Diego Custódio de Souza

Caracterização por Ressonância de Plasmons de Superfície de
Biossensores Eletroquímicos Aplicados à Detecção de
Neurotoxinas

São Paulo

2013

Diego Custódio de Souza

Caracterização por Ressonância de Plasmons de Superfície de
Biossensores Eletroquímicos Aplicados à Detecção de
Neurotoxinas

Dissertação Apresentada à
Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em
Engenharia

São Paulo

2013

Diego Custódio de Souza

Caracterização por Ressonância de Plasmons de Superfície de
Biossensores Eletroquímicos Aplicados à Detecção de
Neurotoxinas

Dissertação Apresentada à
Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de Mestre em
Engenharia

Área de Concentração:

Engenharia Elétrica

Orientador: Prof. Livre Docente

Antônio Carlos Seabra

São Paulo

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Diego Custódio de

Caracterização por ressonância de plasmons de superfície de biossensores eletroquímicos aplicados à detecção de neurotoxinas / D.C. de Souza. -- São Paulo, 2013.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos.

1.Biossensores I.Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos II.t.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que me apoiaram. Especialmente a minha mãezinha Zildene R. de Souza ao meu pai Genilson C. de Souza, minha namorada Marisete P. do Vale e a minha avô Eliete F. C. de Souza(Em Memória)

Agradecimentos

Ao meu orientador Antonio Carlos Seabra pela oportunidade, pela paciência, pela amizade e por todos os ensinamentos que contribuíram com a minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Simonian da Universidade de Auburn por todo o apoio.

Aos meus irmãos Teylor, Guilherme, Vitor, Felipe e a toda família e amigos.

Ao meu amigo Marcus Pelegrini pela amizade e apoio nos momentos importantes.

Aos meus amigos Sonny Dawsey, Barbara Dawsey e Sue Ann Balch pelo inestimável apoio, pelo imenso carinho e pelos incríveis e inesquecíveis momentos que compartilhamos.

Aos meus amigos da Universidade de Auburn por todos os momentos que levarei na memória.

Agradeço imensamente a todos os professores e educadores que contribuíram com a minha formação.

Agradeço ao Santander pela bolsa auxílio.

Aos meus amigos da Fatec e da USP por toda a colaboração e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram com o meu sucesso.

*...No décimo sétimo capítulo de
São Lucas está escrito que
o Reino de Deus está
dentro do homem...*

O Discurso, O Grande Ditador, Charles Chaplin

RESUMO

Os dispositivos biossensores foram primeiramente pesquisados por Clark e Lyons, em 1962, visando medir o nível de glicemia. Atualmente, há uma popularização dos medidores de glicemia e diversas tecnologias foram desenvolvidas, principalmente, para aplicações em diagnósticos médicos e monitoramento ambiental. No entanto, há uma ampla quantidade de aplicações para biossensores ainda não disponível no mercado. A imobilização de espécies bioativas que interagem diretamente com o analito, chamada de superfície bioativa, é frequentemente considerada a etapa mais difícil no desenvolvimento de biossensores para novas aplicações. O objetivo deste trabalho é demonstrar a caracterização da camada bioativa desenvolvida pela técnica de construção de camadas auto-organizadas usando o princípio da adsorção eletrostática. Para isto, foram utilizadas três diferentes concentrações de soluções compostas por ligações covalentes entre nanotubos de carbono de paredes múltiplas e três diferentes biomateriais, Polietilenoimina, Ácido Desoxirribonucléico e enzimas do tipo Hidrolase de Organofosforados. As diferentes soluções polieletrólíticas foram caracterizadas pela técnica de ressonância de plasmons de superfície e simultaneamente formaram camadas auto-organizadas na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. A atividade das enzimas foi analisada por voltametria cíclica para as diferentes concentrações das soluções utilizadas. Os resultados mostraram que a caracterização por ressonância de plasmons de superfície promove o controle da adsorção eletrostática. A variação do ângulo de ressonância de plasmons de superfície corresponde à intensidade e à saturação das interações

eletrostáticas entre as camadas. Biossensores desenvolvidos com soluções de maior concentração, conseqüentemente, ampliaram os limites de detecção e elevaram a resolução do sinal elétrico. Em aplicações para medir baixas concentrações do analito, o adequado controle das concentrações das soluções poli eletrolíticas reduz os custos no desenvolvimento de biossensores especialmente, com relação ao custo de enzimas isoladas.

Palavras-chave: Biossensores, Imobilização de Enzimas, Nanotubos de Carbono, Ressonância de Plasmons de Superfície, Voltametria Cíclica e Hidrolase de Organofosforados

ABSTRACT

The biosensor devices were first researched by Clark and Lyons in 1962, aiming to measure the blood glucose level. Currently, there is a popularization of blood glucose meters and several technologies have been developed mainly for applications in medical diagnostics and environmental monitoring. However, there is a wide range of applications for biosensors not yet available. The immobilization of bioactive species that interact directly with the analyte, called bioactive surface, is often considered the most difficult step in the biosensors development for new applications. The objective of this work is to demonstrate the characterization of the bioactive surface developed by self-assembled monolayers technique using the electrostatic adsorption principle. For this, we used three different concentrations of solutions composed of covalent bonds between multi-walled carbon nanotubes and three different biomaterials, Polyethyleneimine, Deoxyribonucleic Acid and Organophosphorous Hydrolase enzymes. These enzymes catalyze the hydrolysis of phosphorus compounds such as organophosphorous neurotoxins. The different polyelectrolyte solutions were characterized by the technique of surface plasmon resonance, and simultaneously, self-assembled monolayers were formed on the surface of a glassy carbon electrode. The enzymes activity was analyzed by cyclic voltammetry for the different concentrations of the solutions used. The results showed that the surface plasmon resonance characterization promote the control of electrostatic adsorption. The variation of the surface plasmon resonance angle corresponds the intensity and saturation of electrostatic

interactions between the layers. Biosensors developed with solutions of higher concentration, consequently, widened the detection limits, and increased the resolution of the electrical signal. In applications to measure low concentrations of analyte, adequate control of the concentrations of polyelectrolytes solutions reduces costs in the development of biosensors especially, the cost of isolated enzymes.

Keywords: Biosensors, Carbon Nanotubes, Enzyme Immobilization, Surface Plasmon Resonance, Cyclic Voltametry, and Organophosphorus Hidrolases

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REAÇÃO CATALÍTICA COM A ENZIMA HIDROLASE DE ORGANOFOFORADOS.	21
FIGURA 2 - ILUSTRA A EXPLICAÇÃO DA TEORIA DE MICHAELIS-MENTEN	22
FIGURA 3 - ILUSTRAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA	24
FIGURA 4 - MODELO PASSO-A-PASSO DA ARQUITETURA DO BIOFILME	43
FIGURA 5 - ILUSTRAÇÃO DOS PRINCIPAIS ITENS QUE COMPÕEM O SETUP EXPERIMENTAL.....	44
FIGURA 6 - RESULTADO DAS ANÁLISES DE RESSONÂNCIA DE PLASMONS DE SUPERFÍCIE	52
FIGURA 7 - GRÁFICO DE BARRAS REPRESENTANDO A OS DESLOCAMENTOS DOS ÂNGULOS SPR	54
FIGURA 8 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA O BIOSENSOR DESENVOLVIDO COM AS SOLUÇÕES À BASE NANOTUBOS DE CARBONO NA CONCENTRAÇÃO DE 0.1MG/ML COMBINADA COM AS SOLUÇÕES POLIELETROLÍTICAS EM RESPOSTA AS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 20, 40, 80, 160 UM DE PX	56
FIGURA 9 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA O BIOSENSOR DESENVOLVIDO COM AS SOLUÇÕES À BASE NANOTUBOS DE CARBONO NA CONCENTRAÇÃO DE 0.2MG/ML COMBINADA COM AS SOLUÇÕES POLIELETROLÍTICAS EM RESPOSTA AS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 20, 40, 80, 160 UM DE PX	57
FIGURA 10 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VOLTAMETRIA CÍCLICA PARA O BIOSENSOR DESENVOLVIDO COM AS SOLUÇÕES À BASE NANOTUBOS DE CARBONO NA CONCENTRAÇÃO DE 0.5MG/ML COMBINADA COM AS SOLUÇÕES POLIELETROLÍTICAS EM RESPOSTA AS CONCENTRAÇÕES 5, 10, 20, 40, 80, 160 UM DE PX	58
FIGURA 11 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS BIOSENSORES	59

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Amperes
AChE	Acetilcolinesterase
Ag	Prata
AgCl	Cloreto de Prata
Au	Ouro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico (Deoxyribonucleic Acid)
LbL	Camada à camada (Layer by Layer)
NTC	Nano Tubos de Carbono
M	Molar (moles/litro)
MWCNT Carbon Nanotube)	Nanotubos de carbonos de paredes múltiplas (Multi-Walled
OPH Hydrolase)	Hidrolase de Organofosforados (Organophosphorus
PEI	Polietilenoimina (Polyethyleneimine)
PX	Paraoxon
SAM Monolayers)	Monocamadas Auto-Organizadas (Self-Assembled
V	Volt

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	16
Objetivo	17
Justificativa	17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 – Neurotoxinas	20
2.2 – Enzimas em Biossensores.....	21
2.3 - Imobilização das enzimas	26
2.4 - SPR	28
2.5 – Sensores Eletroquímicos	30
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 – Equipamentos e Acessórios Utilizados	33
3.2 – Produtos Químicos.....	35
3.3 – Beneficiamentos dos nanotubos de carbono para criar grupos carboxila (-COOH) na superfície	36
3.4 – Soluções à base de nanotubos de carbono combinados com polietilenoimina (CNT-PEI)	37
3.5 – Solução à base de nanotubos de carbono combinados com ácido desoxirribonucléico (CNT-DNA)	39
3.6 – Imobilizações das enzimas hidrolase de organofosforados em nanotubos de carbono (CNT-OPH)	40
3.7 – Limpeza e calibração do chip SPR.....	41

3.9 – Polimentos do sensor eletroquímico.....	42
3.10 – Caracterizações por SPR e conformação do biofilme.....	42
3.11 – Caracterizações por voltametria cíclica	45
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	46
4.1 – Detalhamentos do Arranjo Experimental.....	46
4.2 – Produção das Soluções do Biofilme.....	46
4.3 - Caracterização por SPR	49
4.4 - Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica	55
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	61
CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS FUTURAS	64
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão apresentados respectivamente a contextualização do problema, o objetivo e a justificativa.

