UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA Programa de Pós-Graduação em Química

Programa de Pos-Graduação em Química

MARIANA PEREIRA MASSAFERA

Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia

> São Paulo 06/10/2010

MARIANA PEREIRA MASSAFERA

Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Susana Inés Córdoba de Torresi

São Paulo 2010 Mariana Pereira Massafera

Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia.

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Química.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	
Prof. Dr.	
Instituição:	
Assinatura:	

À Leilinha, minha mãe, amiga e companheira, cujo apoio e incentivo incondicionais foram fundamentais no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

 Aos Profs. Susana e Roberto Torresi, pela receptiva acolhida desde o primeiro contato, por tudo que me ensinaram, pela excelente orientação, pela confiança e pelo futuro profissional que me ajudaram a construir.

À FAPESP, pelo apoio financeiro desde a iniciação científica, e aos demais órgãos de fomento (CNPq, INCT-Bioanalítica, CNRS).

Ao Instituto de Química da USP, pela ótima infra-estrutura oferecida, e aos seus funcionários, pela colaboração.

À Profa. Dra. Teresa Iwasita, por ter me introduzido no universo da pesquisa, e cuja postura acadêmica é e sempre será um referencial para mim.

Aos Professores que me ensinaram muito e me motivaram, e nos quais me espelho até hoje: Edson Cau (Colégio Villa Lobos), Hidetake Imasato, Ubirajara P. Rodrigues Filho, Francisco C. Nart, Ernesto R. Gonzalez (IQSC-USP) e Paulo Teng (IQ-USP).

 À minha mãezinha Leila e meu irmão Gabiru, que fizeram vários sacrifícios para estar sempre ao meu lado, seja em São Carlos ou em São Paulo. Retribuo todo o amor e apoio dedicando a vocês cada uma das minhas conquistas.

 Aos tios Therezinha, Antônio, Yolanda, Dionísio, e ao primo Zeca (Dr. Erasmo), que participaram diretamente de minha formação e que me incentivam sempre.

Aos queridos amigos que fiz durante a graduação no IQSC-USP: Elton, Tequila, Gaúcha e Marilinha, que acompanham minha carreira e torcem pelo meu sucesso.

A todos os caríssimos colegas do Laboratório de Materiais Eletroativos, pela agradável convivência! Levarei ótimas recordações de todos vocês!

 Ao Ulisses, que sempre teve orgulho do meu trabalho, e cujo apoio, carinho e compreensão foram essenciais para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

"Só a educação liberta." Epicteto

RESUMO

Massafera, M. P. **Desenvolvimento de novas plataformas poliméricas para detecção eletroquímica de amônia e uréia**. 2010. 145p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de (bio)sensores baseados em plataformas poliméricas convencionais e nanoestruturadas. Os sensores estudados contém poli(pirrol) como transdutor eletroquímico, responsável pela oxidação de amônia a 0,35 V. Como a enzima urease hidrolisa cataliticamente uréia a amônia, após a imobilização da enzima sobre o poli(pirrol), obtém-se um biossensor para detecção indireta de uréia, via amônia. A detecção de amônia pelo poli(pirrol) foi otimizada em termos da densidade de carga de poli(pirrol) presente no sensor, e do potencial de trabalho. Então verificou-se a ação do polímero poli(5-amino-1-naftol) na redução do sinal dos interferentes ácidos úrico e ascórbico. Após a otimização do sensor-base, estudou-se a influência do tipo de imobilização da urease ao substrato polimérico na sensibilidade e estabilidade do biossensor de uréia. Concluiu-se que a pouca quantidade de enzima imobilizada através das metodologias estudadas era o fator limitante da sensibilidade de detecção, e então implementou-se a nanoestruturação do poli(pirrol), para aumentar a área superficial disponível para a imobilização da urease. Preparou-se filmes de poli(pirrol) nanoestruturado (macroporoso e nanofios), e a compreensão dos fenômenos observados só foi possível ao aliar características geométricas e propriedades físico-químicas intrínsecas de sistemas nanoestruturados.

Palavras-chave: Poli(pirrol), nanoestruturas, sensores, uréia, amônia, urease.

