de PPI, que foram caracterizados por: microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS). Estas técnicas de caracterização permitiram com que a presença da enzima fosse associada às modificações das características estruturais e morfológicas dos filmes de PPI.

Palavras chaves: polipirrol, polifenol oxidase, fitase, biossensor, imobilização enzimática, lipossomo.

Abstract

Rodrigues, V. C. **Polypyrrole films as matrices for the immobilization of phytase and polyphenol oxidase enzymes and applied as biosensors.** Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

This doctoral thesis reports on the development of electrochemical biosensors based on the immobilization of enzymes phytase and polyphenol oxidase (PPO) (the latter in the form of crude extract of avocado fruit) on electrodeposited polypyrrole films (PPY). As phytase catalytically hydrolyzes phytic acid (PA) in phosphate ions, biosensors were prepared by its immobilization on PPY films for the indirect detection of PA via phosphate ions. In the first method the enzyme was maintained on the PPY film for a period of 2 h, whereas in the second, it was encapsulated in Dipalmitoyl Phosphatidyl glycerol (DPPG) and immobilized on printed electrodes. The second system proved more viable for the detection of PA and showed broader linear range and low detection limit because DPPG preserved the integrity of the enzyme and produced more stable and sensitive biosensors. Regarding PPO, which catalyzes the oxidation of phenolic compounds to quinones, biosensors for the indirect detection of catechol via the formation of quinone in solution were prepared. Three methods of immobilization were used: adsorption, cross-linking and confinement. The latter yielded favorable results in comparison to other methods. The films were characterized by atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM) spectroscopy, fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and reflection absorption and infrared polarization modulation (PM-IRRAS) techniques and revealed the presence of the enzyme and a modification in the structural characteristics and morphology of the films.

Keywords: polypyrrole, polyphenol oxidase, phytase, biosensor, enzyme immobilization, liposome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Princípio de funcionamento de um biossensor.....	28
Figura 2 - Esquema de transferência de elétrons em um biossensor amperométrico. Uma enzima catalisa uma reação redox de um analito específico, o que resulta na redução do polímero condutor (transdutor) e medição de corrente.....	29
Figura 3 - Esquema representativo das gerações de biossensores: A- primeira geração, B- segunda geração e C- terceira geração.....	31
Figura 4 - Modelo esquemático do sítio ativo da PFO.....	32
Figura 5 - Ciclo catalítico para a oxidação da PFO de monofenóis difenóis para o-quinona em presença de oxigênio.....	33
Figura 6 - Reação catalítica da PFO com catecol produzindo o-quinona.....	34
Figura 7 - Reação catalítica da fitase com o ácido fítico produzindo inositol e íons fosfatos.....	36
Figura 8 - Primeira etapa da eletropolimerização do pirrol.	38
Figura 9 - Esquema representativo de imobilização enzimática.....	40
Figura 10 - Lipossomo: a) representação esquemática, b) estrutura química	42
Figura 11 - Aplicações tecnológicas dos polímeros condutores	44
Figura 12 - Estruturas de alguns polímeros condutores	45

Figura 13 - Esquema representativo do desenvolvimento de biossensores baseado em diferentes técnicas de polimerização do pirrol.	46
Figura 14 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.	48
Figura 15 - Mecanismo de reação proposto para o processo de eletropolimerização do pirrol.....	49
Figura 16 - Diagrama esquemático de um microscópio de força atômica	52
Figura 17 - Esquema representativo da coluna de microscópio eletrônico de varredura.	53
Figura 18 - Tipos de vibrações moleculares observadas pelo FTIR	54
Figura 19 - Perturbação imposta pela técnica de voltametria cíclica e o voltamograma obtido.	57
Figura 20 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.	60
Figura 21 - A) Micropotenciostato, B) eletrodos utilizados para o preparo dos filmes: a) com o filme, b) sem o filme de PPI.	60
Figura 22 - Esquema representativo da fabricação do lipossomo e encapsulamento da enzima.	62
Figura 23 —Proposta para esquema de imobilização por confinamento da PFO sobre o filme de PPI.	64
Figura 24 -Esquema de imobilização por adsorção da PFO sobre o filme de PPI....	65
Figura 25 – a) Estrutura do glutaraldeído e b) esquema de imobilização por ligação cruzada da PFO sobre o filme de PPI.....	65
Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de Pt durante a síntese dos	

filmes de PPI em uma solução aquosa contendo $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ pirrol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl.70

Figura 27- Otimização do tempo de imobilização da Fitase na superfície do PPI, para cada curva foi utilizado uma solução de 2 mmol L^{-1} de AF em $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de tampão acetato pH 5,5. Detalhe: máximo de densidade de corrente referente a cada tempo de imobilização.....71

Figura 28- Respostas eletroquímicas dos filmes de PPI (---) e PPI/Fitase (---) em uma solução tampão acetato, pH = 5,5.....72

Figura 29- Espectros de FTIR dos filmes de PPI e PPI/Fitase eletrossintetizados sobre eletrodos de Pt.73

Figura 30 - Imagens de MEV dos filmes PPI e PPI/Fitase com aumento de 10.000 vezes.....74

Figura 31—Imagens de AFM dos filmes: a) PPI e b) PPI/Fitase.....75

Figura 32 Variação da densidade de corrente para o filme de PPI/Fitase em função da concentração de AF.76

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do filme de PPI/Fitase em tampão acetato (pH 5,5) em presença de ácido fítico ($0,0-3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Detalhe: Densidade de corrente em função da concentração de AF em um potencial fixo de 0,0 V.....77

Figura 34 - Resposta amperométrica do filme PPI/Fitase em 0,0 V em função da concentração de AF em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,5.....78

Figura 35 – Curvas amperométricas dos filmes PPI e PPI/Fitase em tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 5,5 e 0,0 V; cada seta indica a adição de 50 μL de inositol e íons fosfato.79

Figura 36 - Esquema representativo da Fitase encapsulada em lipossomo e

imobilizada em filmes de PPI..... 80

Figura 37 - Resposta eletroquímica dos filmes PPI, PPI/Fitase e PPI/Fitase/DPPG em solução aquosa contendo tampão acetato pH = 5,5. 81

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos dos filmes PPI, PPI/DPPG, PPI/DPPG/Fitase e PPI/Fitase, no intervalo de potencial entre -0,6 V e 0,6V vs. ECS em solução de tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, com a variação de AF entre 0,0 a 2,0 mmol L⁻¹. 82

Figura 39 – Valores de corrente em função da concentração de AF a um potencial fixo de -0,4 V. 83

Figura 40 - Espectros de PM-IRRAS na região de 3000 a 2500 cm⁻¹ dos filmes de PPI antes e após modificação. 84

Figura 41 - Espectros de PM-IRRAS na região de 1900 a 1400 cm⁻¹ dos filmes de PPI antes e após modificação. 85

Figura 42 - Espectros de PM-IRRAS dos filmes de PPI, PPI/Fitase/DPPG e PPI/Fitase na região de 1350 a 1100 cm⁻¹. 86

Figura 43 - Imagens de MEV dos filmes: a) PPI, b) PPI/Fitase, c) PPI/DPPG e d) PPI/DPPG/Fitase, com aumento de 10.000 vezes. 87

Figura 44 - Respostas amperométricas obtidas a 0,0 V em 2 mL de tampão acetato, pH 5,5, para os filmes: a) PPI/Fitase e b) PPI/Fitase/DPPG. Cada aumento de corrente corresponde a adições de 5 µL de AF 0,1 mol L⁻¹. 88

Figura 45 - Curvas analíticas mostrando a variação de corrente em função da concentração de ácido fítico dos biossensores: a) PPI/DPPG/Fitase e b) PPI/Fitase 89

Figura 49 - Curva analítica obtida para a escolha da melhor porcentagem em volume de Glu-PFO no preparo dos filmes PPI/PFO/Glu. 94

Figura 50 - Respostas eletroquímicas dos filmes PPI, PPI/PFO, PPI/PFO _{conf} , PPI/PFO _{ads} e PPI/PFO/Glu em uma solução aquosa contendo tampão fosfato pH = 6,5.	95
Figura 51 - Microscopia eletrônica de varredura para os filmes: a) PPI, b) PPI/PFO _{conf} , c) PPI/PFO _{ads} e d) PPI/PFO/Glu.	96
Figura 52 - a) AFM para os filmes PPI, PPI/PFO e b) perfil da altura ao longo dos pontos.	98
Figura 53 - Gráfico comparativo dos valores de rugosidades.....	98
Figura 54 - Reação catalítica do sítio ativo da PFO com catecol.	99
Figura 55 - Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO _{ads} . Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2 V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5; cada curva corresponde a 100 µL de catecol 0,01 mol L ⁻¹	100
Figura 56 – Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO/Glu. Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2 V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5; cada curva corresponde a 100 µL de catecol 0,01 mol L ⁻¹	101
Figura 57 - Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO _{conf} . Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5, para o biossensor PPI/PFO _{conf} . Cada curva corresponde a 100 µL de catecol 0,01 molL ⁻¹	102
Figura 58 – Detecção de composto fenólico em amostras de 100 g de morango solubilizado em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato pH 6,5. Cada ponto da curva representa a cronoamperometria de 100 mL a 1000 mL de solução de morango. .	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização	41
Tabela 2 Comparação dos métodos de polimerização de um polímero condutor.	47
Tabela 3 -Comparação das características de biossensores para detecção de AF. LD = limite de detecção; FL = faixa linear de concentrações.	90
Tabela 4- Valores de limite de detecção para o catecol; enzima: PFO.	103
Tabela 5 - Valores comparativos de K_m para a PFO.	104

LISTA DE ABREVIACÕES

ER: Eletrodo de referência

CR: Contra eletrodo

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

PFO – Polifenol oxidase

AF – Ácido fítico

Pt – Platina

PM-IRRAS – Espectroscopia de reflexão e absorção no Infravermelho com modulação da polarização

PPI – Polipirrol

AFM – Espectroscopia de força atômica

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

FTIR – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

E_i – Potencial inicial

E_f – Potencial final

E_{max} – Potencial máximo

DPPG – Dipalmitoil fosfatidil glicerol

RPM – Rotações por minuto

UA – Unidade de atividade

K_m – Constante de Michaelis Menten

LD - Limite de detecção

AC – Ácido fítico

PPI/fitase – Filme de polipirrol com a enzima fitase imobilizada

PPI/DPPG/fitase – filme de polipirrol com a fitase encapsulada em DPPG imobilizada

PPI/DPPG – Filme de polipirrol com DPPG imobilizado

PPI/PFO_{conf} – Filme de polipirrol com a enzima polifenol oxidase imobilizada pelo método de confinamento.

PPI/PFO_{ads} - Filme de polipirrol com a enzima polifenol oxidase imobilizada pelo método de adsorção

PPI/PFO/Glu - Filme de polipirrol com a enzima polifenol oxidase imobilizada pelo método de ligação cruzada

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS	25
Capítulo 1.....	27
Fundamentação teórica	27
1.1 Biossensores.....	27
1.2 - Enzimas	31
1.2.1 Polifenol oxidase	31
1.2.2 – Fitase	35
1.3 - Imobilização enzimática	37
1.4 - POLÍMEROS CONDUTORES	43
1.4.1 - Síntese de polímeros condutores.....	46
1.4.2 - Polipirrol (PPI)	48
Capítulo 2.....	51
Técnicas de caracterização	51
2.1- Microscopia de força atômica	51
2.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	52
2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	53
2.4 Espectroscopia de reflexão e absorção no Infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)	54
2.5 Técnicas eletroquímicas	56
2.5.1 Voltametria cíclica	56
CAPÍTULO 3	59
PARTE EXPERIMENTAL	59
3.1 - Reagentes e soluções	59
3.2 -Eletropolimerização do pirrol	59
3.3 - Imobilização da fitase e detecção de ácido fítico em eletrodos contendo PPI	61
3.4 Encapsulamento da fitase em DPPG	61
3.5 Extração do extrato bruto de polifenol oxidase.....	63
3.6 Imobilização da polifenol oxidase	64
3.7 - Caracterização dos filmes	66
CAPÍTULO 4	69

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Preparo dos filmes de polipirrol	69
4.2 Detecção de ácido fítico após a imobilização da fitase nos filmes de PPI por adsorção física.....	70
4.3 - Fitase encapsulada em lipossomos e imobilizada em eletrodos impressos para detecção de ácido fítico.....	79
Conclusões parciais.....	91
CAPÍTULO 5.....	93
Imobilização da polifenol oxidase (PFO) em filmes de polipirrol (PPI)	93
Conclusões parciais.....	106
CONCLUSÕES FINAIS	107
REFERÊNCIAS	109

APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS

Com o aumento da produção e utilização de produtos químicos nesta última década, os contaminantes aquáticos passaram a causar maiores problemas de poluição ambiental, contaminando solos e águas. Atualmente, a preservação do meio ambiente é uma preocupação em praticamente todo o mundo.

Desta maneira, há um grande interesse no monitoramento da concentração destes contaminantes em águas de efluentes industriais. Atualmente, estes contaminantes são detectados por meio de técnicas espectroscópicas (Guan *et al.*, 2013) tal como por cromatografia líquida (Caldas *et al.*, 2011), no entanto, tais técnicas demandam tempo, equipe especializada e, muitas vezes, equipamentos de alto custo.

Assim sendo, o grande foco deste trabalho foi o desenvolvimento de biossensores para a detecção de ácido fítico e catecol, pois estes compostos em altas concentrações são conhecidos como contaminantes aquáticos, causam crescimentos descontrolados de algas, mau odor, morte de peixes e malefícios a saúde. Os biossensores, em sua maioria, são sistemas que permitem a detecção de diferentes analitos de maneira rápida, eficiente e de baixo custo.

Além do uso da fitase obtida comercialmente, outro grande desafio foi a extração da polifenol oxidase (PFO) do fruto abacate e uso em biossensores para a detecção de catecol. O intuito foi reduzir o custo de fabricação, mas verificando se foi possível manter as propriedades dos biossensores construídos a partir da enzima purificada. Além disto, o abacate é um fruto muito fácil de ser encontrado em nosso país.

O texto está dividido nos seguintes capítulos: Capítulo 1, que apresenta os principais conceitos teóricos e aplicações de polímeros condutores na área de biossensores; Capítulo 2, que descreve as técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho; Capítulo 3, onde estão descritos os procedimentos experimentais utilizados para o desenvolvimento dos biossensores; Capítulo 4, onde estão descritos os resultados obtidos para o biossensor na detecção de ácido fítico, incluindo a imobilização da enzima encapsulada em lipossomos; Capítulo 5, que apresenta os resultados dos biossensores para detecção de compostos fenólicos; e

finalizando com Capítulo 6, onde são apresentadas as conclusões obtidas neste trabalho e as perspectivas de trabalhos futuros.

Os objetivos gerais:

- ✓ Imobilização da enzima fitase em filmes de polipirrol para a elaboração de um biossensor amperométrico para a detecção de ácido fítico;
- ✓ Encapsulamento da enzima fitase em lipossomo para imobilização em eletrodos impressos de Pt.
- ✓ Emprego de três diferentes métodos de imobilização (confinamento, adsorção e ligação cruzada) do extrato bruto de abacate em filmes de polipirrol eletrodepositados em eletrodos de Pt para a construção de biossensores amperométricos e detecção de compostos fenólicos;
- ✓ Caracterização dos filmes por diferentes técnicas (MEV, AFM, FTIR PM-IRRAS) a fim de para verificar a presença das enzimas (PFO e Fitase) imobilizadas sobre os filmes de polipirrol.

Capítulo 1

Fundamentação teórica

1.1 Biossensores

Diferentes setores da nossa sociedade exigem metodologias e práticas de detecção seletiva e sensível para substâncias presentes em efluentes industriais, nas análises clínicas e no controle de qualidade de alimentos e fármacos. Neste sentido, os biossensores apontam como uma ferramenta complementar aos tradicionais métodos de análise (cromatografia líquida de alto desempenho, por exemplo), o que se justifica por suas características únicas: simplicidade, baixo custo, respostas rápidas, possibilidade de miniaturização e monitoramento contínuo (Sassolas *et al.*, 2012)(Grieshaber *et al.*, 2008) (Putzbach e Ronkainen, 2013).

Os biossensores são considerados um subgrupo dos sensores químicos, cujo papel é fornecer informações analíticas específicas, quantitativas ou semi-quantitativas, sobre um analito por meio de um elemento de reconhecimento biológico (um receptor bioquímico) e que deve estar em contato direto com o elemento de transdução.