Biossensores, conforme definido pela IUPAC[1], são dispositivos que envolvem reações bioquímicas específicas mediadas pelo isolamento de enzimas, anticorpos, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar componentes químicos, usualmente por sinais elétricos, térmicos, ou ópticos. Estes dispositivos são capazes de fornecer um diagnóstico rápido e seletivo para um determinado analito, podendo ser utilizados com facilidade tanto em laboratórios como em qualquer outro ambiente [2-5].

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clarck e Lyons em 1962, quando se imobilizou fisicamente enzimas do tipo glicose oxidase em uma membrana de cuprofano que foi acoplada a um eletrodo de oxigênio. Assim, um sensor eletroquímico para medir concentrações de oxigênio dissolvido em fase líquida foi transformado em um biossensor com a incorporação de uma membrana ou camada funcional contendo enzimas. Desde então, esta abordagem passou a ser utilizada com frequência, por exemplo, transformando sensores de pH em biossensores. Atualmente, diversos modelos de biossensores estão sendo produzidos para uma vasta gama de aplicações, especialmente para medicina diagnóstica e monitoramento ambiental. Embora a comercialização de biossensores tenha se expandido, há ainda uma enorme

demanda por novas aplicações [6, 7], especialmente para aplicações em campo.

Os biossensores mais populares utilizam o princípio eletroquímico e fotométrico [7-9], que associados a técnicas de fabricação de microeletrônica tem possibilitado o desenvolvimento de microsensores. Em particular, através dos processos de serigrafia e de circuito impresso é possível a miniaturização dos biossensores, proporcionando maior economia e maior precisão nos resultados.

O maior desafio na fabricação de novos biossensores é a identificação e construção da camada bioativa. A fabricação do transdutor, no qual a camada bioativa é acoplada, está relativamente mais consolidada, embora esteja em constante aperfeiçoamento [10-13].

Objetivo

O objetivo deste trabalho é desenvolver uma camada bioativa para a detecção de neurotoxinas organofosforadas, para ser empregada em análises ambientais. Em especial este trabalho visa estudar a obtenção de camadas auto-organizadas de biofilmes finos, a aplicabilidade da técnica de ressonância de plasmons de superfície na caracterização dos biofilmes finos e a avaliação dos biossensores por voltametria cíclica.

Justificativa

A utilização de pesticidas, especialmente nas grandes plantações, tem provocado a contaminação dos corpos hídricos e, conseqüentemente, toda a cadeia alimentar é prejudicada, inclusive os seres humanos. Esta contaminação pode acarretar diversas enfermidades, como, por exemplo,

distúrbios neurológicos. A contaminação, dos corpos hídricos por pesticidas organofosforados, pode também favorecer a eutrofização em consequência do aumento do nível de fósforo total.

A portaria N.º 2914, de 12 de Dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de qualidade no qual o princípio ativo dos pesticidas organofosforados, o elemento parationa metílica apresentam valor máximo permitido de 9ug/L.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No capítulo 2 será apresentada a revisão bibliográfica sobre a aplicação dos biossensores estudados, a utilização de enzimas, as técnicas de imobilização de enzimas e o princípio de funcionamento das técnicas de caracterização por ressonância de plasmons de superfície e por voltametria cíclica.

Apesar do avanço que os biossensores alcançaram após a popularização dos medidores de glicose, e da introdução de outros medidores no mercado, como exemplo os medidores de triglicérides, de coagulação entre outros, há ainda uma carência de uma variedade expressiva de biossensores, especialmente que venham a ser aplicados na medicina diagnóstica preventiva, como por exemplo, medidores dos índices de vitaminas e sais minerais e em aplicações de monitoramento ambiental, como por exemplo, para medir a concentração de microorganismos ou de contaminantes ativos biologicamente.

Visando a aplicabilidade deste trabalho, a detecção de pesticidas em águas pelo método convencional, de espectrometria de massa por cromatografia líquida, é relativamente demorada e de custo elevado, especialmente pela complexidade e dificuldade de utilização em monitoramento contínuo. Assim, há a necessidade de novos métodos que sejam mais eficientes, especialmente nas extensas propriedades rurais, nas quais é utilizada uma grande quantidade de pesticidas no manejo agrícola.

2.1 – Neurotoxinas

As neurotoxinas usadas em pesticidas e outras armas químicas têm como princípio de funcionamento atacar o sistema neurológico, desregulando as trocas sinápticas a partir da inativação da enzima acetilcolinesterase (AChE). A inibição da reação catalítica, que hidrolisa o elemento neurotransmissor acetilcolina, resulta em um aumento desequilibrado das trocas sinápticas das células do sistema nervoso que prejudica, consequentemente, outros órgãos [14].

Há diversos tipos de pesticidas sendo que os organoclorados, organofosforados e os carbamatos são os principais tipos aplicados na agricultura. Os pesticidas organoclorados têm sido banidos devido a sua ação fortemente cancerígena. As neurotoxinas compostas por carbamato tendem a uma inibição reversível da acetilcolinesterase, o que faz com que seja menos agressivo que os demais pesticidas. Os compostos organofosforados tendem a uma inibição irreversível e apresentam menor valor de mercado [15].

As neurotoxinas organofosforadas foram primeiramente desenvolvidas na Alemanha aproximadamente em 1930 visando ser aplicada como arma química na segunda guerra mundial, devido à imediata sensação de choque, paralisia muscular e redução da visão. Após a segunda guerra mundial, estudos demonstraram que essas neurotoxinas poderiam ser utilizadas em baixas concentrações como pesticidas devido à alta letalidade provocada em insetos, sendo aparentemente inofensivas a outros animais. Entretanto, o efeito crônico acumulativo das neurotoxinas nos animais também provoca complicações neurológicas [16-18].

2.2 - Enzimas em Biossensores

Uma enzima é uma molécula protéica quaternária capaz de catalisar uma reação química com elevada especificidade [19, 20].

Biossensores que utilizam enzimas como elemento bioativo apresentam basicamente dois mecanismos de conversão neste sistema. O primeiro mecanismo realiza uma reação catalítica provocada pela enzima. O segundo mecanismo envolve uma reação necessária para a detecção no transdutor [20, 21].

Neste trabalho, o primeiro mecanismo ocorre com a reação catalítica de uma molécula de água e uma molécula de paraoxon que não é eletroativo, ou seja, não é um elemento químico detectável pelo sensor eletroquímico. O produto da atividade de enzimas do tipo hidrolase de organofosforados resulta em uma molécula de dietilfosfato, dois átomos de hidrogênio ionizados e paranitrofenol que este é eletroativo, conforme ilustrado na figura 1. No segundo mecanismo do biossensor o paranitrofenol é oxidado à 0,950V no eletrodo Ag/AgCl.

Figura 1 - Reação catalítica com a enzima hidrolase de organofosforados.

Na figura 2, é apresentado o modelo de Michaelis-Menten para a cinética das reações catalíticas com uma determinada enzima, na qual relaciona a concentração de substrato consumido na reação catalítica pelas enzimas e a máxima taxa de reação das enzimas obtida quando o substrato não é um fator limitante para a formação do produto da reação catalisada, ou seja, que todas as enzimas estão participando para catalisar a reação bioquímica e que a quantidade de substrato da reação é maior do que a quantidade de enzimas [22].

Figura 2 - Ilustra a explicação da teoria de Michaelis-Menten

A seguinte equação exemplifica o mecanismo da reação bioquímica que ocorre no biossensor:

Onde: $K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$

Sendo:

S = Substrato da reação catalisada pela enzima

E = Enzima

P = Produto

k_1 = Taxa de associação do complexo enzima-substrato

k_{-1} = Taxa de dissociação do complexo enzima-substrato

k_2 = Taxa de dissociação do complexo enzima-produto

K_M = Constante de Michaelis.

A taxa associação do substrato da reação ao sítio ativo da enzima é determinado pela constante k_1 . A taxa da dissociação do substrato da reação que ao preencher o sítio ativo da enzima retorna ao estado inicial é determinada pela constante k_{-1} . A taxa de dissociação da reação química que é determinada pela constante k_2 por catalisar o substrato da reação que é modificado pelo sítio ativo da enzima resultando no produto da reação. A constante de Michaelis-Menten relaciona as três constantes anteriormente mencionadas, indicando as características em função da concentração de substrato da reação e a taxa de reações catalisadas pela enzimas.

O modelo “Lock and key” (fechadura e chave), proposto por Emil Fischer, ganhador do prêmio Nobel por este trabalho, compara as reações catalisadas por enzimas com uma chave e uma fechadura. Nesta analogia, mostrada na figura 3, considerando o substrato da reação catalítica, como a amostra (chave), reagindo com a enzima ao preencher o sítio ativo (fechadura). Esta analogia também torna explícita a alta especificidade das reações enzimáticas [23].

Figura 3 - Ilustração da atividade da enzima

As reações catalíticas com as enzimas ocorrem com a redução da energia de ativação da reação química que transforma o substrato da reação em produto da reação, ou seja, ocorre o suprimento da energia mínima para que uma reação ocorra, provocando um aumento da taxa de reação catalisada. A reação catalítica não altera quimicamente a reação, altera apenas a taxa da reação [24].