ABSTRACT

Massafera, M. P. **Development of new polymeric platforms for ammonia and urea electrochemical detection.** 2010. 145p. PhD Thesis - Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This work presents the development of (bio)sensors based on conventional and nanostructured polymeric platforms. The analyzed sensors contain poly(pyrrole) as electrochemical transducer, responsible for ammonia oxidation at 0.35 V. As the urease catalytically hydrolyses urea to ammonia, after enzyme enzyme immobilization onto poly(pyrrole), a biosensor for urea indirect detection, via ammonia, is obtained. Ammonia sensing by poly(pyrrole) was optimized in terms of both charge density of poly(pyrrole) present in the sensor and working potential. In sequence, poly(5-amino-1-naphtol) role as interferents (uric and ascorbic acids) signal blocker was verified. After optimization of the base-sensor, the influence of urease immobilization method on both detection sensitivity and biosensor durability was investigated. It was found that the small amount of enzyme immobilized using the compared methods limited detection sensitivities, and then nanostructuration of poly(pyrrole) was implemented, in order to increase the surface area available for urease immobilization. Nanostructured poly(pyrrole) films (macroporous and nanowires) were prepared, and the fully understanding of the observed phenomena was only possible combining geometric characteristics and physical-chemical properties related to nanostructured systems.

Keywords: Poly(pyrrole), nanostructures, sensors, urea, ammonia, urease.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **BSA** Bovine Serum Albumine
- (5-NH₂-1-NAP) (5-amino-1-naftol)
- DBSA Ácido Dodecilbenzenosulfônico
- **DBS**⁻ Dodecilbenzenosulfonato
- FEG-SEM Field Emission Gun Scanning Electron Microscope
- LbL Layer by layer
- MCQ Microbalança a Cristal de Quartzo
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- PDDA Poli(cloreto de dialildimetilamônio)
- **PPy** Poli(pirrol)
- PPy/CIO₄ Poli(pirrol) dopado com íons perclorato
- PPy/DBS⁻ Poli(pirrol) dopado com íons dodecilbenzenosulfonato
- Py Pirrol
- Urs Urease
- VPN Voltametria de Pulso Normal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12	
1.1. Sensores Químicos	12	
1.2. POLÍMEROS CONDUTORES		
1.3. NANOESTRUTURAÇÃO DE FILMES POLIMÉRICOS	15	
1.3.1. Síntese de Poli(pirrol) Nanoestruturado	16	
1.4. BIOSSENSORES	18	
1.5. Aplicação dos Nanomateriais em Biossensores	20	
1.6. INTERFERENTES	21	
1.7. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	24	
1.7.1. Inclusão da Espécie Biológica na Matriz Polimérica Simultaneamente à Polimerização	24	
1.7.2. Inclusão da Espécie Biológica na Matriz Polimérica após a Polimerização	25	
2. OBJETIVOS	30	
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32	
3.1. Eletrodos	32	
3.2. Reagentes		
3.3. INSTRUMENTAL		
3.4. Eletropolimerização dos Monômeros	33	
3.5. Otimização do Sensor de Amônia	35	
3.6. UTILIZAÇÃO DO POLI(5-AMINO-1-NAFTOL) PARA REDUÇÃO DO SINAL DE INTERFERENTES		
3.7. BIOSSENSORES DE URÉIA MACIÇOS	36	
3.7.1. Formas de Imobilização da Enzima Urease	36	
3.7.2. Biossensores sem Poli(5-Amino-1-Naftol)	40	
3.7.3. Determinação do pH Ideal de Detecção de Uréia	40	
3.7.4. Otimização da Quantidade de Poli(5-Amino-1-Naftol) no Biossensor	41	
3.7.5. Detecção Amperométrica de Uréia	41	
3.8. BIOSSENSORES DE URÉIA MACROPOROSOS	41	
3.8.1. Imobilização Covalente da Urease no Substrato Macroporoso	43	
3.8.2. Imobilização da Urease no Substrato Macroporoso via Deposição LbL	43	
3.8.3. Determinação da Massa de Urease Imobilizada por Bicamada	45	
3.9. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMÔNIA PELO POLI(PIRROL) MACROPOROSO	46	
3.10. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMÔNIA POR NANOFIOS DE POLI(PIRROL)		
3.10.1. Nanofios Sintetizados por Voltametria de Pulso Normal	47	
3.10.2. Nanofios Sintetizados por Amperometria	48	