A Figura 1 apresenta um esquema representativo de um biossensor, onde se nota que: a) os receptores se ligam especificamente ao analito; b) a arquitetura da interface na qual um elemento biológico específico interage com um analito e origina, assim, um sinal captado pelo transdutor; c) o elemento de transdução, no qual o sinal de transdução é convertido em sinal eletrônico e amplificado por um circuito detector; d) o computador e a interface para o operador humano (Grieshaber *et al.*, 2008)

Figura 1 - Princípio de funcionamento de um biossensor (Grieshaber *et al.*, 2008).

Os biossensores são classificados de acordo com o elemento transdutor, podendo ser: eletroquímicos (amperométrico, potenciométrico, condutimétrico), ópticos (por medidas de luminescência, fluorescência e elipsometria) ou detectores de massa (relaciona a oscilação da frequência de cristal piezoelétrico a uma variação de massa). Ou ainda, de acordo com o componente biológico: enzimas, organelas, tecidos vegetal e animal, microorganismos, antígeno/anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, dentre outros (Li *et al.*, 2007). Quando uma enzima é o componente biológico e o transdutor é eletroquímico, os biossensores são chamados eletrodos enzimáticos (Mello e Kubota, 2002). Nesse caso, trata-se de um eletrodo quimicamente modificado, no qual o processo de reconhecimento biológico está relacionado ao transdutor eletroquímico que converte o sinal biológico em sinal elétrico.

Em 1962, Clark e Lyons (Clark e Lyons, 1962) construíram o primeiro biossensor a partir do uso da glucose oxidase para monitorar níveis de glicose. Este biossensor ficou conhecido como biossensor enzimático e após estes estudos, buscou-se melhorar as propriedades dos biossensores em geral. Destaca-se o desenvolvimento de biossensores amperométricos, potenciométricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos.

O funcionamento de um biossensor amperométrico se baseia na ocorrência de reações de transferência de elétron (oxi-redução) do material biocatalítico depositado em um eletrodo de trabalho sob um potencial aplicado. Neste caso, mede-se a variação da corrente elétrica pelo uso de uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de referência (ER), contra eletrodo (CE) e eletrodo de trabalho (ET). A corrente gerada é diretamente proporcional à concentração do analito na interface eletrodo/solução (Thévenot *et al.*, 2001). A Figura 2 apresenta um esquema de um biossensor amperométrico, onde o analito é catalisado pela enzima imobilizada sobre a superfície do eletrodo gerando um sinal de corrente.

Figura 2- Esquema de transferência de elétrons em um biossensor amperométrico. Uma enzima catalisa uma reação redox de um analito específico, o que resulta na redução do polímero condutor (transdutor) e medição de corrente (Putzbach e Ronkainen, 2013).

Os biossensores amperométricos podem ser classificados em três gerações, de acordo com o processo envolvido na transferência de cargas. Os de primeira geração são baseados na eletroatividade do substrato (eletrodo) ou no produto da reação enzimática. Estes apresentam problemas de interferências devido à necessidade de se trabalhar sob altos potenciais (Mousty, 2004). Um exemplo de biossensor de primeira geração é a reação enzimática da glicose em presença da glicose oxidase. Durante a detecção, um elétron gerado é transferido para a molécula de FAD (P_2 , Figura 3a), que é um componente da glicose oxidase, ocorrendo a redução do FAD a $FADH_2$ (P_3 , Figura 3a). Após a oxidação da glicose, o $FADH_2$ retorna a FAD (P_1 , Figura 3a) em presença de oxigênio (Mousty, 2004).

Os biossensores de segunda geração se baseiam no uso de mediadores de elétrons, cuja função é o transporte de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo. Os mediadores de elétrons podem ser compostos orgânicos, inorgânicos e polímeros condutores. Estes biossensores também podem apresentar problemas de interferência, já que ocorrem processos de transferência de elétrons provenientes de reações redox paralelas às reações entre a enzima e o eletrodo (Gorton *et al.*, 1999). Como exemplo de biossensor de segunda geração, pode-se citar a configuração bienzimática composta por glicose oxidase e *horseradish peroxidase* (HRP). Neste exemplo, a dopamina age como mediador e é adsorvida no eletrodo modificado com argila (CLME) para a detecção de glicose a 0,0 V, impedindo qualquer possível oxidação de ascorbato e ureate (Mousty, 2004).

Os biossensores da terceira geração se baseiam na transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo, na ausência de mediadores. Esta característica é bastante interessante, já que leva a uma melhor seletividade para biossensores, que podem funcionar em potenciais mais próximos aos potenciais da própria enzima. Como consequência, a ocorrência de reações interferentes diminui e o uso de outros reagentes na sequência das reações enzimáticas passa ser dispensável (Gong *et al.*, 2005). A Figura 3 apresenta um esquema dos tipos de biossensores amperométricos.

Figura 3 - Esquema representativo das gerações de biossensores: A- primeira geração, B- segunda geração e C- terceira geração (Mousty, 2004).

1.2 - Enzimas

As enzimas são proteínas de elevada massa molecular que catalisam importantes reações biológicas e metabólicas. Por possuírem alta seletividade e poder catalítico, as enzimas têm sido estudadas nas áreas de Química, Medicina, Agricultura, Tecnologia de alimentos e Ambiental (Lehninger *et al.*, 2000). Para a fabricação de sensores enzimáticos, a escolha da enzima é de crucial importância assim como o modo de imobilização desta enzima em uma matriz apropriada.

1.2.1 Polifenol oxidase

A polifenol oxidase (PFO), descoberta em 1895 por Bourquelot e

Bertrand (Lupetti *et al.*, 2003), é também conhecida como tirosinase, fenolase, catecol oxidase e creolase. Apresenta-se com abundância na natureza, sendo a responsável pelo efeito de escurecimento de muitas frutas e vegetais (Wu *et al.*, 2013). Nos últimos anos, a PFO tem sido extraída principalmente da uva (Núñez-Delicado *et al.*, 2007), alface (Gawlik-Dzikiet *al.*, 2008), brócolis (Gawlikdziki *et al.*, 2007) e batata (Marri *et al.*, 2003). Ela é uma enzima monoxigenase contendo dois átomos de Cu(II) como sítios ativos em sua forma oxigenase, cada um coordenado com três moléculas de histidina, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial fraca, como mostra a Figura 4 (Mayer, 2006).

Figura 4 - Modelo esquemático do sítio ativo da PFO(Durán*et al.*, 2002).

O sítio de Cu binuclear pode se apresentar de várias formas, o que permite um estudo sistemático destes derivados e uma melhor compreensão da estrutura geométrica e eletrônica do sítio ativo do Cu. A forma oxigenada da enzima (oxitirosinase, Eoxy) consiste em dois átomos de Cu (II) tetragonais cada um sendo coordenado por meio de duas ligações de N_{his} equatoriais fortes e uma axial fraca. A molécula de oxigênio exógena está ligada a um peróxido e a uma ponte dos dois centros de Cu.

Figura 5 - Ciclo catalítico para a oxidação da PFO de monofenóis e difenóis para o-quinona em presença de oxigênio (Durán *et al.*, 2002).

A PFO catalisa a oxidação de compostos fenólicos por meio de duas reações, a o-hidroilação de monofenóis a o-difenóis e a oxidação de difenóis a quinonas; ambas as reações ocorrem em presença de oxigênio molecular (Gawlikdziki *et al.*, 2007) (Wu *et al.*, 2013). A quinona é uma molécula eletrofílica altamente reativa que sofre polimerização para formar, principalmente, pigmentos escuros (marrom ou preto) e insolúveis, as melaninas (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008). Um esquema da reação catalítica da PFO na presença de catecol, produzindo o-quinona está na Figura 6.

Figura 6 - Reação catalítica da PFO com catecol produzindo o-quinona.

Os compostos fenólicos estão presentes em muitos efluentes de indústrias químicas, principalmente na forma de subprodutos oriundos da produção de resinas, polímeros, corantes, medicamentos, explosivos, solventes, removedores de tintas, papel e celulose e de uma variedade de derivados aromáticos (Rueda *et al.*, 2001).

Mesmo quando sob baixas concentrações, os fenóis atuam como contaminantes aquáticos, afetando o gosto dos peixes e o odor das águas. Além disto, e o mais grave, é que eles estão relacionados a efeitos nocivos, tóxicos, para animais e plantas, já que penetram facilmente através da pele e das membranas celulares, o que caracteriza um amplo espectro de genotoxicidade, mutagenicidade e efeitos hepatotóxicos (Russell e G. Burton, 1999). Podem também afetar as velocidades de reações biocatalisadas em processos de respiração e fotossíntese (Ortega *et al.*, 1994). Desta maneira, o interesse no monitoramento e na determinação da concentração de contaminantes fenólicos em águas e efluentes industriais é enorme, sendo que, para isto, normalmente são utilizadas técnicas espectroscópicas e cromatográficas (Guan *et al.*, 2013).

Um biossensor foi desenvolvido em 1994 (Ortega *et al.*, 1994) para a detecção de compostos fenólicos por cromatografia líquida e se obteve um limite de detecção de $2,3 \text{ nmol L}^{-1}$ para catecol. Apesar de este valor de limite de detecção estar dentro dos padrões exigidos por órgãos governamentais (que exige uma concentração máxima de compostos fenólicos totais em águas equivalente a $0,5 \text{ mg}$

L^{-1} e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para fenóis individuais), a técnica de cromatografia líquida é de alto custo e demanda longo período de análise.

Dentre as formas de detecção dos fenóis, pode-se citar o uso de biossensores eletroquímicos, nos quais a PFO é imobilizada em uma matriz sólida, tal como em filmes de polímero condutor. Chen e col. publicaram um trabalho que trata da imobilização da PFO por ligação cruzada em filmes de polianilina em uma única etapa, durante a eletropolimerização da anilina (Chen *et al.*, 2013). Este biossensor apresentou um limite de detecção de $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$ para catecol e uma estabilidade da enzima imobilizada de 80% se comparada à enzima livre. Outro trabalho reportado na literatura é sobre a imobilização da PFO em filmes de sol gel de polivinilpirrolidona estabilizados com nanopartículas de Au (Singh *et al.*, 2013). Neste trabalho, o biossensor apresentou uma linearidade na região de concentrações de catecol entre $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $3,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

Embora trabalhos interessantes tenham sido publicados sobre a detecção de catecol por meio de biossensores, ainda é possível melhorar alguns aspectos, tal como o custo, já que estes biossensores foram desenvolvidos a partir de enzima comercial, que possui alto valor de mercado.

1.2.2 – Fitase

Outra enzima interessante para uso em biossensores é a fitase (mio-inositol hexafosfatofosfohidrolase), que tem como principal papel catalisar a reação de hidrólise do ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol ou fitato) em íons fosfato, Figura 7 (Moraes, 2008). Estes íons são nutrientes essenciais para todas as formas de vida, entretanto, em grandes concentrações podem causar problemas de eutrofização nos meios aquáticos.

Figura 7 - Reação catalítica da fitase com o ácido fítico produzindo inositol e íons fosfatos (Moraes, 2008).

O ácido fítico é a principal forma de armazenamento de fosfato em cereais, grãos, pólen, leguminosas e oleaginosas (PASAMONTES *et al.* 1997), porém, é considerado um anti-nutriente, já que sofre reações de quelação com minerais importantes, tais como Mg, Zn e Ca, e se liga aos aminoácidos, amidos e proteínas. O ácido fítico não pode ser digerido pelos animais monogástricos, tais como suínos, aves e seres humanos, que não possuem as enzimas necessárias para a sua hidrólise. Neste caso, o fósforo que não é absorvido passa para as fezes e pode ser degradado por microorganismos aquáticos, sendo esta uma das causas de eutrofização das águas de áreas rurais. Portanto, a fim de atenuar os efeitos negativos da presença de altos níveis de ácido fítico, tem sido utilizada a suplementação com fitase na produção de rações animais, o que justifica a necessidade de se determinar a concentração de ácido fítico em alimentos e rações, de forma rápida e eficaz. Para isto, têm sido utilizadas técnicas, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS. No entanto, tais técnicas exigem equipamentos de alto custo e longos tempos de medida (Rodrigues *et al.*, 2011).

O uso de biossensores baseados na imobilização da fitase em matrizes poliméricas aponta como uma alternativa para a detecção de ácido fítico. Mak e col. prepararam biossensores amperométricos para a detecção de ácido fítico a partir de

filmes de poli(carbamóilsulfonato) co-imobilizado com fitase e piruvato oxidase (Mak *et al.*, 2004). Os autores obtiveram um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mmol L⁻¹ e uma resposta linear na faixa 0,2 a 2,0 mmol L⁻¹ a um potencial constante de 0,6 V em eletrodos de Pt. Em outro trabalho, foram fabricados sensores para a detecção de ácido fítico a partir da imobilização de fitase em polialilamina hidrocloreada/azul da Prússia/ITO pela técnica *layer-by-layer* (Moraes *et al.*, 2008b). Estes biossensores apresentaram um limite de detecção de $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e uma resposta linear na faixa de 0,5 a 2,0 mmol L⁻¹ a 0,0 V.

Dentre estes trabalhos mencionados, uma questão chave é o método de imobilização da enzima na matriz sólida, que deve ser feita de maneira eficiente, mantendo as propriedades da enzima imobilizada quando se compara com a enzima livre, não imobilizada, permitindo assim maior estabilidade e isolamento do meio reacional, acarretando economia no custo global do processo, desde que seja preservada a atividade enzimática (Bon, 2008).

1.3 - Imobilização enzimática

Durante a imobilização da enzima, deve-se prevenir para que não haja perda do material bioativo (Wallace *et al.*, 1999), ou seja, que grande quantidade de enzima ativa esteja ligada (imobilizada) à matriz. Os dois métodos mais comuns de imobilização de enzimas em polímeros condutores são: *i*) eletropolimerização em meio de uma solução contendo o monômero conjuntamente com a enzima (aprisionamento) e *ii*) imobilização da enzima subsequentemente às etapas de eletropolimerização.

A imobilização de uma enzima por meio de aprisionamento, ou confinamento, em uma matriz polimérica (método *i*) normalmente é feita pela aplicação de um potencial previamente escolhido ao eletrodo de trabalho, que é imerso em uma solução contendo a enzima e o monômero. A enzima, na vizinhança de um eletrodo, pode ser imobilizada durante o processo de formação do filme polimérico, sem que possíveis reações químicas afetem a atividade da enzima. Desta forma, é possível controlar a espessura do filme a partir dos valores de carga elétrica obtidos durante a eletropolimerização. Uma grande vantagem deste método

é a possibilidade de se obter um polímero sobre a superfície de eletrodos variados e com diferentes tamanhos (Sassolas *et al.*, 2012) (Olea *et al.*, 2007). Em contrapartida, é exigido um controle sobre os potenciais aplicados para que a enzima mantenha a sua atividade durante a eletropolimerização, embora envolva procedimentos relativamente simples e rápidos (Sassolas *et al.*, 2012). Nosso grupo vem tradicionalmente investigando biossensores a partir da imobilização de enzimas em junção do polipirrol (PPI) por eletrodeposição. Como exemplo, foram preparados biossensores para a detecção de uréia após a imobilização da urease em filmes de PPI; neste trabalho, a enzima foi adicionada diretamente à solução de eletropolimerização do pirrol, levando a bons resultados analíticos e mantendo a atividade enzimática (Soares *et al.*, 2012).

A imobilização de enzimas durante o processo de eletropolimerização do pirrol é uma maneira simples e atrativa de controlar a imobilização da enzima sobre a superfície do eletrodo. Este método envolve uma única etapa, sob condições de corrente ou potencial constantes, ou por varredura de potenciais, em uma solução aquosa contendo a enzima e o monômero. A eletropolimerização do pirrol envolve uma primeira etapa de oxidação em um meio contendo a enzima, como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Primeira etapa da eletropolimerização do pirrol.

Sendo que A^- representa a enzima carregada negativamente. O PPI é conhecido por ser carregado positivamente (Wallace *et al.*, 1999).

O processo de eletropolimerização do pirrol se inicia com a perda de um elétron do pirrol e a formação de um radical cátion, que reage com um segundo radical cátion, ou com um monômero neutro, e assim forma uma espécie dimérica, que também é oxidada. Finalmente, oligômeros de diferentes tamanhos de cadeia são formados na interface eletrodo/solução e atingem determinados tamanhos críticos, quando ocorre a adsorção destas espécies na superfície do eletrodo. Sendo

mantida a perturbação elétrica, forma-se um filme polimérico sobre a superfície do eletrodo, com espessura que depende do tempo de eletropolimerização e de outras condições (tal como concentração do monômero). Quando a enzima está presente nas proximidades da superfície do eletrodo, por interação de cargas, elas são imobilizadas ao filme polimérico (Sassolas *et al.*, 2012). Embora se espere que essa imobilização ocorra de forma homogênea em todo volume do filme, a perda de material por lixiviação é uma realidade. Muitos polímeros têm sido utilizados como matrizes para a imobilização de enzimas, tais como PPI, politiofeno e polianilina, destaca-se o PPI por ele apresentar uma condutividade elétrica relativamente alta e relativa facilidade de ser eletrosintetizado em condições biocompatíveis (baixos potenciais e pH neutro) (Ateh *et al.*, 2006).