Algumas enzimas podem precisar de um componente adicional, chamado de cofator, que é ligado a outra região específica da enzima que não seja o sítio ativo e somente com participação do cofator e do substrato a enzima catalisa a reação [25].

Adicionalmente, as enzimas podem sofrer uma inibição, devido à ocupação do sítio ativo da enzima por uma substância química que atua como um falso substrato para a enzima, impedindo que as reações catalíticas ocorram adequadamente. O substrato da enzima, quando provoca a inibição, é considerado um contaminante. Como exemplo, a utilização dos pesticidas provoca a inibição dos neurotransmissores, ou seja, provoca a inibição da enzima acetilcolinesterase. [26]

A desnaturação das enzimas é um processo, na sua maioria irreversível, no qual a enzima sofre uma deformação ou até mesmo dissociação por diversos fatores possíveis como temperatura, pressão, pH, entre outros.

As enzimas podem ser classificadas em seis categorias principais, conforme o número EC do inglês, "Enzyme Commission Number": [27]

1. Oxidorredutase – catalisam as reações de oxidação e redução
2. Transferase – catalisam a transferência de grupos funcionais de uma molécula doadora para outra aceitadora
3. Hidrolase – catalisam as hidrólises, clivando ligações do substrato por meio da captação de moléculas de água. Esta é a classe de enzimas estudadas neste projeto que permite catalisar as reações químicas de hidrolise com as neurotoxinas organofosforadas.
4. Liase – catalisam a quebra de ligações químicas, favorecendo a formação de duplas ligações e anéis aromáticos pela adição ou remoção de um grupo químico
5. Isomerase – catalisam um rearranjo na estrutura da molécula de modo a modificar a sua isomeria
6. Ligases – catalisam a ligação entre duas moléculas

As enzimas hidrolase de organofosforados, também conhecidas como OPH do inglês "*Organosphosphorus Hidrolase*", são obtidas a partir de processos de recombinação por E. Coli e têm a capacidade de clivar as ligações P-O, P-F, P-S e P-CN. Portanto, apresentam uma ampla possibilidade de detectar neurotoxinas organofosforadas. Nestas aplicações, a amostra deve ser analisada por diferentes tipos de enzimas, devido à possibilidade da enzima

OPH reagir com outras substâncias que não sejam neurotoxinas. Uma segunda enzima poderia ser utilizada para aumentar a especificidade nestas aplicações [28, 29].

2.3 - Imobilização das enzimas

A região bioativa do biossensor, composta por um material biológico, como por exemplo as enzimas, é responsável pelo reconhecimento da presença do analito alvo na amostra. Em biossensores é desejável a imobilização deste material biológico em uma superfície de modo que seja insolúvel à solução a ser analisada. Este conceito de imobilização sem afetar as características dos materiais biológicos, reduz etapas do processo de análise, diminuindo o custo, aumentando a rapidez e, especialmente, aumentando a exatidão do processo [7, 24, 30-33].

Neste trabalho, as enzimas hidrolase de organofosforados foram imobilizadas covalentemente na superfície dos nanotubos de carbono formando uma solução catiônica que pela técnica de adsorção de monocamadas auto-organizadas por interação eletrostática foi formada a camada bioativa sobre a superfície do eletrodo de trabalho, formado por carbono vítreo.

A imobilização de enzimas pode ser realizada pelas seguintes técnicas:

2.3.1 – Adsorção

O mecanismo imobilização por adsorção baseia-se em ligações de Van der Waals, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. O processamento deste mecanismo é considerado relativamente simples se comparado com os

demais mecanismos. O mecanismo de imobilização por adsorção, de um modo geral, apresenta uma boa reprodutibilidade e menor probabilidade de ocorrer a desnaturação da molécula bioativa em consequência de deformações provocadas por forças interatômicas intensas. Entretanto, devido às forças das ligações interatômicas serem relativamente fracas, as enzimas são mais suscetíveis às variações externas, podendo, com mais facilidade do que os outros mecanismos, provocar a sua desnaturação da camada bioativa por influência de fatores externos como temperatura, pH, pressão entre outros.

As interações eletrostáticas ocorrem devido à diferença de eletronegatividade entre as superfícies, formando duplas camadas de cargas elétricas opostas. Diversas técnicas utilizam a adsorção empregando o princípio das interações eletrostáticas como a técnica de deposição de monocamadas auto-organizadas (SAM, “*Self-Assembled Monolayers*”), também conhecida por técnica de deposição camada à camada (LbL, “*Layer by Layer*”) [11, 30].

Na adsorção por interação eletrostática pode-se aplicar a dopagem eletroquímica para formar eletrodeposição uma camada de enzimas na superfície de um filme polimérico. Pelo controle do pH da solução contendo as enzimas como dopantes no processo de oxidação ou redução possibilita a penetração das enzimas com carga elétrica oposta as cargas do filme polimérico. Um exemplo de um biossensor amperométrico para a detecção de H₂O₂ foi desenvolvido por esta técnica usando nanopartículas de polianilina sintetizadas com ácido dodecilbenzenossulfônico eletrodepositadas sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo [30, 34].

2.3.2 - Retenção em Ambiente Lipídico

A técnica de Langmuir-Blodgett (LB) permite construir uma camada lipídica sobre uma superfície sólida na qual é possível controlar com precisão a espessura e a organização molecular. De modo similar a técnica SAM, esta técnica possibilita a organização de camadas ultrafinas adequadas para a imobilização de enzimas [30, 35].

2.3.3 – Ligações cruzadas (Cross-linking)

Por esta técnica, as enzimas podem ser ligadas por agentes bifuncionais como hexametilenodiamina entre outros utilizados para o desenvolvimento de biossensores. Este método é muito utilizado devido a sua simplicidade e pela forte ligação química obtida entre as duas moléculas [30].

2.3.4 – Imobilização Covalente

A imobilização covalente ocorre através da ligação química entre grupos funcionais das enzimas que não são essenciais à atividade catalítica e da superfície, que geralmente é pré-condicionada por uma ativação da superfície usando reagentes multifuncionais. A imobilização pode ocorrer diretamente na superfície do sensor ou em uma fina membrana fixada em sua superfície. Membranas previamente ativadas são geralmente utilizadas por manter o material biológico sem perda significativa das propriedades por meses. [7, 30]

2.4 - SPR

O fenômeno físico da ressonância de plasmons de superfície, chamado SPR, do inglês “*Surface Plasmons Resonance*”, foi primeiramente observado por Wood, em 1902, aplicado como um detector de alta sensibilidade capaz de

detectar revestimentos monomoleculares. Um entendimento mais completo do fenômeno ocorreu após 1968 [28, 36-39]. Estes estudos mostraram que metais nobres quando excitados por uma onda eletromagnética de comprimento específico geravam uma onda evanescente que se deslocava na sua própria superfície metálica. A onda evanescente foi denominada de plasmon de superfície, sendo que quando há um forte acoplamento entre a oscilação dos elétrons livres do metal com a onda eletromagnética incidente ocorre um fenômeno de ressonância, chamado de ressonância de plasmons de superfície.

Para se criar e detectar uma ressonância de plasmons de superfície utiliza-se tradicionalmente um sistema que incide de um feixe de luz polarizada em um prisma possuindo uma fina camada metálica refletora na face oposta ao feixe, de modo que praticamente toda luz incidente é refletida, agindo como um espelho. O ângulo de incidência do feixe de luz irá induzir na superfície uma ressonância de plasmons de superfície, causada pela alta intensidade de imersão do feixe de luz. Os fótons do feixe de luz polarizada interagem com os elétrons livres do filme metálico, induzindo uma onda de oscilação dos elétrons livres e reduzindo a intensidade da luz refletida.

O ângulo de ressonância ou ângulo SPR é o ângulo no qual ocorre a máxima perda da intensidade do feixe de luz refletido, ou, em outras palavras, onde ocorre a ressonância. O ângulo SPR é dependente das características ópticas do sistema, ou seja, é dependente dos índices de refração dos meios pelos quais o feixe de luz atravessa. Considerando que os índices de refração do prisma e do filme metálico não mudam, o deslocamento resultante do ângulo SPR é correspondente a variação do acúmulo da massa adsorvida na

face oposta ao ângulo de incidência do filme metálico e promove informações da cinética de adsorção sob a superfície em tempo real.

A onda magnética evanescente observada é aquela que se estende para fora do metal, geralmente não excedendo algumas centenas de nanômetros, decaindo ao se afastar do filme metálico.

2.5 – Sensores Eletroquímicos

Sensores eletroquímicos são compostos basicamente por um eletrólito e um conjunto de eletrodos: o eletrodo de trabalho, o eletrodo de referência e o contra-eletrodo. O eletrólito é a solução iônica que permite manter um potencial operacional entre os eletrodos. A substância a ser analisada, chamada de analito, pode permear ou estar contida no eletrólito e deve ser eletro ativa, ou seja, é oxidada ou reduzida quando aplicada uma determinada polarização elétrica. Para que ocorra uma reação eletroquímica é necessário no mínimo dois eletrodos, o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho é o local no qual o analito sofre oxidação ou redução sob um determinado potencial elétrico que permita a transferência de cargas entre o eletrodo de trabalho e o analito. O eletrodo de referência deve ter potencial conhecido permitindo medir a diferença de potencial em relação ao eletrodo de trabalho durante as reações. No arranjo de dois eletrodos, há situações em que o potencial intrínseco dos eletrodos satisfaz o potencial necessário para que as duas meias reações ocorram espontaneamente. Dependendo se as reações estão reduzindo ou oxidando no eletrodo de trabalho, este pode ser polarizado como catodo ou ânodo. Embora seja um arranjo viável, o sensor eletroquímico de dois eletrodos torna difícil para o eletrodo de referência manter o potencial constante enquanto contabiliza a corrente elétrica, que atravessa estes dois

eletrodos, correspondente as reações redox que ocorrem nos eletrodos. Para solucionar este problema, foram divididas as funções de promover um potencial de referencia estabilizado e efetuar a medição da corrente elétrica correspondente a reação redox do analito, formando um sensor eletroquímico de três eletrodos.