 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 4.1. DETECÇÃO DE NH₃ POR POLI(PIRROL) MACIÇO 	
4.1.2. Otimização quanto ao Potencial de Trabalho	55
4.2. UTILIZAÇÃO DO POLI(5-AMINO-1-NAFTOL) NA REDUÇÃO DO SINAL DE INTERFERENTES	57
4.3. BIOSSENSORES DE URÉIA MACIÇOS	60
4.3.1. Comparação entre os Diferentes Tipos de Imobilização da Urease	61
4.3.2. Biossensores sem Poli(5-Amino-1-Naftol)	72
4.3.3. Justificativa do pH empregado nas análises	76
4.3.4. Otimização da Quantidade de Poli(5-Amino-1-Naftol) no Biossensor	78
4.4. BIOSSENSORES DE URÉIA MACROPOROSOS	85
4.4.1. Imobilização Covalente da Urease no Substrato Macroporoso	85
4.4.2. Imobilização da Urease no Substrato Macroporoso via Deposição LbL	92
4.4.3. Determinação da Massa de Urease Imobilizada por Bicamada	103
4.5. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMÔNIA PELO POLI(PIRROL) MACROPOROSO	
4.6. DETECÇÃO AMPEROMÉTRICA DE AMÔNIA POR NANOFIOS DE POLI(PIRROL)	
4.6.1. Nanofios Sintetizados por Voltametria de Pulso Normal	111
4.6.2. Nanofios Sintetizados por Amperometria	116
4.6.3. A Questão do Íon Dopante	123
4.7. DETECÇÃO DE URÉIA POR BIOSSENSOR CONTENDO NANOFIOS DE POLI(PIRROL)	128
5. CONCLUSÕES	129
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7. CURRÍCULO	140

1. INTRODUÇÃO

A uréia é uma biomolécula que está relacionada a diversos processos bem conhecidos pela humanidade. Um deles é sua ampla utilização como fertilizante de solos, provendo a necessidade de nitrogênio dos vegetais. No organismo humano, a uréia é o produto final do metabolismo de compostos nitrogenados, e desta forma, qualquer acumulação acima de níveis limite deve ser controlada. Assim, o monitoramento da concentração de uréia é de grande interesse em análises clínicas e biomédicas, pois possibilita o diagnóstico de algumas doenças, tais como insuficiência renal e hepática, e inclusive permite predizer a natureza e a causa da diabetes [1-3]. Além disso, no meio ambiente, a uréia se decompõe espontaneamente, apresentando meia-vida de 3,6 anos [4], e sem a presença de um processo de degradação eficiente, ela se acumularia rapidamente, causando sérios problemas ambientais. A determinação da concentração de uréia em alimentos também é bastante relevante [3], pois indica a presença de materiais orgânicos em decomposição, que podem ser prejudiciais à saúde. Assim, torna-se extremamente interessante o desenvolvimento de sensores químicos para a determinação da uréia, uma vez que os mesmos oferecem uma alternativa vantajosa considerando-se os custos da análise em laboratório, além de eventualmente serem bastante versáteis quanto à utilização em campo.

1.1. Sensores Químicos

O campo de sensores químicos apresenta crescimento significante ao longo dos anos. Sensores químicos proporcionam componentes vitais para o monitoramento e controle automático de sistemas em diversas áreas, que vão desde saúde, meio ambiente, médica, até processos industriais. Sua importância prática aumenta continuamente, e por isso, grandes esforços são concentrados no planejamento físico e na vasta operação científica e tecnológica desses sistemas.

A etapa fundamental no desenvolvimento de sensores reside na escolha e aperfeiçoamento dos transdutores. Estes componentes são de extrema importância, visto que são os responsáveis pela tradução do sinal de detecção do analito em um sinal físico mensurável, seja uma corrente elétrica, uma variação de potencial ou de massa. Dentro da classe de transdutores eletroquímicos, têm se empregado amplamente os polímeros condutores eletrônicos.