Descrevemos a seguir o procedimento de imobilização da enzima após as etapas de eletropolimerização (método ii):

Um dos procedimentos para imobilização enzimática é a adsorção física, que consiste na retenção da enzima nas proximidades da superfície de um eletrodo modificado com um filme polimérico por meio de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e sítios de transferência eletrônica. A vantagem deste procedimento é manter a integridade da estrutura da enzima e a possibilidade de regeneração da matriz polimérica (Fatibello Filho e Capelato, 1992). Porém, também apresenta desvantagens, como, por exemplo, o fato de que as forças das ligações permitirem que o pH da solução enzimática se modifique e que a adsorção da enzima se limite a ocorrer somente na superfície do polímero, diminuindo a quantidade de enzima imobilizada. Neste caso, como a enzima é imobilizada nas camadas mais externas da matriz polimérica, aumenta a possibilidade de ocorrer lixiviação.

Para obter biossensores mais estáveis e com maiores tempos de vida, é necessário que haja uma forte e eficiente interação entre a enzima e a matriz, como, por exemplo, por meio de ligação covalente entre os grupos funcionais da enzima e a matriz. Além disto, os biossensores à base de polímeros condutores podem apresentar baixa resistência de difusão, boa estabilidade e possibilidade de uso de diversas condições de preparo, embora a matriz não seja regenerável (Yang *et al.*, 2004).

A imobilização enzimática também pode ser realizada por meio de ligações cruzadas, quando a enzima se liga a outra proteína ou molécula, que

contenha um grupo funcional específico. O reagente mais comumente usado para a ligação cruzada com a enzima é o glutaraldeído, uma molécula homo-bifuncional (Migneault et al., 2004). Neste caso, é necessário se preocupar com a acessibilidade da enzima, sendo a perda da atividade da enzima mínima e o custo, moderado (Silva Nunes *et al.*, 2004).

A Figura 9 apresenta um esquema dos tipos de imobilizações mencionados anteriormente.

Figura 9 - Esquema representativo de imobilização enzimática.

A Tabela 1 apresenta as principais vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização.

Tabela 1- Vantagens e desvantagens dos diferentes métodos de imobilização

<i>Métodos</i>	<i>Tipo de ligação</i>	<i>Vantagem</i>	<i>Desvantagens</i>
Adsorção	Fracas	Simplicidade. Atividade enzimática não diminui.	Dessorção
Por ligação covalente	Entre grupo funcional da enzima e matriz	Nenhuma barreira de difusão. Estabilidade. Rápida resposta.	Matriz não regenerável. Ligação com produtos tóxicos tal como glutaraldeído.
Confinamento	Incorporação da enzima em gel ou polímero.	Sem reação química monômero-enzima que afete atividade enzimática. Vários tipos de enzima podem ser incorporadas ao polímero.	Difusão de barreira. Perda de atividade enzimática. Necessidade de alta concentração de enzima e monômero.
Ligação cruzada	Ligação entre enzima e agente reticulador.	Simplicidade.	Perda de atividade enzimática.

Adaptada de SASSOLAS et al. (2012)

Um método mais recente de imobilização de enzimas é pelo uso de lipossomos, que são esferas em nanoescala formadas por bicamadas lipídicas que encerram uma fase aquosa (Figura 10) (Park *et al.*, 2010).

Figura 10 - Lipossomo: a) representação esquemática, b) estrutura química (Geraldo, 2013).

Tendo em vista os trabalhos da última década e a necessidade de se obter biossensores mais precisos e estáveis, o encapsulamento de enzimas em lipossomos tem sido bastante estudado e aprimorado (Park *et al.*, 2010). Os lipossomos podem ser aplicados na imobilização de enzimas em matrizes poliméricas com finalidades bioquímicas e biomédicas. Este grande interesse se justifica pela interação destas membranas com a enzima, podendo estabilizar a sua estrutura e atividade (Yoshimoto *et al.*, 2013). Facilmente obtidos, os lipossomos são estáveis em solução por longo período de tempo, sem que haja uma modificação expressiva de seu tamanho ou estrutura. Além disso, um microambiente biocompatível, juntamente com uma habilidade de se controlar as suas propriedades físico-químicas, torna-os muito atraentes para ampla gama de aplicações (Woodle, 1995) (Wallner *et al.*, 2013). Um importante uso dos lipossomos está na liberação controlada de fármacos, quando se busca uma estabilidade estérica para o sistema que contém o fármaco incorporado (Moraes *et al.*, 2008b).

Devido às suas propriedades químicas e físicas, os lipossomos podem ser usados em uma variedade de aplicações. Por exemplo, verificou-se que as enzimas são mais estáveis quando encapsuladas em lipossomos, pois, desta forma, mantêm-se protegidas de desdobramento e proteólise e de agressões de agentes externos, tais como proteases (Walde e Ichikawa, 2001). Outra característica

importante das enzimas encapsuladas em lipossomos é que elas mantêm a atividade enzimática mesmo que em baixas concentrações (Winterhalter, 2001).

Apesar de os lipossomos serem muito promissores para uso em nanomateriais, ainda existem poucos trabalhos na literatura sobre uma aplicação em biossensores. Uma das primeiras tentativas de se preparar um biossensor eletroquímico baseado em lipossomos foi descrita a partir do uso da glicose oxidase (Woodle, 1995). Depois, pode ser citado o trabalho que trata do preparo de biossensores pelo encapsulamento da acetilcolinesterase em lipossomos e uso na detecção de cloreto de acetilticolina; neste caso, foi obtido um sistema estável e resultados rápidos e reprodutíveis (Vamvakaki *et al.*, 2005). Moraes *et al.* (Moraes *et al.*, 2008a) imobilizaram lipossomos (DPPG) em filmes de PAMAM, conseguindo preservar o tamanho e estrutura do lipossomo. Outro trabalho reportado na literatura trata do encapsulamento da Aloe Vera nos lipossomos DPPG e POPG imobilizados em bicamadas com um polieletrólito para a liberação de aloina, um componente importante da *Aloe Vera* (Xavier *et al.*, 2013). Outro trabalho publicado recentemente trata do desenvolvimento de biossensores amperométricos para a detecção de glicose; neste trabalho, a glicose oxidase foi encapsulada em lipossomos e imobilizada em filmes de micropexirodase-11. Este biossensor apresentou melhores respostas em geral e quando comparados ao sistema livre de lipossomos (Graça *et al.*, 2014).

1.4 - POLÍMEROS CONDUTORES

Os polímeros convencionais são inerentemente isolantes. O primeiro polímero condutor sintetizado foi o poliacetileno em 1970 (Medeiros *et al.*, 2012) e a partir de então, houve um grande interesse no estudo de suas propriedades elétricas e na descoberta de novos materiais. Em 2000, foi concedido o prêmio Nobel a Alan J. Hegger, Alan G. MacDiarmid e Hideke Shirakawa pela descoberta e pesquisa em polímeros condutores (Medeiros *et al.*, 2012), que apresentam uma ampla gama de aplicações, conforme Figura 11.

Figura 11 - Aplicações tecnológicas dos polímeros condutores (Ferreira, 2009)

Um dos aspectos mais interessantes na pesquisa a cerca dos polímeros condutores é a capacidade que eles apresentam de sofrer alterações reversíveis entre o estado isolante e o estado condutor. Estas reações envolvem a oxidação, ou redução, de espécies não aniônicas e isolantes e originam espécies policatiônicas com propriedades condutoras (Rover Jr., 1997).

As estruturas dos polímeros condutores apresentam uma sequência de ligações duplas conjugadas, o que favorece uma condutividade que aumenta por meio de um processo de oxi-redução e incorporação de íons; este processo é denominado dopagem (Rover Jr., 1997). Em alguns casos, a dopagem pode ser protônica e oxidativa, simultaneamente, como no caso de alguns polímeros, tal como a polianilina. Essas reações redox levam ao aumento da mobilidade dos elétrons e da condutividade dos polímeros.

A reação de dopagem de um polímero envolve um mecanismo de transporte de carga com contra-íons compensadores de carga que se difundem através de um polímero na forma de um filme (Murray, 1992). Em geral, a condutividade de um polímero conjugado depende de alguns fatores, tais como difusão ou migração de contra-íons no filme para manter eletroneutralidade,

solvente, morfologia, concentração do monômero, potencial, carga ou correntes aplicados. Além disso, podem ser obtidas diferentes propriedades dos polímeros após serem alteradas às várias funcionalidades do monômero (Rover Jr., 1997).

Os polímeros condutores podem ser sintetizados por via eletroquímica ou química (Guimard *et al.*, 2007). O preparo mais comum dos polímeros condutores, tais como polipirrol, politiofeno e polianilina, é por eletropolimerização, sendo o polímero obtido na forma de um filme fino sobre a superfície de um eletrodo.

Na Figura 12, são observadas algumas estruturas de polímeros que podem ser sintetizados e utilizados na detecção direta de analitos ou para imobilização de enzimas.

Figura 12 - Estruturas de alguns polímeros condutores (Bagheri *et al.*, 2013).

Os polímeros condutores são de grande interesse para uso como matrizes de imobilização enzimática, pois atuam como espécie intermediária entre o receptor e o analito, melhorando a transdução, tempo de resposta, sensibilidade e limite de detecção (Xie e Zhao, 2013) (Oliveira, 2013). A Figura 13 apresenta duas formas de preparo de biossensores a partir do uso de polímeros condutores como matrizes para a imobilização de enzimas; sendo uma a partir da polimerização química mostrada no alto da figura e a outra, por eletropolimerização, mostrada do lado direito da figura.

Figura 13 - Esquema representativo do desenvolvimento de biossensores baseado em diferentes técnicas de polimerização do pirrol (Serra, 2010).

Um critério importante para a seleção de um polímero a ser usado na fabricação de um biossensor é se ele pode ser facilmente oxidado (a menores valores de potencial). Os elétrons π da cadeia polimérica devem ser removidos por oxidação sem que ocorra a destruição das ligações necessárias à estabilidade do polímero (Samseya *et al.*, 2013). É de interesse também que seja possível controlar variáveis que influenciam a formação dos filmes e que levam a diferentes morfologias e propriedades. Neste sentido, o principal papel dos polímeros nos biossensores é atuar como sítios favoráveis para a imobilização da enzima sem que ocorra a desnaturação fisiológica dessa enzima. Um segundo papel é desempenhar a função de transdutor e de gerador de sinais. Na prática, deve-se monitorar a mudança do potencial quando a enzima imobilizada se acopla ou reage com um analito, tal como em uma ligação chave-fechadura (Brahim *et al.*, 2002).

1.4.1 - Síntese de polímeros condutores

Os polímeros condutores podem ser sintetizados quimicamente e eletroquimicamente, as vantagens e desvantagens de cada método estão apresentadas na Tabela 2 (Stilwell, 1988).

Tabela 2 Comparação dos métodos de polimerização de um polímero condutor.

<i>Tipo de polimerização</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
Química	Produção em maior escala.	Dificuldade de se obter material na forma de filmes (limitações de solubilidade).
	Possibilidade de modificação na estrutura por ligações covalentes.	Síntese complicada.
	Possibilidade de se obter filmes finos.	
Eletroquímica	Facilidade de síntese.	Dificuldade de remoção do filme da superfície do eletrodo.
	Possibilidade de aprisionamento de moléculas nos filmes.	Impossibilidade de modificar ligações covalentes.
	Dopagem simultânea à síntese.	

(Guimard *et al.*, 2007).

A síntese química dos polímeros condutores envolve reações de condensação ou de adição. Na polimerização por condensação, há a eliminação de uma molécula pequena durante a síntese, tal como água ou ácido clorídrico, como no caso da polianilina. A polimerização com radicais, cátions e ânions é um exemplo de polimerização por adição, que se distingue umas das outras pelos estados intermediários de seus respectivos cátions ou ânions durante o processo de polimerização. A síntese química permite diversas rotas de síntese, para uma variedade de polímeros em alta escala de produção, o que não é possível na síntese eletroquímica (Guimard *et al.*, 2007).

Na síntese eletroquímica de polímeros condutores são geralmente empregados: 1) corrente constante; 2) potencial constante, ou 3) varredura cíclica de potenciais em uma célula eletroquímica com entrada para três eletrodos (Gerard, 2002), sendo um eletrodo de trabalho, um contra-eletrodo e um eletrodo de referência, conforme Figura14.

Figura 14 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.

1.4.2 - Polipirrol (PPI)

A primeira síntese do PPI descrita na literatura foi em 1916 por A. Angeli e L. Alessandro a partir da oxidação do pirrol. Em 1968, foi publicado o primeiro trabalho sobre as propriedades condutoras do PPI, preparado por via eletroquímica em eletrodos de Pt em solução de pirrol e ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Devido às possibilidades de uso de solventes orgânicos e diferentes tipos de eletrólitos, o PPI aparece como um dos polímeros condutores mais estudados (Oliveira, 2013).

Dentre os polímeros usados como matrizes para imobilização de enzimas, o PPI apresenta uma boa estabilidade química, versatilidade de aplicação e disponibilidade para uma ampla variedade de espécies biológicas (biocompatibilidade) (Wang *et al.*, 2001) (Su, 2012) (Chougule, 2011). Uma importante vantagem do PPI em relação a outros polímeros, tais como o politiofeno e a polianilina, é a possibilidade de uso de solventes, inclusive água, e de diferentes contra-íons em sua síntese e que podem afetar diretamente as suas propriedades finais, tais como adesão, condutividade, morfologia, resistência mecânica e reatividade química (Ates, 2013).

O PPI tem sido aplicado em diversos campos, como, por exemplo, em biossensores, sensores de gás, capacitores eletrolíticos, janelas electrocrômicas, baterias poliméricas, dispositivos eletrônicos e em membranas funcionais.

A síntese do PPI pode ser feita por via química ou eletroquímica em diferentes meios (aquoso ou não aquoso). A síntese química é preferida quando se pretende obter grande quantidade do produto final; esta exige a presença de um agente oxidante, juntamente com o monômero. A síntese eletroquímica do PPI geralmente é a melhor escolha devido à possibilidade de se controlar as propriedades do filme, tal como espessura (Atehet *et al.*, 2006). Além disto, suas propriedades eletrônicas permitem a transferência de carga entre o componente biológico incorporado e o eletrodo, produzindo assim uma gama de sinais analíticos.

A Figura 15 mostra um mecanismo proposto para a eletrooxidação do pirrol.

Figura 15 - Mecanismo de reação proposto para o processo de eletropolimerização do pirrol (Ahuja *et al.*, 2007)

No mecanismo da Figura 15, a primeira etapa de oxidação do

monômero é a etapa lenta, as etapas subsequentes são rápidas (acoplamento radical-radical, etapa de desprotonação e etapas de oxidação), fazendo com que o crescimento da cadeia ocorre até que a carga seja suficiente para a incorporação de um contra-íon. Todo o processo inicial de eletropolimerização ocorre na interface eletrodo/solução até ser alcançado um limite de solubilidade dos oligômeros, quando ocorre a precipitação destes oligômeros na superfície do eletrodo e a consequente formação de um polímero. A própria camada de PPI depositada inicialmente torna-se um reagente e determina o curso restante do processo de eletropolimerização.

Capítulo 2

Técnicas de caracterização

2.1- Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica (AFM) tem sido muito utilizada para a caracterização de polímeros condutores. A alta resolução das imagens obtidas, a facilidade para o preparo das amostras e a disponibilidade de instrumentos de alta qualidade fazem com que esta técnica seja uma ferramenta poderosa de caracterização (Herrmann *et al.*, 1997).

A técnica de AFM se baseia na varredura com uma ponta de prova de uma amostra nas direções X e Y, tendo o controle da distância Z entre a superfície e a ponta de prova (Silva, 2001). A varredura nas direções XYZ é realizada por meio de um dispositivo composto por cerâmicas piezoelétricas (scanner) ou piezoelétricas de varredura (piezo). A varredura da superfície é feita por uma ponta piramidal (ponteira) com 100-200 μm de comprimento e diâmetro de 20 nm integrada a um *cantilever* flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o *cantilever* se aproxime ou se distancie, e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste, há um espelho que reflete a luz a partir de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe atravessa uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes e que mede as variações de posições e de intensidade de luz produzida pelo *cantilever*, Figura 16 (Ferreira e Yamanaka, 2006).