No arranjo de três eletrodos, a função do eletrodo de referência é medir o potencial aplicado no eletrodo de trabalho e entre eles a corrente é nula. O eletrodo auxiliar ou contra eletrodo permite que seja aplicada uma diferença de potencial em relação ao eletrodo de trabalho para monitorar a corrente elétrica das reações eletroquímicas. Caso a diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho esteja desbalanceada, é aplicado uma tensão entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo para compensar o potencial desbalanceado do eletrodo de trabalho. Geralmente, o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo são produzidos por materiais inertes como ouro, prata, platina e carbono vítreo e frequentemente, o contra-eletrodo têm uma área superficial muito maior do que a do eletrodo de trabalho. As reações que ocorrem no contra-eletrodo devem ocorrer rapidamente para que não limite as meias reações no eletrodo de trabalho. O eletrodo de referência é construído por materiais de potencial bem definido para monitorar com precisão o potencial do eletrodo de trabalho [40-42].

Neste trabalho foi utilizado um eletrodo de trabalho de carbono vítreo de 3mm de diâmetro da marca BASi modelo UniJet cell, um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata em solução aquosa 3M de cloreto de sódio e junta porosa de 6mm, marca BASi modelo RE-5B e um contra-eletrodo de platina 3mm de diâmetro da marca BASi modelo Disk Electrode e potenciostato da

marca CH Instruments modelo CHI660 conectado ao computador utilizando o software CHI990B.

As técnicas de polarização dos eletrodos podem seguir diversos padrões como voltametria ou amperometria [43]. Por exemplo, na voltametria é aplicada uma diferença de potencial que pode ou não variar ao longo do tempo e mede-se a respectiva corrente elétrica. A potenciometria mede a variação de potencial do sensor eletroquímico sob corrente igual a zero. Cada uma destas técnicas pode ter diferentes configurações de polarização como cronoamperometria, voltametria de onda quadrada, voltametria cíclica entre outras.

Das técnicas eletroquímicas, a voltametria cíclica permite obter informações qualitativas e quantitativas da amostra [44]. Nesta, ocorre uma varredura de potencial e cada pico de corrente é diretamente proporcional à concentração de espécies oxidadas. Esta técnica permite determinar em uma fase inicial do desenvolvimento as características qualitativas dos biossensores.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, inicialmente, serão descritos os equipamentos e materiais utilizados. Em seguida serão apresentados os procedimentos experimentais adotados no desenvolvimento dos biossensores e as técnicas de caracterização.

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvido no laboratório de biomateriais, coordenado pelo professor Dr. Aleksander Simonian, da Universidade de Auburn, estado do Alabama nos Estados Unidos da América.

Os biossensores foram desenvolvidos a partir de três diferentes concentrações dos polieletrólitos funcionalizados na superfície dos nanotubos de carbono. Para verificar se a metodologia de preparação de cada mono camada foi bem sucedida, a técnica de caracterização SPR foi empregada. A técnica eletroquímica por voltametria cíclica confirmou que a caracterização por SPR é válida e confirmou que o produto final do biofilme para as diferentes concentrações funcionou adequadamente.

3.1 – Equipamentos e Acessórios Utilizados

- a) Analisador de ressonância de plasmons de superfície, modelo Big Spreeta fabricado pelas empresas em parceria ICx Nomadics e Texas Instruments. Equipamento conectado a um computador e acessado pelo software MultiSPR. O software MultiSPR permite, em sua interface gráfica, acompanhar em tempo real o valor correspondente ao deslocamento do ângulo SPR. Este parâmetro

pode ser calibrado para correlacionar os valores da variação do ângulo SPR com índice de refração.

- b) Analisador Eletroquímico, modelo CHI660, da fabricado pela empresa CH Instruments. Equipamento conectado a um computador e acessado pelo software CHI990b. O software CHI990b possibilita uma interface com sensores de dois a quatro eletrodos com 25 diferentes técnicas de polarização baseadas nos princípios de voltametria, amperometria, coulometria, microscopia de escaneamento eletroquímico, entre outras. Cada uma destas técnicas apresentam diversos parâmetros para a configuração da polarização dos eletrodos e da aquisição deste sinal.
- c) Balança de precisão, modelo Plus AP250D, fabricado pela Ohaus e com precisão de 0,01mg.
- d) Sonda de ultrassom, modelo CV33, fabricado pela Sonics Vibra Cell.
- e) Banho de Ultrassom, modelo1510, fabricado pela Branson IPC.
- f) Placa quente (Hot-plate) com agitador magnético, modelo PC220, fabricada pela Corning Analog.
- g) Centrífuga refrigerada, modelo 5415R, fabricada pela Eppendorf.
- h) Sistema de Deionização da água, modelo Direct-Q 5 (resistividade $18\text{M}\Omega\text{cm}^{-2}$), fabricado pela Millipore.
- i) Agitador do tipo Vórtice, modelo KMC 1300, fabricante Vision Scientific.

- j) Aparatos para filtração em vácuo, utilizando filtro membrana em policarbonato/PTFE, com malha de 0,2µm, fabricado pela Watchman.
- k) Bomba Peristáltica, modelo DI-4C, fabricada pela Ismatec.
- l) Pipetas de várias graduações, modelo II, fabricada pela Finnpiquette.
- m) Luvas.
- n) Máscara Facial Completa.
- o) Avental.

Todos os eletrodos no modelo cilíndrico encapsulado em Teflon, fabricado pela BASi UniCell.

- p) Eletrodo de trabalho em carbono vítreo de 3mm de diâmetro, modelo UniJet cell.
- q) Eletrodo de Referência de prata/cloreto de prata, modelo RE-5B.
- r) Contra Eletrodo em platina de 3mm de diâmetro, modelo Disk Electrode.

3.2 – Produtos Químicos

- a) Enzimas Hidrolase de Organofosforados, concedidas cordialmente pelo Dr. James Wild e seu grupo de pesquisa da Universidade do Texas A&M.
- b) Paraoxon, adquirido da ChemService.

Todos os próximos produtos químicos foram comprados da empresa Sigma Aldrich:

- c) Nanotubos de carbono, 95% de pureza, preparados por CVD, código Sigma Aldrich 724769.
- d) Ácido Desoxirribonucleico (DNA), sal de esperma de salmão liofilizado
- e) N-hidroxissuccinimida (NHS)
- f) N-Etil-N (3-Dimetilaminopropil) Carbodiamida (EDC)
- g) Solução tamponada de fosfato salino (PBS)
- h) Ácido Nítrico (HNO_3)
- i) Ácido Sulfúrico (H_2SO_4)

3.3 - Beneficiamentos dos nanotubos de carbono para criar grupos carboxila (-COOH) na superfície

Os nanotubos de carbono em pó utilizados para a produção das soluções aniônicas CNT-PEI e CNT-OPH, passam por um processo de digestão ácida com a finalidade de formar grupos carboxila na superfície. Estes nanotubos de carbono processados (CNT-COOH) favorecem a formação das ligações secundárias.

Inicialmente, 50 gramas de nanotubos de carbono em pó são dispersos no banho de ultrassom em béquer de 2 litros contendo 150 mililitros de ácido sulfúrico e 50 mililitros de ácido nítrico por 6 horas.

Este processo é realizado em uma capela com fluxo de ar forçado e com os adequados equipamentos de segurança como, máscara facial completa,

luva de punho longo e avental. A solução é fortemente ácida, portanto, os procedimentos devem ser cuidadosamente executados.

Em seguida, foram adicionados 800 mililitros de água deionizada e o processo de dispersão por ultrassom é mantido por 12 horas. A solução é filtrada à vácuo utilizando o filtro do tipo membrana composta por teflon e policarbonato com malha de 0,2 micrometros, primeiramente o filtro é umidificado com isopropílico para reduzir os efeitos do ataque ácido. O filtro escoar lentamente a solução ácida e retém os nanotubos de carbono. Após a completa filtração, 1 litro de água é adicionado aos poucos no filtro com o auxílio de uma pisseta para aproximar as nano partículas do pH neutro.

Por fim, a membrana, que é cuidadosamente retirada do filtro, é colocada em uma estufa na temperatura de 80° C por 12 horas. A camada sólida, no formato de uma película quebradiça de nanotubos de carbono, pode ser facilmente descolada da membrana e este pó obtido é a seguir disperso por banho em ultrassom, durante 45 minutos em água deionizada, formando uma solução com concentração de 4mg/mL de CNT-COOH em um tubo de vidro estéril.

Os grupos funcionais carboxílicos, na superfície dos nanotubos de carbono, favorecem a formação de ligações covalentes com outras moléculas.

3.4 – Soluções à base de nanotubos de carbono combinados com polietilenoimina (CNT-PEI)

Inicialmente, polietilenoimina em pó é diluído em água deionizada formando uma solução com concentração de 20mg/mL.

A solução final segue a proporção de 1:2 de polietilenoamina (PEI) e nanotubos de carbono com grupos funcionais carboxila (CNT-COOH).

A quantidade necessária da solução com concentração de 20 mg/mL de PEI é igual ao volume final desejado em mL, multiplicado pela concentração final desejada, em mg/mL e dividido por 20.

A quantidade da solução com concentração de 4 mg/mL de CNT-COOH é igual ao volume final desejado em mL, multiplicado pela concentração final desejada, em mg/mL e dividido por 2.

Em um frasco de vidro estéril é adicionada a quantidade necessária das soluções à base de PEI e de CNT-COOH e o volume total é completado com água deionizada.

O frasco contendo a mistura é agitado no tipo vórtice durante 2 minutos e em seguida é colocado na sonda de ultrassom com amplitude de vibração na ponta da sonda de 20% por 1 hora para uma completa dispersão. Para reduzir o aquecimento, o processo é realizado em banho com cubos de gelo.

Em seguida, a solução passa pelo processo de centrifugação a 13200 RPM, temperatura de 22°C, por 1 hora, para reduzir a quantidade de polímeros que não foram combinados com os nanotubos de carbono.

A solução flutuante com aparência translúcida é retirada com o auxílio de uma pipeta. O volume final da solução resultante é completado com água deionizada e a solução é novamente dispersa no banho por ultrassom por 5 minutos e estocada em um refrigerador.

3.5 – Solução à base de nanotubos de carbono combinados com ácido desoxirribonucléico (CNT-DNA)

Neste procedimento, a solução final segue a proporção de 1:1 de ácido desoxirribonucléico (DNA) e nanotubos de carbono puro.

Em um frasco de vidro estéril foi colocado o ácido desoxirribonucléico, sendo a quantidade igual à concentração final multiplicada pelo volume final. A quantidade de água deionizada adicionada ao frasco é igual ao volume final. Esta solução é levada à placa quente à temperatura de 35°C por 45 minutos. Em seguida, foram adicionados ao frasco os nanotubos de carbono puro, em quantidade igual à quantidade de DNA utilizada.

O processamento segue de modo similar ao descrito sobre a solução CNT-PEI. O frasco contendo a mistura é agitado durante 2 minutos e em seguida é colocado na sonda de ultrassom com amplitude de vibração na ponta da sonda de 20% por 1 hora para uma completa dispersão. Para reduzir o aquecimento, o processo é realizado em banho com cubos de gelo.

Em seguida, a solução passa pelo processo de centrifugação a 13200RPM, temperatura de 22°C, por 1 hora, para reduzir a quantidade de polímeros que não foram combinados com os nanotubos de carbono.

A solução flutuante com aparência translúcida é retirada com o auxílio de uma pipeta. O volume final da solução resultante é completado com água deionizada e a solução é novamente dispersa no banho por ultrassom por 5 minutos e estocada em um refrigerador.

3.6 – Imobilizações das enzimas hidrolase de organofosforados em nanotubos de carbono (CNT-OPH)

A solução final segue a proporção de 1:1 de enzimas OPH (PEI) e nanotubos de carbono com grupos funcionais carboxila (CNT-COOH).

A quantidade da solução com concentração de 4 mg/mL de CNT-COOH é igual ao volume final desejado em mL, multiplicado pela concentração final desejada, em mg/mL e dividido por 4. Esta quantidade é colocada em um frasco de vidro estéril. A solução tamponada MES de concentração 50mM, pH 4.7 na quantidade de um quarto do volume final é adicionada ao frasco e agitada durante 2 minutos. Então, para cada mililitro do volume final foi adicionado 61,44 mg de N-Etil-N (3-Dimetilaminopropil) Carbodiamida e para cada mililitro do volume final foi adicionado 4,34 mg de N-hidroxissuccinimida. O frasco foi completado com água até alcançar o volume final e colocado no agitador magnético por 30 minutos.

Em seguida, a solução é filtrada a vácuo. A membrana do filtro, com o auxílio de uma pipeta, é lavada com *buffer* fosfato em concentração 10mM e pH 8.3 com a mesma quantidade do volume. A solução foi novamente dispersa por 5 minutos em banho por ultrassom.

As enzimas hidrolase de organofosforados, estocadas em congelador em tubos de 0,5mL com concentração de 1mg/mL, foram adicionadas na quantidade igual ao volume final multiplicado pela concentração final e a solução ficou dispersa por 30 segundos em banho por ultrassom. A solução é mantida em agitação a 4°C por 12 horas.

Por fim, a solução foi centrifugada à 13200RPM, por 1 hora, a 4°C por três vezes. Após cada centrifugação, a solução é completada até o volume final determinado com buffer fosfato em concentração 10mM e por 30 segundos, é dispersa em banho por ultrassom.

3.7 – Limpeza e calibração do chip SPR

O chip SPR conforme a ilustração na figura 5, item A, é um componente integrado em que a face espelhada de metal nobre, neste caso o ouro, é acoplado a uma conexão do tipo flange e a uma membrana que permite o fluxo de um determinado fluido, como os polieletrólitos utilizados neste trabalho. No lado oposto da superfície metálica exposta está fixada uma grade de difração que absorve a luz incidente de um diodo emissor de luz (led) colimado e redireciona o feixe difratado para um espelho que reflete um arranjo de diodos (diodo array) de 128 pixels lineares.

O chip SPR imediatamente antes do uso passa por um procedimento de limpeza, em sua superfície de ouro, com as seguintes etapas:

O chip SPR é imerso em água deionizada em um Becker e levado ao banho por ultrassom durante 10 minutos.

A superfície de ouro é seca com nitrogênio gasoso.

Com o auxílio de uma pipeta, 20 microlitros da solução, feita na proporção 3:1 de ácido sulfúrico e água oxigenada, é gotejada de modo a cobrir a superfície de ouro. Em seguida aguarda-se 2 minutos para finalização da reação química e então a superfície é lavada com uma pisseta contendo água deionizada.

A seguir, a superfície é lavada com uma pisseta contendo álcool isopropílico e novamente seca com nitrogênio gasoso.

Finalizando, o chip foi colocado em uma câmara de limpeza por plasma em ar atmosférico sob a luz ultravioleta por três minutos.

Concluído o processo de limpeza, o chip SPR foi calibrado com dois pontos padrões de medição. O primeiro ponto de calibração é feito com ar atmosférico e o segundo é feito com água deionizada. Se o gráfico de calibração estiver em conformidade, o chip SPR está pronto para o uso. Caso contrário, o processo de limpeza deverá ser feito novamente.

3.9 – Polimentos do sensor eletroquímico

Antes do uso, o eletrodo de trabalho de carbono vítreo foi polido com a utilização de três diferentes granulometrias de microesferas de alumina de diâmetro 1 μ m, por 3 minutos, 0,1 μ m por 5 minutos e 0,05 μ m por 5 minutos.

3.10 – Caracterizações por SPR e conformação do biofilme

Com as amostras homogeneizadas e logo após a calibração adequada, a referência de água deionizada continua fluindo pelo sensor SPR por meio da bomba peristáltica. A partir daí inicia a troca das soluções para obter o biofilme desejado, conforme é ilustrado na Figura 4.

A primeira metade da camada bioativa que promove a superfície do sensor, intercala por adsorção de monocamadas auto-organizadas pelo princípio da interação eletrostática a solução catiônica contendo polietilenoimina, ligadas covalentemente a superfície dos nanotubos de

carbono, com a solução aniônica contendo ácido desoxirribonucléico, ligadas covalentemente a superfície dos nanotubos de carbono.

Figura 4 - Modelo passo-a-passo da arquitetura do biofilme deste trabalho.

A segunda metade da camada bioativa contém as enzimas imobilizadas covalentemente na superfície dos nanotubos de carbono na forma de uma solução aniônica que por adsorção de monocamadas auto-organizadas pelo princípio da interação eletrostática permite construção de camadas intercaladas com a solução aniônica contendo ácido desoxirribonucléico, ligadas covalentemente a superfície dos nanotubos de carbono.

Três diferentes concentrações de camada bioativa foram desenvolvidas seguindo a mesma arquitetura apresentadas na figura 4 de monocamadas auto-organizadas. As técnicas apresentadas nos itens 3.4, 3.5 e 3.6 deste capítulo foram utilizadas para obter as concentrações 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 0,5mg/mL de nanotubos de carbono. Em cada solução produzida, a

concentração do respectivo polieletrólito e igual concentração de nanotubos de carbono utilizada na solução.

Como este equipamento é semi-automático, a troca das amostras foi realizada manualmente. Esta etapa exige cuidado para não introduzir bolhas de ar durante a intercalação dos tubos. Durante a troca das amostras o exato período de tempo e a próxima solução são anotados. No mesmo circuito micro fluídico, as amostras fluem na superfície do sensor SPR e em seguida fluem na superfície do eletrodo de trabalho, formando as monocamadas auto-organizadas (SAM) simultaneamente em ambas as superfícies.

Figura 5 - Ilustração dos principais itens que compõem o setup experimental, o item A ilustra o circuito óptico interno ao chip que inicia na emissão do led colimado, segue para a grade de difração na superfície metálica e segue para o espelho ao topo do chip que reflete no arranjo de

diodos e o circuito microfluídico no qual a amostra percorre a superfície do chip SPR, seguindo pela superfície do eletrodo de trabalho e terminando na bomba peristáltica. O item B é uma imagem real do setup experimental. O item C é uma imagem do chip SPR utilizado. O item D é a membrana em teflon do chip SPR. O item E é a membrana em teflon do eletrodo. Estas membranas formam uma cela de fluxo de 2 microlitros. O item G é composto por dois eletrodos de trabalho de carbono vítreo, antes e após a formação do biofilme.

Após a conformação do biofilme, o eletrodo de trabalho de carbono vítreo passa por um processo de secagem com um suave jato do gás inerte nitrogênio, sendo a seguir, armazenado no refrigerador a 4°C.