Figura 16 - Diagrama esquemático de um microscópio de força atômica (Ferreira e Yamanaka, 2006).

2.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito utilizada para analisar as características topográficas de diferentes superfícies, produzindo imagens de grande resolução e nitidez. O grande interesse em se utilizar essa técnica, é a facilidade de preparo das amostras, assim como de se obter imagens. A técnica de MEV é adequada para uma análise detalhada da morfologia de materiais, podendo alcançar aumentos superiores aos obtidos com a microscopia óptica, sendo que o aumento pode chegar a 10.000x (Canevarolo, 2004).

O princípio de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura se baseia na emissão de feixes de elétrons por um filamento de tungstênio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial, o que permite a variação da aceleração dos elétrons e o aquecimento do filamento. A parte positiva do microscópio atrai os elétrons gerados, resultando em uma aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada por lentes condensadoras e pelo diafragma, reduzindo o diâmetro do feixe e focalizando-o sobre a amostra. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes que eles atinjam a amostra analisada (Canevarolo, 2004). A Figura 17 ilustra um diagrama representativo de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura.

Figura 17 - Esquema representativo da coluna de microscópio eletrônico de varredura (Soares, 2011).

2.3 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica que permite a investigação a respeito da presença de determinados grupos funcionais em uma amostra e se baseia na interação de moléculas ou átomos por meio de radiação eletromagnética (Solomons, 2011).

As vantagens desta técnica são: possibilidade de se analisar as amostras nos estados líquido, sólido e gasoso, simplicidade e rapidez. Outra vantagem é a possibilidade de se realizar medidas quantitativas, atribuídas às intensidades das bandas que são proporcionais à concentração de cada grupamento presente na amostra (Silverstein, 2005).

As interações eletromagnéticas na região do infravermelho são referentes aos modos vibracionais dos grupos funcionais presentes em uma amostra, que podem ser do tipo vibração de estiramento e vibração de deformação angular; essas vibrações alteram o momento dipolo das moléculas e são observadas no infravermelho. A Figura 18 representa os diferentes modos de vibração mencionados.

Figura 18 – Alguns tipos de vibrações moleculares observadas pelo FTIR (Skoog, 2007).

Os espectros de FTIR podem ser obtidos em uma ampla faixa de números de ondas, entre 400 e 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 0,001 cm^{-1} (Silverstein, 2005). O tempo de registro dos espectros é poucos segundos e eles vão sendo armazenados em um computador a uma razão sinal/ruído que pode ser melhorada após se coletar dezenas ou centenas de espectros (Harris, 2001).

2.4 Espectroscopia de reflexão e absorção no Infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

O PM-IRRAS é um método de FTIR possibilita a obtenção de informações mais detalhadas sobre as composições químicas de uma amostra. Essa técnica permite a detecção em amostras sólidas e, também, em interfaces do tipo ar-

água. As alterações na intensidade e na posição dos sinais PM-IRRAS podem ser usadas para inferir sobre a absorção, comportamento e cinética, empacotamento molecular, transições de fase, hidratação, ligações de hidrogênio e diferentes reações de superfície de um filme fino. Além disso, em PM-IRRAS, as propriedades da luz polarizada podem ser utilizadas para se determinar a orientação molecular em uma superfície (Pavinatto 2009).

A técnica de PM-IRRAS se baseia na alternância da polarização da luz incidente nas formas *s* e *p* em uma frequência da ordem de dezenas de kHz. Dessa forma, ambos os espectros podem ser medidos quase que simultaneamente e a refletividade diferencial (*S*) pode ser calculada pela equação a seguir obtida a partir da refletividade de ambas as polarizações, R_s e R_p .

$$S = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s}$$

Sendo R_p e R_s as refletividades polarizadas nas direções paralela e perpendicular ao plano de incidência, respectivamente. A absorção do feixe de luz polarizado paralelamente ao plano de incidência é mais sensível à presença de dipolos orientados verticalmente, já o feixe polarizado perpendicularmente, àqueles orientados horizontalmente. Assim, a diferença entre os dois espectros, nas duas direções, fornece informações sobre a orientação dos dipolos constituintes das moléculas na interface, isso porque as regras de seleção garantem especificidade do sinal da superfície (Geraldo, 2013).

Em um feixe de luz que incide em uma superfície a um ângulo de 80°, as bandas positivas dos espectros indicam um momento dipolo preferencialmente no plano da superfície e as bandas negativas, preferencialmente perpendiculares à superfície (Pavinatto 2009).

2.5 Técnicas eletroquímicas

2.5.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica amplamente empregada em estudos sobre reações redox de espécies eletroativas, mecanismos e velocidades de reação, detecção de intermediários de reação e acompanhamento de produtos formados em solução e sobre um eletrodo (Skoog, 2007).

Os voltamogramas cíclicos são obtidos a partir do registro da corrente em função do potencial, que é varrido em um limite pré-determinado e em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo (Denaro, 1974). Em um experimento, pode-se empregar um ciclo completo de varredura de potenciais (regiões anódicas e catódicas), um ciclo parcial ou ainda, vários ciclos sucessivos (Skoog, 2007).

Em ambas as direções (anódica e catódica), a velocidade de varredura permanece igual e, geralmente, o ciclo é repetido várias vezes. Os potenciais onde ocorrem as reversões de potenciais são chamados de potenciais de inversão. Durante um experimento, os potenciais de inversão são escolhidos de tal forma que seja possível se fazer uma análise dos potenciais de oxidação e redução (potenciais de pico) controlados pela difusão de uma ou mais espécie à superfície do eletrodo (Skoog, 2007).

A direção da varredura inicial pode ser negativa ou positiva. A negativa é chamada de varredura direta e na direção de potenciais positivos, varredura inversa. O tempo de obtenção de um ciclo pode variar entre 1 ms e 100 s, em média.

Para as medidas de voltametria cíclica, as áreas dos eletrodos devem ser diferentes, o eletrodo de trabalho deve possuir uma área menor do que a do contra eletrodo, de tal forma a permitir a polarização e a deposição de um filme no eletrodo de trabalho; já o eletrodo de referência não se polariza e mantém o potencial constante. Assim, uma perturbação de potencial é aplicada entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho originando uma típica resposta de corrente que flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo (eletrodo auxiliar). O

potencial é repetido ciclicamente entre os valores extremos de potenciais, partindo de um potencial inicial, E_i , até atingir um potencial máximo, $E_{\max}$, e decrescendo até o potencial final, E_f . O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente em uma curva de corrente vs potencial, denominada voltamograma cíclico, Figura 19 (Denaro, 1974).

Figura 19 - Perturbação imposta pela técnica de voltametria cíclica e o voltamograma obtido (Soares, 2011).

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Reagentes e soluções

A enzima fitase de *Aspergillus Ficum* (EC 3.1.3.8) (1,1 unidades mg^{-1} , ponto isoelétrico, $\text{PI} = 4,5$) e o ácido fítico (mio-inositolhexafosfato) foram adquiridos comercialmente da Aldrich. O pirrol foi destilado antes do uso. O ácido fítico foi preparado em uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato em pH 5,5. O tampão acetato foi preparado a partir do ácido acético e acetato de sódio. O sal de sódio do dipalmitoilfosfatidil glicerol (DPPG) foi adquirido comercialmente da Avanti Polar Lipids, com pureza superior a 99% e massa molar $744,96 \text{ g mol}^{-1}$.

O extrato bruto da polifenol oxidase (PFO) foi extraído da polpa do fruto de abacate (*Persea americana*) e foi adquirido em supermercado local, conforme o procedimento de Lupetti *et al.* (Lupetti *et al.*, 2003). O catecol foi utilizado como recebido em uma solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7. O tampão fosfato foi preparado a partir do sal fosfato monobásico e dibásico.

3.2 -Eletropolimerização do pirrol

A eletropolimerização do pirrol foi realizada por voltametria cíclica usando um potenciostato/galvanostato PAR Versastat II e uma célula eletroquímica com entrada para três eletrodos, um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência, um disco de Pt com área de $0,5 \text{ cm}^2$ como eletrodo de trabalho e uma placa de Pt $1,0 \text{ cm}^2$ como contra-eletrodo (Figura 20).

Figura 20 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.

A deposição eletroquímica do polipirrol (PPI) sobre o eletrodo de Pt foi realizada de 0,0 a 0,8 V a 50 mV s^{-1} em uma solução aquosa contendo $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ pirrol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl. Os filmes também foram preparados pelo uso de um micropotenciostato Dropsens, mostrado na Figura 21. Os eletrodos impressos de Pt foram obtidos comercialmente pela Dropsens.

Figura 21 - A) Micropotenciostato, B) eletrodos utilizados para o preparo dos filmes: a) com o filme, b) sem o filme de PPI.

3.3 - Imobilização da fitase e detecção de ácido fítico em eletrodos contendo PPI

Após o preparo dos filmes de PPI, os eletrodos modificados, tanto os convencionais quanto os impressos, foram imersos durante 2 h em uma solução $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de fitase em tampão acetato, pH 5,5, sob controle da temperatura a 40°C . Por meio deste processo, a enzima foi imobilizada por adsorção física nos filmes de PPI.

A técnica de cronoamperometria foi utilizada para a detecção de ácido fítico (AF) em um potencial fixo de 0,0 V. A corrente foi monitorada em função do tempo durante sucessivas adições de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de AF a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em $10,0 \text{ mL}$ de tampão acetato em pH 5,5.

3.4 Encapsulamento da fitase em DPPG

Para o encapsulamento da fitase, os lipossomos foram preparados a partir do fosfolipídio DPPG, cuja escolha se baseou por ele apresentar uma carga negativa. Os lipossomos foram preparados dissolvendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de DPPG em uma mistura de solventes, metanol/clorofórmio (1:9 v/v). Essa mistura de solventes foi evaporada com o auxílio de nitrogênio formando assim uma película sobre a parede do frasco onde estava a mistura. Depois, adicionou-se a esse frasco com a película uma solução contendo fitase a $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ em tampão acetato de sódio a pH 5,5. Para a solubilização da película de DPPG pela solução com fitase utilizou-se um sistema de ultrassom por 40 min. A Figura 22 mostra o esquema do processo de fabricação dos lipossomos e de encapsulamento de fitase em DPPG.

Figura 22 - Esquema representativo da fabricação do lipossomo e encapsulamento da enzima.

Para a imobilização da fitase, foram utilizadas duas metodologias: *i*) o filme de PPI no eletrodo de Pt foi imerso em uma solução contendo fitase pura sem DPPG, ou seja, a enzima foi imobilizada fisicamente por adsorção, *ii*) o filme de PPI foi imerso em uma solução contendo Fitase/DPPG. A concentração de fitase em ambos os casos foi de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e os processos foram realizados a 40°C e sob um tempo de imobilização de 2 h.

A cronoamperometria foi a técnica utilizada para a detecção de ácido fóico a um potencial de 0,0 V. A corrente foi monitorada em função do tempo com sucessivas adições de $5 \mu\text{L}$ de ácido fóico a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em 2 mL de tampão acetato em pH 5,5.

A partir das curvas de densidade de corrente vs concentração de ácido fóico foram calculados os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten), que define a afinidade da enzima pelo substrato, de tal forma a se saber que quanto menor for o valor de K_m maior será a afinidade da enzima pelo substrato.

3.5 Extração do extrato bruto de polifenol oxidase

O extrato bruto enzimático da polifenol oxidase (PFO) foi extraído conforme o procedimento descrito por Lupetti *et al.* (Lupetti *et al.*, 2003). Em um liquidificador foram homogeneizados, durante 3 min, 25 g de polpa do abacate, 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7 e 2,5 g do composto Polyclar SB-100. O homogeneizado foi centrifugado a 15000 rpm a 4 °C durante 30 min. Após centrifugação, o sobrenadante (extrato bruto) foi recolhido e dividido em frascos opacos para evitar a oxidação; depois, foram estocados em baixa temperatura e ao abrigo da luz.

O extrato bruto enzimático pode conter impurezas que dificultam a quantificação da atividade da enzima. Porém, a atividade enzimática pode ser expressa em termos de unidades de atividade (UA), que é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidades de absorbância por min. A atividade enzimática da PFO, na forma de extrato bruto de abacate, foi determinada pelo monitoramento da absorção de luz a um comprimento de onda fixo de 410 nm, ou seja, na banda típica da o-quinona, conforme verificou-se experimentalmente. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 10 mm; as medidas foram realizadas durante os primeiros 180 s após a adição de 2,8 mL de uma solução de catecol 0,05 mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7 em temperatura ambiente. A atividade enzimática foi calculada de acordo com Equação 1.

$$A = \frac{\Delta abs \times 1000}{\Delta t \times V},$$

onde: A é a atividade enzimática, Δabs é a variação de absorbância no comprimento de onda de 410 nm, Δt é o intervalo de tempo de reação e V é o volume da solução enzimática.

3.6 Imobilização da polifenol oxidase

Um obstáculo normalmente encontrado quando se busca preparar biossensores eficientes é como imobilizar o extrato bruto em uma matriz sólida. Neste trabalho, foram utilizados três métodos de imobilização do extrato bruto da PFO extraída do abacate em filmes de PPI eletrodepositados em eletrodos de Pt.

A eletrodeposição do filme foi realizada de maneira similar ao descrito para o biossensor de ácido fítico. Após o preparo dos filmes de PPI, a enzima foi imobilizada por dois métodos, descritos a seguir:

No primeiro método, a enzima foi imobilizada nos filmes de PPI por confinamento (PPI/PFO_{conf}). O filme PPI/PFO_{conf} foi preparado a partir do uso de uma solução contendo 10 mL de NaCl 0,1 mol L⁻¹ como eletrólito suporte, 0,7 mol L⁻¹ do monômero pirrol e uma solução de 100 µL de extrato bruto de PFO. Neste método, a enzima foi imobilizada durante a eletropolimerização do pirrol, ou seja, junto com o processo de preparo do filme, conforme ilustrado na Figura 23. Tal procedimento tem sido utilizado com êxito no preparo do biossensores para a detecção de uréia. Soares et al. imobilizaram a urease por confinamento em filmes de PPI e utilizaram este biossensores na detecção de uréia (Soares *et al.*, 2012).

Figura 23—Proposta para esquema de imobilização por confinamento da PFO sobre o filme de PPI.

No segundo método, a enzima foi imobilizada após o processo de preparo do filme de PPI no eletrodo de Pt. Após a eletrodeposição, o filme de PPI foi imerso em uma solução contendo o extrato bruto de PFO em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato, pH 6,5 durante um período de 3 h. Desta maneira, a enzima pode ser imobilizada no filme por adsorção, por meio de ligações do tipo Van der Waals, sem que a integridade da enzima fosse afetada. A Figura 24 mostra um esquema do método de imobilização por adsorção (PPI/PFO_{ads}).

Figura 24-Esquema de imobilização por adsorção da PFO sobre o filme de PPI.

Para o terceiro método, a enzima foi preparada em uma solução com glutaraldeído (Glu). O Glu é um agente de reticulação conhecido na literatura por sua facilidade de formar ligações cruzadas rapidamente, de forma efetiva e irreversivelmente com proteínas, sem que ocorra coagulação das mesmas (Cilli, 2007). O Glu forma ligações covalentes com a PFO, o que pode diminuir a possibilidade de perda enzimática dos biossensores por lixiviação; além disto, o uso de Glu facilita a difusão do analito até o centro ativo da enzima, conforme verificado na literatura para imobilização da urease em filmes de PPI e poli(5-amino-1-naftol) na detecção de uréia (Massafera, 2010). O Glu apresenta dois grupos aldeídicos terminais, que reagem com os grupamentos aminos presentes na PFO, favorecendo, assim, a formação de redes entrecruzadas. A Figura 25 mostra a estrutura da molécula de Glu e um esquema deste tipo de imobilização (PPI/PFO/Glu).

Figura 25 – a) Estrutura do glutaraldeído e b) esquema de imobilização por ligação cruzada da PFO sobre o filme de PPI.

Para a preparação dos filmes PPI/PFO/Glu, a quantidade de Glu foi escolhida a partir do uso de uma proporção que variou entre 5% e 30% de Glu/PFO, porém, mantendo fixo o volume final de 100 μL .

A técnica de cronoamperometria foi usada para a detecção de catecol. As medidas foram realizadas em uma célula eletroquímica contendo 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ em pH 6,5 a um potencial fixo de 0,2 V por 95 s. Para cada medida, variou-se a concentração de catecol entre 0,0 e 0,5 mmol L⁻¹.