3.11 – Caracterizações por voltametria cíclica

Três eletrodos foram utilizados, o eletrodo de trabalho de carbono vítreo com a camada bioativa na superfície, o contra-eletrodo de platina e o eletrodo de referência de Ag/AgCl. Uma câmara de vidro com volume interno de 15mL e uma tampa com suporte para três eletrodos foi preenchida com 5mL da solução de buffer fosfato 20mM e pH 7.4. Utilizando-se esta solução foi obtido o valor da linha de base. A seguir realiza-se a varredura de potencial, em geral entre 0,0V e +1,1V, com onda quadrada e taxa de varredura de 0.01V/s. A tabela com os resultados da varredura de potencial aplicada ao sensor eletroquímico e os valores medidos de corrente elétrica é armazenada pelo software CHI990b e a solução é substituída pela série de concentrações de Paraoxon diluída em Buffer. Foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 μ M de Paraoxon para obter uma curva de calibração de cada biossensor e correlacionar as três concentrações de camada bioativa dos biossensores desenvolvidas.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo será apresentado os resultados e discutido as técnicas utilizadas no desenvolvimento de cada biossensor e das três concentrações de camada bioativa. Inicialmente será discutido a influência dos reagentes e das soluções utilizadas. Posteriormente serão discutidos individualmente os resultados de cada técnica de caracterização.

4.1 – Detalhamentos do Arranjo Experimental

A camada bioativa, ou seja, a camada contendo uma estrutura protéica quaternária complexa, responsável por catalisar a reação química por meio das enzimas, deve ser detalhadamente caracterizada, principalmente com relação à composição química, resistência química e mecânica, durabilidade, limites de detecção, interferentes químicos entre outros.

Dedicamos este trabalho a explorar a técnica de caracterização de biofilmes pela técnica SPR, por apresentar características promissoras que permitem investigar com precisão a formação da camada bioativa, como exemplo, a possibilidade de caracterização, em tempo real e de modo não destrutivo, da interação entre os biomateriais e da resistência da adsorção, para o desenvolvimento das monocamadas auto-organizadas. Em especial, foi possível visualizar, no resultado das análises por SPR, a saturação das duplas camadas e um considerável deslocamento do ângulo SPR após a formação das duplas camadas com os diferentes polieletrólitos.

4.2 – Produção das Soluções do Biofilme

O processamento das soluções à base de nanotubos de carbono combinado com os polieletrólitos apresentou eficientes resultados na

conformação do biofilme, devido à proporcionalidade dos valores conforme mostrado na figura 6.

As ligações eletrostáticas entre as soluções à base de nanotubos de carbono propiciaram a formação de múltiplas monocamadas, favorecendo o aumento da quantidade da substância bioativa e conseqüentemente elevando o nível do sinal elétrico do biossensor. Os nanotubos de carbono também aumentam a resistência mecânica do biofilme e por serem considerados bioinertes ou biotolerantes, são comumente utilizados como interface entre diferentes materiais que originalmente poderiam não formar uma ligação química adequada. Do ponto de vista elétrico, os nanotubos de carbonos podem comportar-se como semicondutores e em função das características dos compostos químicos adicionados, podem apresentar um caráter mais condutor ou isolante. Portanto, de maneira geral, são capazes de formar uma ponte de transferência de elétrons entre as espécies eletroativas e o eletrodo de trabalho. Um ponto negativo em relação à utilização dos nanotubos de carbono, que foi nitidamente observado durante os experimentos, é que após o completo preparo da solução, os nanotubos de carbono tendem a aglomerar e por essa razão é necessária uma etapa de dispersão da solução por banho em ultrassom imediatamente antes do uso. Ainda assim, estas soluções não são adequadas para serem estocadas, pois com o tempo esta coagulação descaracteriza a amostra.

Por outro lado, outro importante atrativo na utilização dos nanotubos de carbono é o fato de proporcionar um aumento da área superficial de cada camada do biofilme, este fenômeno aumenta o desempenho do sensor associado à construção de múltiplas camadas, permitindo por exemplo, neste

trabalho, a formação de 6 camadas homogêneas, sendo as três primeiras duplas camadas destinadas a promover aderência e as três duplas camadas finais destinadas à imobilização das enzimas.

A solução catiônica contendo polietilenoimina, chamada CNT-PEI promoveu camadas com aderência consistente, como é possível verificar no resultado da análise pela técnica SPR na figura 6, em que a intercalação das soluções no circuito microfluídico não remove as camadas auto organizadas anteriores.

A formação uma estrutura primária com três duplas camadas proporciona uma melhor aderência. Durante os experimentos, observou-se que a solução CNT-PEI apresenta mais facilidade de aglomeração dos nanotubos de carbono do que as demais soluções. Isto se justifica pelas próprias características intrínsecas do polietilenoimina que é considerado um bom promotor de aderência e adesivo [45]. Por essa razão, o tempo de dispersão por ultrassom, que imediatamente antecede a utilização desta solução, foi maior do que para as demais soluções.

A solução aniônica contendo ácido desoxirribonucléico, chamada CNT-DNA, permitiu uma adequada compatibilidade com a solução catiônica contendo as enzimas hidrolase de organofosforados, chamada CNT-OPH que proporcionou uma boa atividade catalítica, conforme é verificado nas curvas de calibração dos biossensores da figura 11.

Durante a preparação tanto da solução CNT-DNA como para a solução CNT-OPH, foi possível visualizar que os nanotubos de carbono apresentaram uma excelente dispersão.

Para ambas as soluções, a produção de diferentes concentrações não pode ser feita por diluição, pois os grupos orgânicos funcionalizados na superfície dos nanotubos de carbono não vão corresponder à diluição. Entre os três padrões das soluções utilizadas, a homogeneização da solução CNT-DNA ocorre mais rapidamente.

4.3 - Caracterizações por SPR

A imobilização assistida por SPR permitiu visualizar a construção das camadas bioativas do sensor em tempo real e avaliar as características da interação eletrostática entre as camadas.

Embora haja uma forte correlação entre o deslocamento do ângulo SPR e a espessura da monocamada auto construída, não se pode afirmar que haja uma correlação direta uma vez que o princípio de funcionamento da técnica SPR corresponde tanto à quantidade de matéria adsorvida na superfície metálica como também corresponde variação da estrutura da camada. Por exemplo, se tivéssemos uma solução à base de nanotubos de carbono com um determinado composto químico funcionalizado na superfície de maneira mais compactada e outra solução à base de nanotubos de carbono com um composto químico de cadeia mais extensa, poderíamos obter um deslocamento do ângulo SPR maior para a solução mais compactada quando a quantidade total de matéria adsorvida para ambas as soluções seja a mesma. Por essa razão, uma segunda análise eletroquímica foi realizada conjuntamente e assim, foi possível demonstrar a proporcionalidade entre o deslocamento do ângulo SPR e eficiência da metodologia na construção de cada biossensor.

Na figura 6 são apresentados os resultados das análises de Ressonância de Plasmons de Superfície para as concentrações 0,1mg/mL, 0,2mg/mL e 0,5mg/mL de nanotubos de carbono ligados com os polieletrólitos polietilenoimina (CNT-PEI), ácido desoxirribonucleico (CNT-DNA) e as enzimas hidrolase de organofosforados (CNT-OPH) .

A primeira camada PEI foi auto-organizada sobre a superfície de ouro do sensor SPR, conforme apresentada na figura 4. Simultaneamente, em série no mesmo circuito microfluídico, foi simultaneamente construída a camada bioativa sobre o sensor eletroquímico de carbono vítreo.

Os resultados das análises na Figura 6 mostraram a formação coesiva das ligações entre as camadas, assim como a intensidade da força eletromagnética entre as ligações, que alcançaram o equilíbrio com as intercalações entre os biomateriais aniônicos e catiônicos. Caso não houvesse a existência da interação eletrostática entre as camadas, a solução que é intercalada para formar a seguinte camada provocaria uma dissociação da camada anterior.

Nas três primeiras duplas camadas auto-organizadas, entre CNT-PEI e CNT-DNA, é possível verificar durante o deslocamento do ângulo SPR que ocorre a saturação deste deslocamento, conseqüentemente, indicando a saturação da interação eletrostática entre a solução e superfície anterior. Ao intercalar a solução que entra no circuito microfluídico, em ambos os deslocamentos dos ângulos SPR ocorre a associação entre a superfície previamente adsorvida e a formação de uma nova monocamada auto-organizada sobre a superfície anterior. Caso esta interação não fosse uma

interação associativa, ou seja, fosse uma interação de dissociação, a substituição da solução que está em fluxo removeria a monocamada previamente adsorvida e nesta condição de dissociação da monocamada previamente auto-organizada, o deslocamento do ângulo SPR retornaria ao valor anterior inicial.

Nas três últimas duplas camadas, entre CNT-OPH e CNT-DNA, é possível verificar uma pequena dissociação da camada anterior de CNT-OPH. A explicação lógica para o que acontece nesta condição é que ao intercalar a solução que alimenta o circuito microfluídico a solução de CNT-DNA retira uma fina camada de baixa aderência da monocamada formada pela solução CNT-OPH que apresentava um deslocamento no ângulo SPR saturado. Indicando portanto, que a solução CNT-DNA, apesar de não provocar um deslocamento associativo do ângulo SPR, adsorveu sobre a superfície anterior permitindo um novo e significativo deslocamento do ângulo SPR.

A redução da interação eletrostática é percebida em ambas as três duplas camadas, indicando a saturação desta interação na formação das monocamadas auto-organizadas.

Figura 6 - Resultado das análises de Ressonância de plasmons de superfície

A utilização das duplas camadas intercaladas, formadas pelas monocamadas auto-organizadas (SAM) elevou a quantidade de enzimas imobilizadas na camada bioativa da superfície do eletrodo de trabalho e consequentemente, elevou o limite de concentração de espécies eletroativas a serem detectadas. Ocorre também um aumento na velocidade da resposta, por facilitar a difusão devido à maior quantidade de enzimas imobilizadas.

Através da caracterização por SPR, foi possível determinar em tempo real e com precisão a formação de uma ligação entre as monocamadas, a relativa espessura de cada monocamada, a saturação das interações eletrostática e a confirmação da subsequente interação, podendo esta ser uma interação de associação ou dissociação.