O biossensor também foi testado em amostras de morangos orgânicos e não orgânicos. As amostras foram preparadas a partir do uso de 100 g de morangos solubilizados em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5 utilizando um liquidificador. Os parâmetros usados para as medidas foram os mesmo usados para a detecção de catecol.

3.7 - Caracterização dos filmes

Para verificar as possíveis modificações na morfologia e na estrutura dos filmes obtidos após a imobilização da enzima (fitase e PFO) por diferentes metodologias, eles foram caracterizados pelas técnicas de MEV, AFM, PM-IRRAS e FTIR. As medidas de MEV foram realizadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura *Digital Scanning Microscopy* (DSM 960 da Zeiss West Germany). Para as medidas, os filmes previamente eletrodepositados em eletrodos de Pt foram afixados em um suporte de Al e recobertos com uma fina camada de Au para contato elétrico e geração da imagem. A camada de Au era fina o suficiente de tal modo a não ser absorvida pela amostra, porém, espessa o suficiente para manter o contato elétrico. Após o recobrimento, as amostras foram colocadas em uma câmara sob vácuo para eliminar a umidade.

As medidas de AFM foram realizadas com um Nanoscope III da Digital no modo *tapping* para filmes que foram eletrodepositados em eletrodos de Pt (PPI, PPI/Fitase, PPI/PFO, PPI/PFO/Glu).

As medidas de FTIR foram feitas em um espectrômetro Thermo Nicolet-Nexus 470/FT-IR de 400 cm^{-1} a 2000 cm^{-1} , sendo feitas 32 varreduras para cada filme (PPI, PPI/Fitase, PPI/PFO, PPI/PFO/Glu).

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas por um espectroscópio KSV *Instruments* PMI 550. Os filmes foram estudados por PM-IRRAS a um ângulo de 80° , pois, nesse ângulo, as bandas do espectro que são positivas indicam um momento de dipolo preferencialmente no plano da superfície e as bandas negativas, preferencialmente perpendicular à superfície. As medidas de PM-IRRAS foram realizadas para os eletrodos impressos (filmes de PPI, PPI/Fitase, PPI/Fitase/DPPG e PPI/DPPG).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparo dos filmes de polipirrol

Conforme mencionado na parte experimental, os filmes de polipirrol (PPI) foram eletrodepositados em eletrodos de Pt por voltametria cíclica em meio de uma solução contendo NaCl e pirrol após vários testes iniciais, quando foram variados os parâmetros: intervalos de potencial, valores de potenciais finais, números de ciclos e concentração do monômero. Contudo, o protocolo selecionado foi o que resultou em filmes mais uniformes e espessos. A Figura 26 mostra o voltamograma do processo de preparo de um filme de PPI sob as condições escolhidas e após 10 ciclos sucessivos. Nestas curvas, observa-se um aumento linear na densidade de corrente com o número de ciclos, que está relacionado às características eletroativas do filme e ao aumento gradual da sua espessura. O filme obtido se mostrou rugoso, com uma rugosidade tipicamente determinada pelo próprio processo de nucleação do polímero e, conseqüentemente, pelo rápido espessamento do filme (Zheng *et al.*, 2012).

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de Pt durante a síntese dos filmes de PPI em uma solução aquosa contendo $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ pirrol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl.

Após a eletrossíntese dos filmes, eles foram modificados pela imobilização das enzimas polifenol oxidase (PFO) e fitase e, em seguida, caracterizados pelas técnicas de AFM, MEV, FTIR e PM-IRRAS.

4.2 Detecção de ácido fítico após a imobilização da fitase nos filmes de PPI por adsorção física

Inicialmente, foi realizada a otimização do tempo de imobilização da fitase sobre os filmes de PPI por meio da técnica de cronoamperometria, ou seja, baseado no máximo de densidade de corrente vs tempo. O tempo para a imobilização variou entre 10 min e 210 min, sendo que, para cada valor de tempo, foi utilizado um único filme de PPI; desta forma, foi preparado um filme para cada tempo de adsorção. As medidas foram realizadas em uma solução $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 5,5. Neste caso, para cada medida, o filme de PPI foi mergulhado na solução contendo fitase a uma concentração fixa de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ e ali foi deixado pelos diferentes tempos (entre 10 e 210 min), que foi chamado de tempo

para a imobilização. Em seguida, foram obtidas as curvas amperométricas sob a aplicação de um potencial fixo, 0,0 V. A Figura 27 apresenta as curvas amperométricas obtidas para diferentes tempos de imobilização da fitase. Na parte interna da Figura 27, observa-se o gráfico de tempo por densidade de corrente máxima para cada tempo de imobilização, onde é possível se notar que, a partir dos primeiros minutos, há um aumento na densidade de corrente iniciando em $-7,79 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 10 min, alcançando um valor máximo de $-1,09 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 120 min; a partir deste tempo, a densidade de corrente diminui chegando a $-3,14 \mu\text{A cm}^{-2}$ em 210 min.

Figura 27- Otimização do tempo de imobilização da fitase na superfície do PPI, para cada curva foi utilizado uma solução de 2mmol L^{-1} de ácido fítico em $0,1\text{mmol L}^{-1}$ de tampão acetato pH 5,5. Detalhe: máximo de densidade de corrente referente a cada tempo de imobilização.

Tendo em vista os resultados obtidos em diferentes tempos para imobilização, foi utilizado o protocolo de preparo dos filmes de PPI/Fitase pela imersão dos filmes de PPI em uma solução $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de fitase em tampão acetato por 120 min a 40°C . Este valor de temperatura foi escolhido por ser ideal para a estabilidade enzimática da fitase neste sistema.

Após o preparo dos filmes de PPI e PPI/Fitase, foram realizadas medidas de voltametria cíclica utilizando uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato em pH 5,5 e mostradas na Figura 28. Nestas curvas voltamétricas, percebe-se pouca

diferença nas respostas dos filmes PPI e PPI/Fitase, sem que se defina a presença de um par redox bem definido e uma resposta mais capacitiva para o filme com fitase. Nas curvas, nota-se uma densidade de corrente máxima em potenciais positivos, na região de oxidação de 161 mAcm^{-2} e mínima, de -150 mAcm^{-2} , em potenciais negativos. Já para o filme de PPI livre de enzima, os valores obtidos de densidade de corrente são inferiores, alcançando um máximo de densidade de corrente em potenciais positivos de 73 mAcm^{-2} e -26 mAcm^{-2} em potenciais negativos. Embora sejam pequenas as diferenças, as respostas voltamétricas dos filmes PPI e PPI/Fitase não são iguais, o que pode indicar a ocorrência de interações eletrostáticas entre a fitase e o filme de PPI. Este comportamento é o esperado para filmes com enzimas imobilizadas (McNatt, 2001).

Voltamogramas cíclicos apresentados na literatura para uma diferente matriz (complexo de metaloftalocianinas/metaloportirina) com a glucose oxidase e sem glucose oxidase (Ozoemena e Nyokong, 2006) (Min e Yoo, 2009) apresentam uma forma bem próxima às observadas aqui. De maneira geral, a presença da enzima em uma matriz polimérica interfere na resposta voltamétrica deste filme, muito embora não necessariamente sejam diferenças tão marcantes.

Figura 28- Respostas eletroquímicas dos filmes de PPI (---) e PPI/Fitase (---) em uma solução tampão acetato, pH = 5,5.

A próxima etapa foi buscar uma confirmação da presença da fitase nos filmes PPI/fitase por meio da técnica de FTIR (Figura 29). A imobilização da fitase na matriz do PPI pode ser confirmada pelo aparecimento de novas bandas e/ou deslocamento de bandas nos espectros originais de filmes de PPI. A faixa espectral característica da Fitase está entre 650 cm^{-1} - 1750 cm^{-1} . Nesta região, a Figura 29 mostra diferenças para os filmes PPI e PPI/Fitase, e se pode mencionar a banda em 915 cm^{-1} para o filme PPI, que é atribuída à deformação do anel do pirrol (Davidson e Turner, 1995) e que se desloca para 861 cm^{-1} nos espectros do filme de PPI/Fitase. Este deslocamento pode estar relacionado às possíveis interações eletrostáticas com a fitase, que é carregada negativamente, PI (4,5), e o seu ambiente com carga positiva, que é a matriz PPI.

As bandas na região entre 1480 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} são típicas nos espectros de filmes de PPI e indicam a extensão da conjugação deste polímero (Mikat *et al.*, 2001). O espectro para o filme de PPI está em concordância os espectros de filmes de PPI da literatura (Lu *et al.*, 2002) (Mikat *et al.*, 2001). As principais bandas no espectro do PPI podem ser atribuídas ao estiramento das ligações C-C do anel aromático do PPI e que se deslocam para 1442 cm^{-1} e 1566 cm^{-1} no filme PPI/Fitase. A banda em 1700 cm^{-1} , que tem sido atribuída à presença de grupos carbonilas na estrutura do PPI, é observada com baixa intensidade somente no espectro do filme de PPI/Fitase, indicando que este filme se mostra um pouco superoxidado (Ghosh *et al.*, 1998)(Lu *et al.*, 2002).

Figura 29- Espectros de FTIR dos filmes de PPI e PPI/Fitase eletrossintetizados sobre eletrodos de Pt.

Outra técnica utilizada na caracterização dos filmes foi a microscopia de eletrônica de varredura (MEV). Sabe-se que a morfologia de um polímero condutor depende dos parâmetros utilizados durante a sua eletrossíntese, tais como natureza do eletrólito suporte usado, técnica de preparo dos filmes, potenciais finais no caso de filmes preparados por voltametria cíclica, pH, temperatura, dentre outros parâmetros (Ateh *et al.*, 2006).

De acordo com alguns trabalhos na literatura, os filmes de PPI apresentam uma morfologia típica, com estruturas esféricas granulares chamadas *couve-flor* (Pouzet *et al.*, 1993) (Herrasti e Ocón, 2001) (Wanekaya *et al.*, 2006).

Na Figura 31 observa-se a morfologia típica de um filme de PPI nativo, com esferas dispersas de 0,40 μm de diâmetro. Para o filme de PPI/Fitase, a estrutura nodular da matriz polimérica se mantém, porém, há uma distribuição mais uniforme de esferas com menores diâmetros, da ordem de 0,15 μm . Esta mudança na morfologia do filme PPI/Fitase se deve à presença de fitase.

Figura 30 - Imagens de MEV dos filmes PPI e PPI/Fitase com aumento de 10.000 vezes.

Os filmes de PPI e PPI/Fitase foram também estudados por microscopia de força atômica (AFM) conforme Figura 31. Nestas imagens, as regiões escuras representam vales, quanto mais clara for a região, maior será a altura do ponto observado, que corresponde ao máximo do eixo z. As imagens do filme de PPI, Figura 31a, mostram estruturas esféricas globulares distribuídas ao

longo do filme. Na Figura 31b, nota-se uma diminuição na rugosidade do filme do filme PPI/Fitase. Neste caso, foram obtidos os valores de rugosidade de 263 nm e 75 nm para os filmes de PPI e PPI/Fitase, respectivamente. Essa diminuição na rugosidade pode estar relacionada à presença da enzima, que durante a imobilização deve preencher os espaços deixados pelo filme, poroso, o que origina uma menor rugosidade nos filmes PPI/Fitase.

Figura 31—Imagens de AFM dos filmes: a) PPI e b) PPI/Fitase.

A próxima etapa de caracterização foi verificar a afinidade da fitase com o substrato, no caso, ácido fítico. Neste caso, foi calculado o valor de constante de Michaelis Menten (K_m) após medidas de cronoamperometria. Utilizou-se uma concentração $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ de enzima em tampão acetato pH 5,5 e variou-se a concentração de ácido fítico entre 0,0 e $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. O filme estudado foi preparado segundo o protocolo descrito anteriormente, no item 5.1, quando a fitase foi imobilizada por adsorção no filme de PPI eletrodepositado em eletrodo de Pt.

O valor de K_m foi calculado a partir da Figura 32, que mostra os valores máximos de densidade de corrente, e que foram obtidos a partir das curvas de cronoamperometria (para cada curva foi utilizado uma concentração diferente de ácido fítico).

Observa-se, na Figura 32, que a densidade de corrente aumenta linearmente com a concentração de ácido fítico, até o valor de $\text{ca } 2,5 \text{ mmol L}^{-1}$,

alcançando uma densidade de corrente máxima de $-1,0 \text{ mA cm}^{-2}$ para esta concentração. Após atingido este valor de densidade de corrente, este aumento deixa de ser linear e é praticamente constante até o máximo da concentração de AF utilizada, $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para se obter o valor do K_m , a curva foi linearizada, ou seja, buscou-se a estabilização na densidade de corrente. O valor de K_m obtido foi de $2,44 \text{ mmol L}^{-1}$, que é similar ao encontrado na literatura, $2,25 \text{ mmol L}^{-1}$ co-imobilizando fitase e piruvato oxidase em filmes de poli(carbamoilsulfonato) (Mak *et al.*, 2004).

Figura 32 Variação da densidade de corrente para o filme de PPI/Fitase em função da concentração de ácido fítico.

Após o estudo sobre a afinidade da enzima com o substrato, foram feitas medidas para a detecção de ácido fítico pela técnica de voltametria cíclica. A Figura 33 mostra as respostas voltamétricas dos filmes de PPI/Fitase em uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato, pH 5,5, contendo diferentes concentrações de AF. Observa-se entre os potenciais $-0,2 \text{ V}$ e $0,6 \text{ V}$ um aumento da densidade de corrente na região anódica de potenciais com o aumento da concentração de AF. Esta resposta pode ser relacionada às reações de hidrólise dos grupamentos fosfatos do ácido fítico, que quando em contato com a fitase originam íons fosfatos inorgânicos (Moraes, 2008) (Caseli *et al.*, 2006).

Na parte interna da Figura 33, pode-se observar, ainda, como os

valores de densidade de corrente variam quando obtidos a um potencial fixo, que foi escolhido a 0,0 V. Nesta figura, nota-se um aumento linear da densidade de corrente entre 0,5 mmol L⁻¹ e 2,0 mmol L⁻¹ de ácido fítico, sendo que, em maiores valores da concentração de ácido fítico, é evidente que a densidade de corrente tende a valores constantes devido a um possível efeito de saturação. Desta forma, estes resultados indicam que o filme de PPI/Fitase pode ser usado como biossensor para detecção de ácido fítico até um valor máximo de concentração de 2,0 mmol L⁻¹ de ácido fítico, que é considerado o seu limite de detecção.

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos do filme de PPI/Fitase em tampão acetato (pH 5,5) em presença de ácido fítico ($0,0\text{-}3,85 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Detalhe: Densidade de corrente em função da concentração de ácido fítico em um potencial fixo de 0,0 V.

A Figura 34 mostra as curvas cronoamperométricas dos filmes PPI/Fitase em um potencial fixo de 0,0 V em meio de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão acetato, pH 5,5. Após adicionar sucessivas alíquotas de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fítico (50 μL cada alíquota) em 10 mL de tampão acetato, as curvas foram registradas. Neste caso, foi observado um aumento da densidade de corrente com a concentração de ácido fítico até a quarta adição, a $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A partir deste valor, a densidade de corrente decaiu bruscamente devido à saturação dos sítios ativos da fitase (possível

desnaturação). Decorrido o tempo total do experimento, os valores locais de temperatura e pH para o filme de PPI/Fitase sofreram alterações que podem ser associadas a possíveis alterações na estrutura e propriedades do filme com a fitase imobilizada. Uma vez que se tratam de mudanças irreversíveis, o decaimento da densidade de corrente é acelerado pelo aumento da concentração de ácido fítico.

Figura 34 - Resposta amperométrica do filme PPI/Fitase em 0,0 V em função da concentração de ácido fítico em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,5.

Adicionalmente, foram analisados os efeitos de dois interferentes, inositol e fosfato, nas respostas dos filmes PPI e PPI/Fitase, pois estas moléculas podem estar presentes em amostras reais de ácido fítico (Figura 35). O procedimento para essas medidas foi o mesmo descrito anteriormente. Em 10 mL de tampão acetato, pH 5,5, foram adicionadas as mesmas quantidades de interferentes, ou seja, 50 μ L de cada alíquota de interferente.

Figura 35 – Curvas amperométricas dos filmes PPI e PPI/Itase em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ a pH 5,5 e 0,0 V; cada seta indica a adição de 50 μL de inositol e íons fosfato.

Para o inositol, nenhum sinal de corrente foi observado nas curvas amperométricas, já para os íons fosfatos, as respostas dos dois filmes, PPI e PPI/Itase, apresentaram sinais de corrente. Para o ácido fítico, apenas o filme PPI/Itase detecta a sua presença em solução, indicando que as suas respostas amperométricas podem estar de fato relacionadas à adsorção de fosfato na matriz do polímero, tal como foi verificado antes para o biossensor azul da prússia/PAH:Itase (Moraes 2008b).