No gráfico de barras da figura 6, é apresentado o valor da variação do deslocamento do ângulo SPR para cada camada que compõe o biofilme. Em ambos as concentrações das soluções para desenvolver a camada bioativa foram possíveis verificar a redução da interação eletrostática.

O deslocamento do ângulo SPR na formação da primeira camada mostra uma elevada diferença eletrostática entre a superfície e a solução que compõe a primeira camada.

Na primeira etapa de cada processo, para os três diferentes tipos de solução, ocorre a maior variação do ângulo SPR. Na sequência, as três primeiras duplas camadas, compostas por CNT-PEI e CNT-DNA, reduzem a variação do ângulo SPR, indicando a tendência de saturação das interações eletrostáticas. Na condição de saturação das interações eletrostáticas, não

ocorre à formação de novas camadas auto depositadas, ou a formação de novas camadas após a saturação é extremamente reduzida.

Figura 7 - Gráfico de barras representando a os deslocamentos dos ângulos SPR

Nas três seguintes duplas camadas, compostas por CNT-OPH e CNT-DNA foi possível ver que os deslocamentos dos ângulos SPR também tendem a um valor constante, ou seja, que está sendo alcançado um equilíbrio das interações eletrostáticas. A maior diferença de eletronegatividade entre as duplas camadas CNT-PEI e CNT-DNA, favorece ao maior deslocamento do ângulo SPR para estas camadas. Entretanto, as camadas compostas por CNT-DNA, após a primeira camada de CNT-OPH, tendem ao equilíbrio das interações eletrostáticas, indicando que há uma menor diferença de eletronegatividade entre as soluções CNT-OPH e CNT-DNA do que entre as soluções CNT-PEI e CNT-DNA. Quanto maior a diferença de

eletronegatividade, maior a tendência da monocamada auto-organizada ter uma maior concentração dos polieletrólitos, aumentando o sinal de resposta do biossensor.

4.4 - Caracterização Eletroquímica por Voltametria Cíclica

Os biossensores após a finalização da automontagem das monocamadas, do tipo SAM, na superfície do eletrodo, que simultaneamente foram caracterizadas por SPR, foram secados cuidadosamente com aspersão de nitrogênio gasoso, e em seguida foram caracterizados por voltametria cíclica.

A voltametria cíclica foi empregada especialmente pela capacidade de realizar uma varredura do potencial aplicado ao biossensor, permitindo visualizar no resultado da análise o completo espectro do sinal gerado durante a análise. Técnicas de potencial fixo são freqüentemente utilizadas após a caracterização por varredura de potencial, sendo que o potencial de pico na reação redox representa o valor no qual o potencial pode ser fixado e assim, a determinação da concentração do analito pode ser contínua, favorecendo a maior sensibilidade.

Na metodologia de desenvolvimento de biossensores deste trabalho, no potencial de 0,95V o valor de pico do sinal desloca o valor da corrente elétrica, correspondendo proporcionalmente à concentração do analito na solução promovida pelas reações químicas catalisadas pelas enzimas.

Esta caracterização avaliou que o aumento do sinal elétrico do biossensor está relacionado com o aumento do deslocamento do ângulo SPR, correspondendo ao aumento da concentração de biomateriais funcionalizados

na superfície dos nanotubos de carbono para cada concentração utilizada durante o desenvolvimento dos biossensores.

Nos gráficos da figura 8, foi possível visualizar uma pequena corrente gerada pelas espécies oxidada, nas condições de 80 e 160 μM de PX, indicando que embora muito pequena, ocorreram reações catalíticas com as enzimas hidrolase de organofosforados, hidrolisando as moléculas da neurotoxinas. Paraoxon não é uma molécula eletroativa, deste modo, o produto da reação catalítica resulta na formação da molécula paranitrofenol que é uma molécula eletroativa e, portanto capaz de ser detectada por uma caracterização eletroquímica.

Figura 8 - Resultado da análise de voltametria cíclica para o biossensor desenvolvido com as soluções à base nanotubos de carbono na concentração

de 0.1mg/mL combinada com as soluções polieletrólíticas em resposta as concentrações 5, 10, 20, 40, 80, 160 μ M de PX

Todos os resultados da análise por SPR apresentaram uma correlação coerente entre o nível de sinal e as concentrações das soluções utilizadas no desenvolvimento dos biossensores.

Nas análises por voltametria cíclica também foi possível verificar a eficiência na imobilização das enzimas hidrolase de organofosforados em relação às seis diferentes concentrações das neurotoxinas que foram monitoradas pelo mesmo sensor.

Figura 9 - Resultado da análise de voltametria cíclica para o biossensor desenvolvido com as soluções à base nanotubos de carbono na concentração

de 0.2mg/mL combinada com as soluções polieletrólíticas em resposta as concentrações 5, 10, 20, 40, 80, 160 μ M de PX

Nas curvas obtidas na figura 9 para o biossensor desenvolvido a partir das soluções a base de nanotubos de carbono de concentração 0,2mg/mL e especialmente para a concentração 0,1mg/mL foi possível identificar a saturação do sinal e a similaridade com a curva de saturação da teoria de Michaelis-Menten[7] que representa uma função que após a saturação se torna constante.

Figura 10 - Resultado da análise de voltametria cíclica para o biossensor desenvolvido com as soluções à base nanotubos de carbono na concentração de 0.5mg/mL combinada com as soluções polieletrólíticas em resposta as concentrações 5, 10, 20, 40, 80, 160 μ M de PX

No gráfico, da figura 11, foi obtido a curva de calibração dos biossensores a partir das análises de voltametria cíclica. Pode se observar a proporcionalidade em função das diferentes concentrações. O formato padrão da curva de calibração para estes biossensores segue o mesmo formato da equação de Michaelis-Menten, mostradas na figura 11 para comparação.

Nas curvas obtidas para o biossensor desenvolvido a partir das soluções a base de nanotubos de carbono de concentração 0,2mg/mL e especialmente para a concentração 0,1mg/mL foi possível identificar a saturação do sinal e a similaridade com a equação de Michaelis-Menten que representa uma função que após a saturação se torna constante.

Figura 11 - Curva de calibração dos biossensores

No biossensor desenvolvido a partir das soluções com concentração de 0,2mg/mL foi possível visualizar uma elevada distribuição até as concentrações

de 10mM do analíto Paraoxon. Esta pequena curva no sinal do biossensor mostra que apesar de ter um sinal estreitamente limitado, no caso de uma aplicação com a demanda de detectar baixas concentrações de até 10mM, esta configuração do biossensor atenderia as necessidades, havendo com isto uma racionamento de reagentes e por sua vez uma redução de custo.

No biossensor a base de nanotubos de carbono com concentrações de 0,5mg/mL, embora houve uma ruim distribuição dos resultados medidos, não é possível visualizar a saturação do sinal do biossensor até a maior concentração da neurotoxina analisada. Portanto o biossensor a base de CNT em concentrações de 0,5mg/mL, evidentemente, mostrou o maior limite de detecção. Quanto maior for a concentração das soluções a base de CNT usada, maior será a inclinação do início da reta de calibração e o valor limite de detecção.

O biossensor empregando CNT em concentrações de 0,1mg/mL, apesar de demonstrar as atividades das enzimas imobilizadas, apresentou um sinal insuficientes nestas condições do setup de experimentos.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a técnica de caracterização de Ressonância de Plasmons de Superfície apresenta uma interessante aplicação para o controle da produção de biofilmes do tipo SAMs no desenvolvimento de biossensores, devido à quantificação, pelo sinal do ângulo de ressonância de plasmons de superfície, da interação eletrostática entre as camadas que compõem o biofilme, permitindo assim um monitoramento in situ do processo de automontagem.

A solução bioativa à base de nanotubos de carbono foi utilizada como substrato para a imobilização das enzimas hidrolase de organofosforos que demonstrou uma imediata resposta catalítica, permitindo com praticidade a detecção de neurotoxinas organofosforadas. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para analisar a atividade catalítica das enzimas e determinar a máxima concentração da neurotoxina paraoxon capaz de ser detectada pelos biossensores desenvolvidos.

As soluções à base nanotubos de carbono foram combinadas com Polietilenoimina (PEI) para formar uma solução aniônica. A solução combinada com Ácido Desoxirribonucléico (DNA) por sua vez foi utilizada para formar uma solução catiônica. Estas soluções mostraram-se eficientes em inverter a ligação eletrostática que conseqüentemente, eleva a quantidade de duplas

camadas na superfície do sensor e assim, aumenta o limite máximo de detecção.

O biossensor desenvolvido com as soluções polieletrólíticas de concentrações à base de 0,5mg/mL de nanotubos de carbono, embora o resultado desta análise não tenha apresentado uma boa distribuição, em consequência da maior quantidade de enzimas imobilizadas na camada bioativa, apresentou uma maior capacidade de detecção das neurotoxinas organofosforadas. As duas maiores concentrações analisada de pesticida, ou seja, 80uM e 160uM de Paraoxon, apesar de ser uma concentração elevada, não foram suficientes para atingir a saturação no sinal elétrico do biossensor nessas condições.

O biossensor desenvolvido com as soluções polieletrólíticas de concentrações à base de 0,2mg/mL de nanotubos de carbono iniciou uma aproximação da condição de saturação a partir da concentração de 20uM de Paraoxon, ou seja, a partir desta concentração a sensibilidade foi significativamente reduzida. Nas concentrações inferiores a 20uM de Paraoxon o sinal elétrico correspondente a medição apresentou uma melhor sensibilidade.

O biossensor desenvolvido com as soluções polieletrólíticas de concentrações à base de 0,1mg/mL de nanotubos de carbono, apesar de mostrar que ocorreu a atividade das enzimas, não apresentou um resultado de detecção válido, devida a limitada sensibilidade e ao reduzido limite máximo de detecção.