4.3 - Itase encapsulada em lipossomos e imobilizada em eletrodos impressos para detecção de ácido fítico

Os lipossomos exibem um grande potencial de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos. Várias moléculas, incluindo os peptídeos e as

proteínas, têm sido incorporadas aos lipossomos (Ho *et al.*, 2004) (Smith *et al.*, 2010). Devido à estrutura que possuem, os lipossomos possibilitam a retenção de fármacos hidrofílicos em seu compartimento interno (aquoso) ou de moléculas lipofílicas em sua membrana lipídica. Além disso, os lipossomos são interessantes para uma ampla gama de aplicações, inclusive na área de biossensores, que se justifica pela presença de microambientes biocompatíveis, juntamente com a sua capacidade de controlar o pH, temperatura e força iônica no microambiente, favorecendo, assim, a preservação da estrutura nativa da proteína (Guan *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a fitase foi encapsulada em lipossomos, DPPG, com o objetivo de preservar a sua estrutura, estabilidade e, conseqüentemente, melhorar a sua sensibilidade ao analito. O encapsulamento foi realizado antes da imobilização, sendo esperada uma interação da fitase com a parte hidrofóbica do lipossomo. A imobilização foi feita conforme o item 4.3 do procedimento experimental. A Figura 36 mostra um esquema da enzima imobilizada no lipossomo.

Figura 36 - Esquema representativo da fitase encapsulada em lipossomo e imobilizada em filmes de PPI.

Após o preparo dos filmes de PPI, PPI/Fitase e PPI/Fitase/DPPG sobre os eletrodos impressos, medidas de voltametria cíclica foram realizadas em tampão acetato de sódio a pH 5,5 (Figura 37). Os filmes de PPI exibiram uma resposta bem definida, que é típica do PPI (Rounaghi e Kakhki, 2012). A presença do DPPG e DPPG/Fitase não provocou diferenças significativas nos valores de densidade de

corrente. Já para o filme PPI/Fitase, observou-se um aumento nos valores de densidade da corrente, porém, um mesmo perfil voltamétrico.

Figura 37 - Resposta eletroquímica dos filmes PPI, PPI/Fitase e PPI/Fitase/DPPG em solução aquosa contendo tampão acetato pH = 5,5.

Os filmes foram testados como biossensores, conforme mostra a Figura 38, em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,5 em um intervalo de potencial entre -0,6 V e 0,6 V variando a concentração de ácido fítico (AF) entre 0,0 e $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Dessa forma, cada curva voltamétrica representa a resposta do filme a uma concentração específica de ácido fítico.

Os filmes PPI e PPI/DPPG (Figura 38a e 38c) não apresentaram diferenças marcantes em suas respostas voltamétricas, após o aumento da concentração de AF, em nenhuma região de potencial. Esse resultado já era o esperado, pois estes filmes não apresentam a fitase para catalisar a reação com AF.

Para o filme de PPI/Fitase, (Figura 38b), observa-se um aumento na densidade de corrente com o aumento da concentração de AF até uma concentração de $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ próximo ao potencial de -0,4 V na região catódica, permanecendo constante para concentrações maiores. Isso pode ser explicado pela saturação dos sítios ativos da enzima presentes no filme em concentrações maiores

do que $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, o que pode levar a uma diminuição na eficiência da reação catalítica.

Analisando as curvas voltamétricas do filme PPI/Fitase/DPPG (Figura 38d), na mesma região, é possível se observar um aumento na corrente para a primeira concentração de AF, estabilizando em concentrações maiores.

Figura 38 - Voltamogramas cíclicos dos filmes PPI, PPI/DPPG, PPI/DPPG/Fitase e PPI/Fitase, no intervalo de potencial entre -0,6 V e 0,6V vs. ECS em solução de tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com a variação de ácido fítico (AF) entre 0,0 a $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A Figura 39 mostra as curvas analíticas de correntes máximas vs concentração de AF obtidas a partir dos voltamogramas da Figura 38 em um

potencial fixo de -0,4 V. Na região catódica é possível se observar valores de correntes constantes e próximos de 10 μA para os filmes PPI e PPI/DPPG e um aumento linear para o filme PPI/Fitase de aproximadamente 20 μA chegando até 90 μA , correspondente a uma concentração de 1,5 mmol L^{-1} de AF, permanecendo constante para maiores concentrações. Já para o filme PPI/DPPG/Fitase, houve um aumento na corrente de -20 μA até 50 μA , que corresponde a uma concentração de 0,5 mmol L^{-1} de AF, permanecendo constante para concentrações maiores.

Figura 39 – Valores de corrente em função da concentração de AF a um potencial fixo de -0,4 V.

Espectros de PM-IRRAS foram obtidos para a confirmação da encapsulação e imobilização da enzima nos filmes PPI/Fitase. Conforme mencionado anteriormente, nestes espectros, as bandas em uma região positiva do sinal indicam um momento de dipolo no plano da superfície, ou seja, a presença de grupos funcionais que se localizam paralelos à superfície. Já as bandas na região negativa dos espectros indicam uma orientação preferencialmente perpendicular à superfície.

Inicialmente, ao analisar as bandas na região de 2800-3000 cm^{-1} , Figura 40, foram verificadas mudanças significativas após a incorporação da fitase no filme de PPI e que são atribuídas aos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_3$ (Lewis *et al.*, 1994) (MacPhail *et al.*, 1984) do DPPG.

Figura 40 - Espectros de PM-IRRAS na região de 3000 a 2500 cm^{-1} dos filmes de PPI antes e após modificação.

Na Figura 41 observa-se uma banda em 1640 cm^{-1} que pode ser atribuída a amida I presente na enzima (Blaudez *et al.*, 1994) (Corvis *et al.*, 2006). Em presença do DPPG, o espectro mostra um deslocamento para um maior comprimento de onda e um alargamento da banda, efeitos que podem ser atribuídos ao encapsulamento da Fitase. A banda por volta de 1530 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da amida II, quando a enzima esta encapsulada, houve um deslocamento desta banda para menor comprimento de onda com menor intensidade.

Figura 41 - Espectros de PM-IRRAS na região de 1750 a 1450 cm^{-1} dos filmes de PPI antes após modificação.

A banda em 1200 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo fosfato presente na enzima. Na presença do lipídio, a vibração do estiramento assimétrico do grupo fosfato se desloca para um menor número de onda apresentando com diminuição na intensidade. De acordo com Hubner *et al.* este deslocamento pode indicar hidratação e um maior número de ligações de hidrogênio com moléculas de água na interface ar/água (Castano *et al.*, 2005) (Hubner e Blume, 1998). Na região de 1306 cm^{-1} , a banda presente no espectro pode ser atribuída à presença do grupo amida III da enzima.

Figura 42 - Espectros de PM-IRRAS dos filmes de PPI, PPI/Fitase/DPPG e PPI/Fitase na região de 1350 a 1100 cm^{-1} .

A morfologia dos filmes também foi estudada para verificar possíveis mudanças nos diferentes filmes. A estrutura morfológica e as propriedades dos filmes dependem do eletrólito suporte utilizado na eletrossíntese do polímero (Paramo-García *et al.*, 2013).

A Figura 43 mostra as micrografias dos filmes PPI, PPI/DPPG, PPI/DPPG/Fitase, onde é possível obter informações sobre a influência da incorporação da enzima nos lipossomos, assim como, de sua imobilização nos filmes.

O filme de PPI, Figura 43a, apresentou uma estrutura com glóbulos esféricos distribuídos por todo o substrato, uma morfologia que é típica dos filmes de PPI. Para o filme PPI/Fitase, Figura 43b, as estruturas esféricas podem ainda ser vistas em algumas partes do substrato em uma superfície lisa. Na Figura 43c observa-se a morfologia do filme PPI/DPPG, onde é possível se observar que a presença do DPPG não provoca mudanças morfológicas significativas no filme de PPI, mas apenas se nota uma diminuição na quantidade de esferas.

Já para o filme PPI/DPPG/Fitase, Figura 43d, a estrutura com glóbulos esféricos ainda é observada, mas ocorre decréscimo no tamanho e aumento no número de esferas, sendo possível notar que a parte lisa observada no filme

PPI/fitase, agora inclui pequenas esferas, provavelmente devido às interações fitase e DPPG.

Figura 43 - Imagens de MEV dos filmes: a) PPI, b) PPI/Fitase, c) PPI/DPPG e d) PPI/DPPG/Fitase, com aumento de 10.000 vezes.

Os filmes de PPI/Fitase e PPI/DPPG/Fitase depositados sobre eletrodos de Pt foram analisados por cronoamperometria a um potencial fixo de 0,0 V em uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão acetato, pH 5,5. A Figura 44a mostra as respostas amperométricas do filme PPI/DPPG/Fitase, onde pode ser observada um aumento da corrente em função das sucessivas alíquotas de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de AF ($5 \mu\text{L}$) em 2 mL de tampão acetato. O aumento na corrente é de aproximadamente $0,2 \mu\text{A}$ para cada alíquota adicionada. Para o filme PPI/Fitase (Figura 44b), observa-se um comportamento similar, porém, o aumento da corrente em função da concentração de AF foi de aproximadamente $0,1 \mu\text{A}$. Os valores de limite de detecção (LD) foram calculados a partir dos resultados da relação sinal/ruído,

considerando três vezes o ruído das curvas. Os valores encontrados foram de $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$ e $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ para os filmes PPI/DPPG/Fitase e PPI/Fitase, respectivamente.

Figura 44 - Respostas amperométricas obtidas a 0,0 V em 2 mL de tampão acetato, pH 5,5, para os filmes: a) PPI/Fitase e b) PPI/Fitase/DPPG. Cada aumento de corrente corresponde a adições de 5 μL de AF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 45 apresenta as diferenças nas respostas amperométricas dos dois biossensores. O biossensor PPI/FDPPG/Fitase é mais sensível à presença de ácido fóico do que o biossensor PPI/Fitase. Esta diferença pode estar associada à estabilidade da enzima quando imobilizada ao lipossomo (Liu e Boyd, 2013). Os valores de sensibilidade dos filmes PPI/Fitase e PPI/Fitase/DPPG na detecção de ácido fóico foram calculados a partir do coeficiente angular das suas respectivas curvas amperométricas (região linear). Foram obtidos os valores de 0,22 e 0,36 $\mu\text{A mmol L}^{-1}$ para os filmes de PPI/Fitase e PPI/Fitase/DPPG, respectivamente.

Para os biossensores PPI/Fitase/DPPG e PPI/Fitase (Figura 45), foram obtidos os valores de alcance linear entre as concentrações de 0,5 a 3,0 mmol L^{-1} e 0,5 a 2,0 mmol L^{-1} de ácido fóico, respectivamente. Esses valores são próximos aos obtidos pelos biossensores desenvolvidos em eletrodos sólido convencional e que foram apresentados anteriormente.

Figura 45 - Curvas analíticas mostrando a variação de corrente em função da concentração de ácido fóico dos biossensores: a) PPI/DPPG/Fitase e b) PPI/Fitase

Os resultados mostram que o filme PPI/DPPG/Fitase apresenta um limite de detecção menor e um intervalo linear maior, e estes resultados podem ser relacionados à estabilidade da enzima quando encapsulada em lipossomos (Liu e Boyd, 2013). A grande vantagem desses biossensores é que permitiu o preparo de eletrodos em pequenas áreas, o que consumiu, assim, uma menor quantidade de amostra durante a realização das medidas. Além disto, a partir do sistema utilizado neste trabalho, é possível realizar medidas em campo, já que utilizou-se um micropotenciostato.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos para biossensores fabricados a partir da fitase e utilizados para detecção de ácido fítico.

Tabela 3 -Comparação das características de biossensores para detecção de ácido fítico. LD = limite de detecção; FL = faixa linear de concentrações.

<i>Transdutor</i>	<i>LD (mmol L⁻¹)</i>	<i>FL (mmol L⁻¹)</i>	<i>Matriz</i>	<i>Ref.</i>
Amperométrico	0,12	0,5 a 3,0	PPI/DPPG	Neste trabalho
Amperométrico	0,15	0,5 a 2,0	PPI	Neste trabalho
Amperométrico	0,002	0,2 a 2,0	Poli(carbamoniilsulfonado)	(Mak <i>et al.</i> , 2004)
Amperométrico	0,19	0,2 a 2,0	Cloridrato poli(alilamine) /azul da Prússia	(Moraes <i>et al.</i> , 2008b)
Voltamétrico	-	6 a 50	Filmes LB Fitase/lipídio	(Caseli <i>et al.</i> , 2006)
Impedânciométrico	0,004	-	Poli(vinil sulfonado)	(Moraes <i>et al.</i> , 2010)

Analisando a Tabela 3, é possível verificar que os resultados com os biossensores desenvolvidos neste trabalho estão de acordo com os reportados na literatura, porém, com as vantagens de que foram desenvolvidos a partir de técnicas relativamente simples e de baixo custo.

Sendo assim, os filmes PPI/Fitase e PPI/DPPG/Fitase apontam como boas alternativas para biossensores na detecção de ácido fítico.

Conclusões parciais

As condições para a detecção de ácido fítico por meio dos biossensores PPI/Fitase foram otimizadas a partir da imobilização da fitase livre e quando encapsulada em lipossomos em diferentes arquiteturas de eletrodos. Os maiores valores de sensibilidade foram obtidos para o biossensor com a enzima encapsulada e em eletrodos impressos. Os filmes foram testados como biossensores pelas técnicas de voltametria cíclica e amperometria, sendo que, por voltametria, apenas os filmes PPI/Fitase em eletrodo convencional e PPI/Fitase em eletrodos impressos apresentaram respostas satisfatórias para a detecção de ácido fítico. Já para o modo de detecção amperométrico, todos os filmes contendo enzimas responderam como biossensores para o ácido fítico, sendo que o filme PPI/DPPG/Fitase apresentou melhores respostas, com um limite de detecção de $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$, sensibilidade de $0,36 \mu\text{A mmol L}^{-1}$ e um alcance linear de 0,5 a $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Assim, pode-se verificar a eficiência do processo de encapsulamento da enzima no lipossomo, sendo preservada a integridade enzimática. A presença do lipossomo na enzima foi confirmada por meio da técnica de PM-IRRAS, que permitiu com que fosse possível observar as bandas típicas dos espectros da estrutura do lipossomo.

CAPÍTULO 5

Imobilização da polifenol oxidase (PFO) em filmes de polipirrol (PPI)

Enzimas extraídas de extratos brutos de vegetais tem se apresentado como alternativa para a construção de biossensores, em substituição as enzimas isoladas obtidas comercialmente. Biossensores construídos com as primeiras apresentam muitas vantagens, tais como: baixo custo, estabilidade biocatalítica, simplicidade na produção, dentre outras propriedades (Rounaghi e Kakhki, 2012).

A Figura 49 mostra uma curva analítica obtida a partir das medidas realizadas de cronoamperometria para cada proporção Glu/PFO, sendo que cada ponto da curva representa a densidade máxima de corrente para as diferentes proporções Glu/PFO. Analisando o gráfico, é possível observar que a densidade de corrente aumenta até uma proporção 20%, ou seja, para 20 μL de Glu e 80 μL de PFO. Depois deste valor, a densidade de corrente diminui, efeito este que pode estar relacionado à saturação enzimática, já que as ligações do Glu com a enzima são predominantemente no grupamento ϵ -amino (Beauchamp *et al.*, 1992). Portanto, a proporção escolhida para o preparo do biossensor PPI/PFO/Glu foi de 20 μL de Glu e 80 μL de PFO.

Figura 46 - Curva analítica obtida para a escolha da melhor porcentagem em volume de Glu-PFO no preparo dos filmes PPI/PFO/Glu.

Após as imobilizações da enzima, o perfil voltamétrico foi obtido para cada um dos filmes: PPI, PPI/PFO_{ads}, PPI/PFO_{conf} e PPI/PFO/Glu (Figura 50). As curvas voltamétricas foram obtidas em 10 mL de uma solução contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato, pH 6,5, em uma faixa de potencial entre -0,6 V e +0,6 V.

Pela análise da Figura 47, é possível observar que para os filmes PPI, PPI/PFO_{conf} e PPI/PFO/Glu, não ocorrem mudanças significativas nos seus perfis voltamétricos. No entanto, para o filme PPI/PFO_{ads}, nota-se um aumento na densidade de corrente, tanto na região área catódica, quanto na região anódica. Visualmente, todos os filmes se mostraram similares e com recobrimentos uniformes sobre toda a superfície do eletrodo.

Figura 47 – Perfil eletroquímico dos filmes PPI, PPI/PFO, PPI/PFO_{conf}, PPI/PFO_{ads} e PPI/PFO/Glu em uma solução aquosa contendo tampão fosfato pH = 6,5.

Para verificar a influência do método de imobilização na morfologia dos filmes, foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 48) com aumentos de 2000x (lado direito da figura) e 10000x. A Figura 48a mostra as imagens de microscopia do filme PPI livre de enzima, onde pode ser observada uma estrutura nodular ao longo do filme, que é típica do PPI, com um tamanho de esferas de aproximadamente 0,25 μm .

Para o filme PPI/PFO_{conf} (Figura 48b), não foram observadas mudanças consideráveis na estrutura morfológica.

Para o filme PPI/PFO_{ads} (Figura 48c), observa-se uma maior uniformidade, o que sugere que a enzima pode ter sido alojada em sítios vazios presentes na estrutura nodular do PPI.

Após a imobilização da enzima nos filmes de PPI por ligações cruzadas com o Glu, notou-se que a estrutura nodular do filme foi preservada, porém, houve uma redução no tamanho das esferas para 0,12 μm para um filme PPI/PFO/Glu (Figura 48d).

Os resultados de MEV mostraram que a presença da enzima no filme, assim como o método de imobilização, modificam a morfologia dos filmes de PPI.

Figura 48 - Microscopia eletrônica de varredura para os filmes: a) PPI, b) PPI/PFO_{conf}, c) PPI/PFO_{ads} e d) PPI/PFO/Glu.

Os filmes também foram estudados por microscopia de força atômica (AFM). A Figura 49 apresenta as imagens de AFM dos filmes PPI, PPI/PFO_{ads}, PPI/PFO_{conf} e PPI/PFO/Glu. A parte b das figuras mostra os perfis de altura da linha traçada nas imagens. As imagens em 2D e 3D foram varridas em uma área 5 µm X 5 µm. Como já apresentado anteriormente, as regiões mais escuras correspondem aos “vales”; quanto mais clara for a região, maior será a altura do ponto observado que corresponde ao máximo do eixo z.

A Figura 49A apresenta a imagem de um filme PPI livre de enzima, onde se observa a sua estrutura nodular típica, com algumas formas pontiagudas e uma rugosidade média de 333 nm.

A Figura 49B apresenta a imagem do filme PPI/PFO_{conf}, onde é possível notar um aumento na rugosidade que pode ser atribuído ao próprio método de imobilização da enzima no filme. Este aumento na rugosidade pode estar relacionado ao aumento do volume do filme provocado pela repulsão entre as cadeias poliméricas após a inserção da enzima no filme por adsorção.

Para o filme PPI/PFO_{ads} (Figura 49C), apesar da aparência mais uniforme, é possível observar uma rugosidade, 319 nm, que é próxima daquela obtida para os filmes PPI livre de enzima e PPI/PFO_{conf}. Pode-se afirmar que altas rugosidades são observadas normalmente em filmes mais espessos, como observado anteriormente na literatura (Silk *et al.*, 1998).

Para o filme PPI/PFO/Glu, Figura 52D, a rugosidade observada é pequena, 51nm, podendo estar relacionada ao tipo de imobilização, já que o Glu forma ligações cruzadas com a enzima originando estrutura menos rugosa.

A Figura 50 mostra um comparativo entre as rugosidades dos filmes PPI, PPI/PFO_{ads}, PPI/PFO_{conf} e PPI/PFO/Glu.

Figura 49 - a) AFM para os filmes PPI, PPI/PFO e b) perfil da altura ao longo dos pontos.

Figura 50 - Gráfico comparativo dos valores de rugosidades.

Após a caracterização da morfologia, os filmes foram testados como biossensores amperométricos para a detecção de catecol. A detecção amperométrica de um biossensor ocorre pela mudança de corrente em função da concentração do analito, catecol. A Figura 51 apresenta a reação que ocorre entre o catecol e o sítio ativo da enzima, PFO, a qual gera a mudança de corrente.

Figura 51 - Reação catalítica do sítio ativo da PFO com catecol (Ameer e Adeloju, 2009).

A Figura 52 mostra a curva analítica para o filme PPI/PFO_{ads}, sendo que cada ponto corresponde ao máximo de densidade de corrente em curvas de diferentes concentrações de catecol (detalhe da figura). Para este biossensor, observa-se um aumento da densidade de corrente com o aumento de concentração de catecol até a concentração de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ onde valor da densidade de corrente é de $0,36 \mu\text{A cm}^{-2}$ e uma diminuição relativamente brusca em concentrações maiores, ou seja, acima de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$, chegando a $0,28 \mu\text{A cm}^{-2}$ para $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Essa diminuição pode ser resultado de um processo lixiviação enzimática. O limite de detecção para este filme foi calculado como $0,12 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 52 - Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO_{ads}. Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2 V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5; cada curva corresponde a 100 μL de catecol 0,01 mol L⁻¹.

A Figura 53 apresenta a curva analítica para o filme PPI/PFO/Glu, onde é possível notar um aumento de densidade de corrente em função ao aumento da concentração de catecol até 0,3 mmol L⁻¹. Neste valor a densidade de corrente alcança 0,37 μA cm⁻² e permanece constante para concentrações maiores. Assim, evidencia-se uma possível saturação dos sítios ativos da enzima a mais altas concentrações de catecol, sendo o limite de detecção obtido para este sistema de 0,06 mmol L⁻¹.

Figura 53 – Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO/Glu. Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2 V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5; cada curva corresponde a 100 μ L de catecol 0,01 mol L^{-1} .

Para o filme PPI/PFO_{conf} (Figura 54), é possível se observar um aumento exponencial na densidade de corrente em função da concentração de catecol tendendo a estabilização a partir da concentração de 0,4 mmol L^{-1} , quando a densidade de corrente atinge o valor de 0,38 $\mu A cm^{-2}$. Este biossensor apresentou limite de detecção de 0,03 mmol L^{-1} .

O filme PPI/PFO_{conf} apresentou melhores resultados quando comparado aos outros filmes (PPI/PFO/Glu e PPPI/PFO_{ads}), com a vantagem de não ter sido utilizado nenhum tipo de agente de imobilização neste preparo, cujo resultado da reação poderia ser a formação de produtos tóxicos. Além disso, o método de imobilização é o mais simples, já que a enzima é adicionada juntamente à solução de polimerização, sem a necessidade de tratamento enzimático; e ainda, as medidas com este filme foram realizadas em menor tempo.

Figura 54 - Curva analítica mostrando a variação de corrente em função da concentração de catecol para o biossensor PPI/PFO_{conf}. Detalhe: Resposta amperométrica obtida a 0,2V em 10 mL de tampão fosfato, pH 6,5, para o biossensor PPI/PFO_{conf}. Cada curva corresponde a 100 μL de catecol 0,01 mol L^{-1} .

A Tabela 4 apresenta alguns valores de limite de detecção comparados aos valores da literatura.

Tabela 4- Valores de limite de detecção para o catecol; enzima: PFO.

<i>Substrato</i>	<i>Limite de detecção(mol L⁻¹)</i>	<i>Ref.</i>
<i>Carbono/Au/lisina/Au</i>	<i>2,5 x10⁻⁸</i>	(Tang et al., 2013)
<i>Sol-Gel derivado de titânio</i>	<i>9x10⁻⁸</i>	(Kochana et al., 2008)
<i>Sol-gel nanopartículas de Au</i>	<i>3x10⁻⁷</i>	(Singh et al., 2013)
<i>Filmes de polianilina</i>	<i>1x10⁻⁷</i>	(Wang et al., 2009)
<i>Nanotubo de carbono-PPI</i>	<i>6,7x10⁻⁵</i>	(Ozoner et al., 2010)
<i>Filme casting de PPI dopado com fosfato</i>	<i>8,4x10⁻⁵</i>	(Apetrei et al., 2011)
<i>Microfibras de PPI/QuillajaSaponin</i>	<i>2,0x10⁻²</i>	(Ramya e Sangaranarayanan, 2012)
<i>Polipirrol-2-ácido carboxílico</i>	<i>0,5x10⁻⁵</i>	(Foschini et al., 2013)
<i>PPI/PFOad</i>	<i>1,2x10⁻⁵</i>	Neste trabalho
<i>PPI/PFO/Glu</i>	<i>6,0x10⁻⁵</i>	Neste trabalho
<i>PPI/PFOconf</i>	<i>3,0x10⁻⁵</i>	Neste trabalho

Em geral, os biossensores construídos a partir do uso de filmes de PPI como matrizes para a imobilização enzimática apresentam valores de limite de detecção maiores do que os encontrados em outras matrizes poliméricas, porém, dentro dos limites permitidos pelo CONAMA, que é 0,5 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ para fenóis individuais.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) foi calculada a partir das curvas amperométricas. A constante K_m define a afinidade da enzima sobre o substrato e os resultados obtidos estão presentes na Tabela 5, comparando com a literatura.

Tabela 5 - Valores comparativos de K_m para a PFO.

<i>Biossensor</i>	<i>Analito</i>	<i>K_m (mmol L⁻¹)</i>	<i>Ref.</i>
<i>Aminopropil-poros de vidro</i>	Catecol	2,40	(Girelli <i>et al.</i> , 2006)
<i>Filme de PPI dopado com fosfato</i>	Catecol	0,08	(Apetrei <i>et al.</i> , 2011)
<i>Eletrodo de grafite/celulose modificado com ftalocianina de cobalto (II)</i>	Catecol	1,60	(Tanimoto de Albuquerque e Ferreira, 2007)
<i>Membrana da casca do ovo ativada por Glu</i>	Dopamina	0,67	(Tembe <i>et al.</i> , 2008)
<i>polipirrol-2-ácido carboxílico</i>	Catecol	3,87	(Foschini <i>et al.</i> , 2013)
<i>PPI/PFO_{ads}</i>	Catecol	0,08	Neste trabalho
<i>PPI/PFO_{conf}</i>	Catecol	0,09	Neste trabalho
<i>PPI/PFO/Glu</i>	Catecol	0,72	Neste trabalho

Por meio da Tabela 5, pode-se observar que os valores de K_m obtidos neste trabalho estão de acordo com os obtidos na literatura. Porém, pode-se destacar a relativa simplicidade de preparo dos biossensores descritos aqui, se comparados aos demais, além do baixo custo, devido a utilização de extratos de vegetais como fontes enzimáticas.

O biossensor PPI/PFO_{conf} foi testado em amostras reais, em soluções contendo suco de morango sendo uma amostra com morangos orgânicos certificados e outra com morango não orgânico. Os morangos foram adquiridos em um supermercado local, onde os fornecedores da fruta trabalham com uma alta escala de produção e utilizando agrotóxicos. O agrotóxico mais utilizado em plantações de morango é o abamectina, que contém compostos fenólicos.

A Figura 55 mostra as curvas analíticas obtidas para as soluções de morango, sendo que cada ponto na curva corresponde à densidade máxima de corrente para cada quantidade adicionada da solução de morango.

Figura 55 – Detecção de composto fenólico em amostras de 100 g de morango solubilizado em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato pH 6,5. Cada ponto da curva representa a cronoamperometria de 100 μL a 1000 μL de solução de morango.

Na Figura 58, é possível se observar que as respostas de densidade de corrente do biossensor para a solução de morango não orgânico são maiores e aumentam até a quinta alíquota, que, no caso do morango orgânico, é a partir a quarta alíquota. Em linhas gerais, pode-se afirmar que o biossensor responde em presença de uma solução de morango, orgânico ou não, ou seja, independentemente de sua procedência, já que se sabe que o morango contém naturalmente compostos fenólicos (Vizotto, 2013).

Embora sejam resultados preliminares, o biossensor se mostrou viável para utilização na análise de amostras reais. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários, tendo em vista que presença de interferentes é uma realidade quando o extrato bruto da PFO é utilizado. Além disso, deve-se focar na obtenção de biossensores mais sensíveis e estáveis.

Conclusões parciais

Foram desenvolvidos biossensores para a detecção eletroquímica de catecol a partir do uso da enzima PFO na forma de extrato bruto do fruto do abacate, tendo a vantagem do baixo custo e, ainda, com respostas dentro do padrão exigido pelo CONAMA. Para o preparo de biossensores mais eficientes, foram estudados diferentes métodos de imobilização da PFO nos filmes de polipirrol (PPI), sendo possível verificar a presença da enzima nos filmes de PPI por diferentes técnicas de caracterização: MEV AFM e eletroquímica. Os filmes puderam ser utilizados como biossensores amperométricos, e na comparação, o filme preparado a partir da imobilização da PFO por confinamento apresentou melhores respostas na detecção de catecol. Pela técnica de AFM, foi possível verificar que este filme se mostrou mais rugoso do que os demais, incluso o filme de PPI livre de enzima. Ainda, pela técnica de MEV notou-se que a morfologia do filme PPI/PFO_{conf} foi similar à observada para o filme PPI livre de enzima. O biossensor PPI/PFO_{conf} demonstrou sua viabilidade mesmo em amostras reais.

CONCLUSÕES FINAIS

Filmes de polipirrol (PPI) preparados eletroquimicamente em eletrodos de Pt se mostraram eficientes para utilização como matrizes para imobilização enzimática. Foram escolhidos diferentes métodos de imobilização e em condições adequadas (ótimas) de temperatura, pH e potenciais visando garantir e manter a atividade, estabilidade e sensibilidade das enzimas fitase e polifenoloxidase (PFO). As técnicas de caracterização utilizadas foram microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (FTIR), microscopia de força atômica (AFM) e espectroscopia de infravermelho por reflexão e absorção com polarização modulada (PM-IRRAS). A partir destas medidas, estudou-se como o método de imobilização influencia a estrutura, morfologia e rugosidade dos filmes. Os métodos eletroquímicos de detecção de analitos permitiram com que fossem obtidos dados de caracterização destes biossensores, tanto para o ácido fítico quanto para catecol. Os biossensores que apresentaram as melhores respostas foram PPI/DPPG/Fitase e PPI/PFO_{conf}, com limite de detecção (LD) de 0,12 mmol L⁻¹ e um alcance linear de 0,5 a 3,0 mmol L⁻¹ para ácido fítico e LD de 3,0x10⁻⁵ mmol L⁻¹ e alcance linear de 0,1 mmol L⁻¹ a 0,4 mmol L⁻¹ para o catecol. Os biossensores para catecol foram também testados em amostras reais, em soluções de morangos orgânicos e não-orgânicos. Embora estes resultados tenham sido preliminares, se mostraram promissores, pois diferentes tipos de biossensores foram desenvolvidos de uma maneira relativamente simples, com baixo custo e com interesse ambiental, já que se utilizou a enzima extraída de uma fonte natural, fruto de abacate. Existe ainda a necessidade de estudos mais detalhados, tal como influência de interferentes, visando obter maior sensibilidade e estabilidade dos biossensores para aplicação comercial.

REFERÊNCIAS

AHUJA, T.; MIR, I.; KUMAR, D.; RAJESH. (2007). Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials** v. 28, p. 791–805.

AMEER, Q.; ADELOJU, S.B. (2009). Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. **Sens. Actuators B** v. 140, p. 5–11.

APETREI, C.; RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; DE SAJA, J.A. (2011). Amperometric tyrosinase based biosensor using an electropolymerized phosphate-doped polypyrrole film as an immobilization support. Application for detection of phenolic compounds. **Electrochimica Acta**. v. 56, p. 8919–8925.

ATEH, D.; NAVSARIA, H.; VADGAMA, P. (2006). Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **J. R. Soc. Interface** v.3, p. 741–752.

ATES, M. (2013). A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Mater. Sci. Eng. C** v. 33, p.1853–1859.

BAGHERI, H.; AYAZI, Z.; NADERI, M. (2013). Conductive polymer-based microextraction methods: A review. **Anal. Chim. Acta** v. 767, p. 1–13.

BEAUCHAMP, R.O. *et al.* (1992). A critical review of the toxicology of glutaraldehyde. **Crit. Rev. Toxicol.** v. 22, p. 143–174.

BERENICE, A. (2007). **Microscopia eletrônica de varredura (aplicação e preparação de amostras)**. Porto Alegre/RS.

BLAUDEZ, D. (1994). Polarization modulation FTIR spectroscopy at the air-water interface. **Thin Solid Films** v. 242, p. 146–150.

BON, E.P.S. *et al.* (2008). Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. **Interciência**, Rio de Janeiro.

BRAHIM, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. (2002). Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. **Biosens.**

Bioelectron. v. 17, p. 53–59.

CANEVAROLO, S. V. (2004). **Técnicas de caracterização de polímeros**. Artliber editora, São Paulo.