Portanto, o biossensor desenvolvido com as soluções polieletrólíticas de maior concentração possibilita um elevado limite máximo de detecção e uma maior sensibilidade do sinal de medição, demonstrado pela maior sensibilidade do sinal e maior limite máximo de detecção. Embora, nas aplicações em que há a necessidade de medição de baixas concentrações das neurotoxinas, o controle da concentração das soluções polieletrólíticas reduz os custos no desenvolvimento de biossensores, especialmente o custo com as enzimas isoladas.

CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS FUTURAS

Dando continuidade a este trabalho, outros possíveis polieletrólitos poderiam ser testados buscando uma maior interação eletrostática e desta maneira, uma maior concentração de enzimas na superfície do biossensor.

Stripping análises, ou seja, a tira de eletrodos obtidos pela técnica de serigrafia como utilizado em monitores de glicemia, tem mostrado diversas vantagens como excelente repetibilidade, rápido resultado da medição e apesar de serem descartáveis, são extremamente práticos para uso.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] L. T. K. Lucilene Dornelles Mello, "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries," *Food Chemistry*, vol. 77, pp. 237–256, 2001.
- [2] K. T. Daniel R. Thévenota, Richard A. Durstc, George S. Wilson, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 16, pp. 121-131, 2001.
- [3] P. V. a. P. W. Crump, "Biosensors: Recent Trends A Review," *Analyst*, vol. 117, pp. 1657-1670, 1992.
- [4] A. P. F. T. M.J. Dennison, "Biosensors for environmental monitoring," *Biotechnology Advances*, vol. 13, pp. 1–12, 1995.
- [5] I. A. A. T. Lucas Assirati, Luiz A. O. Nunes, "Use of the linear light sensor ILX554 in optical spectroscopy," *Química Nova*, vol. 35, 2012.
- [6] C. L. Leland C. Clark Jr., "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 102, pp. 29-45, 1962.
- [7] O. F. F. e. M. D. Capelato, "Biossensores," *Química Nova*, vol. 15, pp. 28-39, 1992.
- [8] J. Wang, "Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 19, pp. 47-53, 1999.
- [9] V. B. N. e. L. Angnes, "Eletrodos Fabricados por "Silk-Screen", " *Química Nova*, vol. 21, p. 614, 1998.
- [10] X. Y. J. S. Kirsch, and A. L. Simonian, "Layer-By-Layer Catalytic Interface for Electrochemical Detection of Multiple Substrates Featuring Bio-Functionalized Carbon Nanotubes," *ECS Transactions*, vol. 50, pp. 345-355, 2013.
- [11] V. A. P. Saroja Mantha, Eric V. Olsen, Virginia A. Davis, and Aleksandr L. Simonian, "Renewable Nanocomposite Layer-by-Layer Assembled Catalytic Interfaces for Biosensing Applications," *Langmuir*, vol. 26, pp. 19114–19119, 2010.
- [12] B.-S. K. Seung Woo Lee, Shuo Chen, Yang Shao-Horn, and and P. T. Hammond, "Layer-by-Layer Assembly of All Carbon Nanotube Ultrathin Films for Electrochemical Applications," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 131, pp. 671-679, 2008.
- [13] V. B. K. Vijay Shyam Tripathi, Huangxian Ju, "Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on ferrocene-bovine serum albumin and multiwall carbon nanotube modified ormosil composite," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1529–1535, 2006.
- [14] C. N. Pope, "ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES: DO THEY ALL HAVE THE SAME MECHANISM OF TOXICITY?," *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, vol. 2, p. 1999, 2010.
- [15] R. K. H. Ibrahim, S. Helmi, J. Lewis, M. Crane, "Effects of Organophosphorus, Carbamate, Pyrethroid and Organochlorine Pesticides, and a Heavy Metal on Survival and Cholinesterase Activity of

- Chironomus riparius Meigen," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 60, pp. 448-455, 1998.
- [16] C. M. T. Marc-Michael Blum, Gareth R. Williams, Horst Thiermann and Franz Worek, "Inhibitory Potency against Human Acetylcholinesterase and Enzymatic Hydrolysis of Fluorogenic Nerve Agent Mimics by Human Paraoxonase 1 and Squid Diisopropyl Fluorophosphatase," *Biochemistry*, vol. 47, pp. 5216–5224, 2008.
- [17] M. M. Pohanka, Kamil; Kuca, Kamil, "Progress of Biosensors Based on Cholinesterase Inhibition," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 16, pp. 1790-1798, 2009.
- [18] T. P. Ulrich Hoffmann, "Organophosphate poisonings with parathion and dimethoate," *Intensive Care Medicine*, vol. 32, pp. 464-468, 2006.
- [19] J. H. Fendler, "Self-Assembled Nanostructured Materials," *American Chemical Society*, vol. 8, pp. 1616–1624, 1996.
- [20] P. J. Wei Feng a, "Enzymes immobilized on carbon nanotubes," *Biotechnology Advances*, vol. 29, pp. 889–895, 2011.
- [21] K. G. O. Stephen E. Creager, "Self-assembled monolayers and enzyme electrodes: progress, problems and prospects," *Analytica Chimica Acta*, vol. 307, pp. 277–289, 1995.
- [22] T. C. C. a. P. Talaly, "A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 252, pp. 6438-6442, 1977.
- [23] D. E. K. Jr., "The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory," *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 33, pp. 2375–2378, 1995.
- [24] J. J. Dean Brady, "Advances in enzyme immobilisation," *Biotechnology Letters*, vol. 31, pp. 1639-1650, 2009.
- [25] P. W. Wenfang Liua, "Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis," *Biotechnology Advances*, vol. 25, pp. 369–384, 2007.
- [26] H. M. Aziz Aminea, Ilhame Bouraisa, Giuseppe Palleschib, "Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, pp. 1405–1423, 2006.
- [27] A. C. a. D. S. Ida Schomburg, "BRENDA, enzyme data and metabolic information," *Nucleic Acids Research*, vol. 30, pp. 47-49, 2002.
- [28] H. L. Chenggen Xie, Shanqi Li, Ju Wu, and Zhongping Zhang, "Surface Molecular Self-Assembly for Organophosphate Pesticide Imprinting in Electropolymerized Poly(p-aminothiophenol) Membranes on a Gold nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrode," *Analytical Chemical*, vol. 82, pp. 241–249, 2010.
- [29] G. C. Wensheng Lan, Feng Cui, Feng Tan, Ran Liu and and M. Yushupuiang, "Development of a Novel Optical Biosensor for Detection of Organophosphorus Pesticides Based on Methyl Parathion Hydrolase Immobilized by Metal-Chelate Affinity," *Sensors*, vol. 12, pp. 8477-8490, 2012.
- [30] L. J. B. Audrey Sassolas, Béatrice D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 489–511, 2012.

- [31] Q. H. Shakeel Ahmed Ansari, "Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review," *Biotechnology Advances*, vol. 30, pp. 512–523, 2012.
- [32] A. Ulman, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers," *American Chemical Society*, vol. 96, pp. 1533-1554, 1996.
- [33] T. R. F. a. P. T. Hammond, "Designing a New Generation of Proton-Exchange Membranes Using Layer-by-layer Deposition of Polyelectrolytes," *Advanced Functional Materials*, vol. 15, pp. 945-954, 2005.
- [34] C. X. Yongjin Zoua, Li-Xian Suna, Fen Xua, "Glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto carbon nanotubes and immobilizing enzyme with chitosan-SiO₂ sol–gel," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 1010–1016, 2008.
- [35] S. G. Agnès P. Girard-Egrot, Loïc J. Blum, "Enzyme association with lipidic Langmuir–Blodgett films: Interests and applications in nanobioscience," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 116, pp. 205-225, 2005.
- [36] A. B. E.M.S. Azzam, O.Shekha, A.R.E. Alawady, A. Birkner, Ch. Grunwald, Ch. Woll, "Fabrication of a surfaceplasmon resonance biosensor baseed on gold nanoparticles chemisorbed onto a 1,10-decanedithiol self-assembled monolayer," *Thin Solid Films*, vol. 518, pp. 387-391 2009.
- [37] T. T. H. F. Ghaemi, D. E. Grupp, T. W. Ebbesen and H. J. Lezec, "Surface plasmons enhance optical transmission through subwavelength holes," *The American Physical Society*, vol. 58, pp. 6779–6782, 1998.
- [38] T. L. Shuai Shen, and Jihua Guo, "Optical Phase-Shift Detection of Surface Plasmon Resonance," *Applied Optics*, vol. 37, pp. 1747-1751, 1998.
- [39] R. V. Stahelin, "Surface plasmon resonance: a useful technique for cell biologists to characterize biomolecular interactions," *The American Society for Cell Biology*, vol. 24, pp. 883-886, 2013.
- [40] G. L. a. Y. Lin, "Electrochemical Sensor for Organophosphate Pesticides and Nerve Agents Using Zirconia Nanoparticles as Selective Sorbents," *Analytical Chemistry*, vol. 77, pp. 5894-5901, 2005.
- [41] Y. G. Mustafa M. Musameha, Mark Hickeya and Ilias Louis Kyratzisa, "Application of Carbon Nanotubes in the Extraction and Electrochemical Detection of Organophosphate Pesticides: A Review," *Analytical Letters*, vol. 45, pp. 783-803, 2012.
- [42] J. W. Joshua Ray Windmiller, "Wearable Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review," *Electroanalysis*, vol. 25, pp. 29-46, 2012.
- [43] Z. M. d. Rocha, "Microlaboratórios Autônomos para Monitoramento de Parâmetros de Qualidade da Água," Tese (Doutorado), Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.
- [44] L. M. Aleixo. (2003). *Voltametria: Conceitos e Técnicas*. Available: www.chemkeys.com
- [45] N. R. A. a. P. Raman Bhulekar, "Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 13, pp. 858–868, 1991.