CASELI, L. *et al.* (2006). Fabrication of phytic acid Ssensor based on mixed phytase–lipid Langmuir–Blodgett films. **Langmuir**. v. 22, p. 8501–8508.

CASTANO, S. *et al.* (2005). Study of structure and orientation of mesentericin Y105, a bacteriocin from Gram-positive *Leuconostoc mesenteroides*, and its Trp-substituted analogues in phospholipid environments. **Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.** v. 1668, p. 87–98.

CHEN, H. *et al.* (2013). A new catechol biosensor immobilized polyphenol oxidase by combining electropolymerization and cross-linking **Process. Int. J. Polym. Mater.** v. 62, p. 620–626.

CHOUGULE, M.A. *et al.* (2011). Synthesis and characterization of polypyrrole (PPy) thin films. **Soft Nanosci. Lett.** v. 01, p. 6–10.

CILLI, R. (2007). Contribuição do glutaraldeído como componente de sistemas de adesivos dentários. **Tese (doutorado)** Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

CLARK, L.C., Jr, LYONS, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29–45.

CORVIS, Y. *et al.* (2006). Interactions of a fungistatic antibiotic, griseofulvin, with phospholipid monolayers used as models of biological membranes. **Langmuir** v. 22, p. 7701–7711.

DAVIDSON, R.G., TURNER, T.G. (1995). An IR spectroscopic study of the electrochemical reduction of polypyrrole doped with dodecylsulfate anion. **Synth. Met.** v. 72, p. 121–128.

DENARO A. F. (1974). **Fundamentos de eletroquímica**, Denaro A. F. ed. Bliicher Ltda, São Paulo.

DURÁN, N. *et al.* (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p. 907–931.

FATIBELLO FILHO, O., CAPELATO, M. (1992). Biossensores, **Química nova** v.15.p. 2187-2198.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. (2006). Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quím. Nova** v.29, p. 137–142.

FERREIRA, J (2009). **Sensor de pH baseado em filmes de polímero conjugado e sensor biológico baseado em filmes de ouro nanoestruturado.** Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Maringá, Maringá PR.

FOSCHINI, M. *et al.* (2013). Electrochemically Prepared Polypyrrole-2-Carboxylic Acid Films: Synthesis Protocols and Studies on Biosensors. **Electroanalysis** v. 25, p. 741–749. corrigir estas maiúsculas nos títulos, rever geral

GAWLIK-DZIKI, U.; SZYMANOWSKA, U.; BARANIAK, B. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea var. botrytis italica*) florets. **Food Chem.** v. 105, p. 1047–1053.

GAWLIK-DZIKI, U.; ZŁOTEK, U.; ŚWIECA, M. (2008). Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata L.*). **Food Chem.** v. 107, p. 129–135.

GERALDO, V. P. N. (2013). Interação do ibuprofeno e capsaicinóide com filme de Langmuir e Langmuir-Blodgett contendo fosfolipídeo. 113 **Tese (Doutorado)** Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

GERARD, M. (2002). Application of conducting polymers to biosensors. **Biosens. Bioelectron.** v. 17, p. 345–359.

GHOSH, S. *et al.* (1998). Infrared and Raman spectroscopic studies of the electrochemical oxidative degradation of polypyrrole. **Synth. Met.** v. 95, p. 63–67.

GIRELLI, A.M.; MATTEI, E.; MESSINA, A.; (2006). Phenols removal by immobilized tyrosinase reactor in on-line high performance liquid chromatography. **Anal. Chim. Acta** v. 580, p. 271–277.

GONG, K. *et al.* (2005). Electrochemistry and Electroanalytical Applications of Carbon Nanotubes: A Review. **Anal. Sci.** v. 21, p. 1383–1393.

GORTON, L., *et al.* (1999). Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. **Anal. Chim. Acta**

v. 400, p. 91–108.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors** v. 8, p. 1400–1458.

GUAN, H.; LIU, X.; Wang, W. (2013). Encapsulation of tyrosinase within liposome bioreactors for developing an amperometric phenolic compounds biosensor. **J. Solid State Electrochem.** v. 17, p. 2887–2893.

GUAN, H. *et al* (2012). The novel acetylcholinesterase biosensors based on liposome bioreactors–chitosan nanocomposite film for detection of organophosphates pesticides. **Food Res. Int.** v. 49, p. 15–21.

GUIMARD, N.K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C.E. (2007). Conducting polymers in biomedical engineering. **Prog.Polym. Sci.** v. 32, p. 876–92

GRAÇA, J.S. *et al.* (2014). Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. **Bioelectrochemistry**. v. 96, p.37-42.

HARRIS, D.C. (2001). **Análise química quantitativa**. LTC, Rio de Janeiro (RJ).

HERRASTI, P.; OCÓN, P.; (2001). Polypyrrole layers for steel protection. **Appl. Surf. Sci.** v. 172, p. 276–284.

HERRMANN, P.S.P. *et al.* (1997). Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros** v. 7, p. 51–61.

HO, J.A., *et al*, 2004. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7. **Anal. Biochem.** v.330, p.342–349.

HÜBNER, W.; BLUME, A. (1998). Interactions at the lipid–water interface. **Chem. Phys. Lipids** v. 96, p. 99–123.

KOCHANA, J. *et al.* (2008). Titania sol–gel-derived tyrosinase-based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 391, p. 1275–1281.

LEWIS, R.N. *et al.* (1994). Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. **Biophys.**

J. 67, 2367–2375.

LI, X.-M. et al. (2007). Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. **Anal. Chim. Acta**. v. 582, p. 158–163.

LIU, Q.; BOYD, B.J. (2013). Liposomes in biosensors. **The Analyst** v. 138, p. 391.

LU, M.; LI, X.-H.; LI, H.-L. (2002). Synthesis and characterization of conducting copolymer nanofibrils of pyrrole and 3-methylthiophene using the template-synthesis method. **Mater. Sci. Eng. A** v. 334, p. 291–297.

MEDEIROS, E. S. et al. (2012). **Revista Eletrônica de Materiais e Processos. Uso Polímeros Conduz. Em Sensores Parte 1 Introdução Aos Polímeros Conduz.** v.7, p.62-77.

PASAMONTES, L. (1997).. Gene Cloning Purif. Charact. Heat-Stable Phytase Fungus *Aspergillus Fumigatus* **Applied and environmental microbiology**, v. 63, p.1696–1700.

LEHNINGER, A.L.; NELSON D.L., COX, M. M. (2000). **Lehninger principle of biochemistry**. Worth Publishers, New York, New York.

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

MACPHAIL, R.A. et al. (1984). Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 2. Long, all-trans chains. **J. Phys. Chem.** v. 88, p. 334–341.

MAK, W.C. et al. (2004). Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. **Biosens. Bioelectron.** v. 19, p.1029–1035.

MARRI, C. et al. (2003). Purification of a polyphenol oxidase isoform from potato (*Solanum tuberosum*) tubers. **Phytochemistry** v. 63, p. 745–752.

MASSAFERA, M. (2010). **Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia**. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Carlos.

MAYER, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: A review. **Phytochemistry** v. 67, p. 2318–2331.

McNATT, R. (2001). **Handbook of advanced electronic and photonic materials and devices**. Academic, San Diego, Calif.; London.

MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chem.** v. 77, p. 237–256.

MIKAT, J.; ORGZALL, I.; HOCHHEIMER, H. (2001). Optical absorption and vibrational spectroscopy of conducting polypyrrole under pressure. **Synth. Met.** v. 116, p. 167–170.

MIN, K.; YOO, Y.J. (2009). Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase–SWNTs–Ppy composite electrode. **Talanta** v. 80, p. 1007–1011.

MORAES, M. (2008). **Filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos.

MORAES, M.L. *et al.* (2008a). Immobilization of liposomes in nanostructured layer-by-layer films containing dendrimers. **Mater. Sci. Eng. C** v. 28, p. 467–471.

MORAES, M.L. *et al.* (2010). Strategies to Optimize Biosensors Based on Impedance Spectroscopy to Detect Phytic Acid Using Layer-by-Layer Films. **Anal. Chem.** v. 82, p. 3239–3246.

MORAES, M.L. *et al.* (2008b). Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing. **Sens. Actuators B** v. 131, p. 210–215.

MOUSTY, C. (2004). Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes **New trends. Appl. Clay Sci.** v. 27, p. 159–177.

MURRAY, R.W., 1992. Techniques of chemistry: molecular design of electrodes surfaces. ed. Wiley, New York.

NÚÑEZ-DELICADO, E. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. **Food Chem.** v. 100, p. 108–114.

OLEA, D.; MOREAU, P.; FAURE, C. (2007). Polypyrrole–glucose oxidase biosensor. Effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on film growth and morphology. *J. Electroanal. Chem.* v. 605, p. 125–135.

OLIVEIRA, J.E., (2013). Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. *Revista eletrônica de materiais e processos.* v. 8.

ORTEGA, F. *et al.* (1994). Phenol oxidase-based biosensors as selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A*, 675, 65–78.

OZOEMENA, K.I.; NYOKONG, T. (2006). Novel amperometric glucose biosensor based on an ether-linked cobalt(II) phthalocyanine–cobalt(II) tetraphenylporphyrin pentamer as a redox mediator. *Electrochimica Acta* v. 51, p. 5131–5136.

OZONER, S.K.; YALVAC, M.; ERHAN, E. (2010). Flow injection determination of catechol based on polypyrrole–carbon nanotube–tyrosinase biocomposite detector. *Curr. Appl. Phys.* v. 10, p. 323–328.

PARAMO-GARCÍA, U.; IBANEZ, J.G.; BATINA, N. (2013). AFM Analysis of Polypyrrole Films Synthesized in the Presence of Selected Doping Agents. *Int J Electrochem Sci* v. 8, p. 2656.

PARK, B. W. *et al.* (2010). Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. *Biosens. Bioelectron.* v. 26, p. 1–10.

PAVINATTO, F. J. *et al.* (2009) Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipids monolayers and Langmuir-Blodgett films. *Langmuir*, v.25, p. 10051-10061.

POUZET, S.; LE BOLAY; N., RICARD; A. (1993). Electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole deposited on porous electrode. *Synth. Met.* v. 55, p. 1495–1500.

PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. (2013). Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* v. 13, p. 4811–4840.

RAMYA, R.; SANGARANARAYANAN, M.V. (2012). Polypyrrole microfibres synthesized with Quillaja Saponin for sensing of catechol. *Sens. Actuators B Chem.* v. 173, p. 40–51.

RODRIGUES, V. C. *et al.* (2011). Polypyrrole/phytase amperometric biosensors for the determination of phytic acid in standard solutions. **Sens. Actuators B Chem.** v. 160, p. 222–226.

ROUNAGHI, G.; KAKHKI, R.M. (2012). Preparation and electrochemical application of a new biosensor based on plant tissue/polypyrrole for determination of acetaminophen. **Bull. Mater. Sci.** v. 35, p. 811–816.

ROVER Jr., L. (1997). Transdutores Potenciométricos Base Polímeros Condução. Apl. Analíticas. **Química nova.** v. 20, p. 519.

RUEDA, M.E. *et al.* (2001). Soft calibration in a flow system with electrochemical detection. **Anal. Chim. Acta.** v. 446, p. 267–277.

SAMSEYA, J. *et al.* (2013). Fabrication and characterisation of high performance polypyrrole modified microarray sensor for ascorbic acid determination. **Anal. Chim. Acta** v. 793, p. 11–18.

SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B.D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.** v. 30, p. 489–511.

SERRA, P.A. (2010). **Biosensors.** InTech, Rijek, Croatia.

SILK, T. *et al.* (1998). AFM studies of polypyrrole film surface morphology II. Roughness characterization by the fractal dimension analysis. **Synth. Met.** v. 93, p. 65–71.

SILVA, M. A. P. (2001). **Análise de superfície de filmes finos de polianilina depositados em diferentes substratos por microscopia de Força atômica.** Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos.

SILVA NUNES, G.; JEANTY, G.; MARTY, J. L. (2004). Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. **Anal. Chim. Acta** v. 523, p. 107–115.

SILVERSTEIN, R.M. (2005). **Spectrometric identification of organic compounds,** 7th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ.

SINGH, S., JAIN, D. V. S.; SINGLA, M. L. (2013). Sol–gel based composite of gold

nanoparticles as matix for tyrosinase for amperometric catechol biosensor. **Sens. Actuators B Chem.** v. 182, p. 161–169.

SKOOG, D.A. (2007). **Principles of instrumental analysis**, 6th ed. Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA.

SMITH, A.M. *et al.* (2010). Alginate-Loaded Liposomes Can Protect Encapsulated Alkaline Phosphatase Functionality When Exposed to Gastric pH. **J. Agric. Food Chem.** v. 58, p. 4719–4724.

SOARES, J.C. *et al.* (2012). Amperometric urea biosensors based on the entrapment of urease in polypyrrole films. **React. Funct. Polym.** v. 72, p. 148–152.

SOARES, J. C .(2011). **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos.

SOLOMONS, T.W.G., 2011. **Organic chemistry**, 10th ed. Wiley, N. J. Hoboken.

STILWELL, D.E. (1988). Electrochemistry of Conductive Polymers. **J. Electrochem. Soc.** v. 135, p. 2254.

SU, N. (2012). Synthesis and characterization -of polypyrrole doped with anionic spherical polyelectrolyte brushes. **Express Polym. Lett.** v. 6, p. 697–705.

TANG, L. *et al.* (2013). A tyrosinase biosensor based on ordered mesoporous carbon–Au/l-lysine/Au nanoparticles for simultaneous determination of hydroquinone and catechol. **The Analyst** v. 138, p. 3552.

TANIMOTO A.Y.D.; FERREIRA, L.F. (2007). Amperometric biosensing of carbamate and organophosphate pesticides utilizing screen-printed tyrosinase-modified electrodes. **Anal. Chim. Acta** v. 596, p. 210–221.

TEMBE, S. *et al.* (2008). Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. **Anal. Chim. Acta** v. 612, p. 212–217.

THÉVENOT, D. R. *et al.* (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.** v. 16, p. 121–131.

VAMVAKAKI, V.; FOURNIER, D.; CHANIOTAKIS, N. (2005). Fluorescence detection of enzymatic activity within a liposome based nano-biosensor. **Biosens.Bioelectron.** v. 21, p. 384–388.

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. (2001). Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomol. Eng.** v. 18, p. 143–177.

WALLACE, G.G.; SMYTH, M.; Zhao, H. (1999). Conducting electroactive polymer-based biosensors. **TrAC Trends Anal. Chem.** v. 18, p. 245–251.

WALLNER, J. *et al.* (2013). Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome interactions. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v. 72, p. 150–154.

WANEKAYA, A.K. *et al.* (2006). Fabrication and Properties of Conducting Polypyrrole/SWNT-PABS Composite Films and Nanotubes. **Electroanalysis** v. 18, p. 1047–1054.

WANG, L. X.; LI, X. G.; YANG, Y. L. (2001). Preparation, properties and applications of polypyrroles. **React. Funct. Polym.** v. 47, p. 125–139.

WANG, P.; LIU, M.; KAN, J. (2009). Amperometric phenol biosensor based on polyaniline. **Sens. Actuators B Chem.** v. 140, p. 577–584.

WINTERHALTER, M. (2001). Controlling membrane permeability with bacterial porins: application to encapsulated enzymes. **Talanta** v. 55, p. 965–971.

WOODLE, M.C. (1995). Sterically stabilized liposome therapeutics. **Adv. drug deliv. rev.** v. 16, p. 249–265.

Wu, J. *et al.* (2013). Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase From *Agaricus bisporus*. **Int. J. Food Prop.** v. 16, p. 1483–1493.

XAVIER, A. C. F.; MORAES, M. L.; Ferreira, M. (2013). Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in Layer-by-layer films for transdermal drug delivery. **Mater. Sci. Eng. C** v. 33, p. 1193–1196.

XIE, Y.; ZHAO, Y. (2013). Electrochemical biosensing based on polypyrrole/titania nanotube hybrid. **Mater. Sci. Eng. C** v. 33, p. 5028–5035.

YANG, Y. *et al.* (2004). An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sens. Actuators B Chem.** v. 102, p. 162–168.

YOSHIMOTO, M. *et al.* (2013). Preparation of liposome-coupled NADH and evaluation of its affinity toward formate dehydrogenase based on deactivation kinetics of the enzyme. **Colloids Surf. B Biointerfaces** v. 109, p. 40–44.

ZHENG, W. *et al.* (2012). The Role of Unbound Oligomers in the Nucleation and Growth of Electrodeposited Polypyrrole and Method for Preparing High Strength, High Conductivity Films. **Langmuir** v. 28, p. 10891–10897.