1.2. Polímeros Condutores

O desenvolvimento dos polímeros condutores [5] é uma grande realização, pois são vistos como substitutos para condutores metálicos e semicondutores, além de possuírem um vasto campo de aplicações, como nas áreas de baterias recarregáveis [6-9], dispositivos eletrocrômicos [10,11] e sensores químicos e eletroquímicos [12-17]. Dentre os materiais dessa classe, o poli(pirrol) (PPy) possui um papel de destaque por possuir características extremamente favoráveis, como por exemplo sua fácil processabilidade, boa reversibilidade eletroquímica, excelente estabilidade, e é prontamente obtido por vias eletroquímicas, além de apresentar boa eletroatividade em uma ampla faixa de pH [18,19]. As características físicoquímicas do poli(pirrol) têm sido extensivamente discutidas em literatura [19-24]. Uma característica marcante dos polímeros condutores eletrônicos em geral, que os torna bastante atrativos no uso de sensores, reside no fato de sofrerem alterações reversíveis entre os estados eletronicamente isolantes e condutores. Essas alterações ocorrem pois os polímeros condutores contêm seqüências de ligações duplas conjugadas em suas estruturas, e passam de isolantes a condutores por um

13

processo de oxidação ou redução, podendo ocorrer a incorporação de íons (processo denominado dopagem) e formação de espécies policatiônicas com propriedades condutoras [25-27]. Na Figura 1.1 são mostradas as estruturas dos polímeros condutores mais estudados.



Figura 1.1. Estruturas químicas de alguns polímeros condutores.

O controle criterioso das condições de formação dos filmes poliméricos tem grande importância analítica, pois o ajuste das variáveis que influenciam a formação dos filmes leva a diferentes morfologias e propriedades condutoras, e o comportamento uniforme e reprodutível desses compostos é fundamental na determinação de analitos com bons níveis de precisão e exatidão. Por isso, os métodos eletroquímicos são os mais empregados na síntese desses polímeros condutores, devido a sua reprodutibilidade. A polimerização eletroquímica ocorre pela oxidação do monômero sobre eletrodos inertes como platina, ouro ou carbono vítreo, e dois métodos são bastante utilizados: o galvanostático e o potenciostático. O tipo e a concentração do eletrólito, solvente, temperatura e pH são parâmetros que afetam o mecanismo de polimerização [19], e portanto têm influência nas propriedades finais do filme polimérico.

1.3. Nanoestruturação de Filmes Poliméricos

A nanociência figura como uma das áreas mais atraentes e promissoras para o desenvolvimento tecnológico neste século. Ela tem como objetivo desenvolver, controlar e modificar materiais em escala nanométrica, possibilitando alterar as propriedades físico-químicas dos materiais. A nanotecnologia permite criar materiais funcionais, dispositivos e sistemas através do controle da matéria em nível atômico e molecular. Em muitos casos, esses materiais apresentam propriedades que o material maciço (*bulk*) correspondente não apresenta. Produz-se dessa maneira uma gama de materiais inteligentes, desenvolvidos de maneira a se obter as características desejadas para uma aplicação em específico. Vários setores de atividade vêm se beneficiando desses novos materiais e dos avanços promovidos pela nanociência, entre eles: ciências médicas e farmacêuticas, informática, engenharias, entre outros.

Nos últimos anos muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de nanoestruturar filmes poliméricos, metálicos, híbridos, entre outros. Particularmente os polímeros condutores com dimensões micro e nanométrica têm atraído bastante atenção principalmente devido à potencial aplicação em circuitos eletrônicos [28], células fotovoltaicas [29], dispositivos eletrocrômicos [30] e em sensores químicos [31].

1.3.1. Síntese de Poli(pirrol) Nanoestruturado

A nanoestruturação do poli(pirrol) em particular tem sido extensivamente estudada. dadas as excelentes propriedades desse polímero condutor (condutividade elétrica, comportamento redox e estabilidade). Há relatos em literatura de síntese e caracterização de nanoestruturas de poli(pirrol) de diferentes morfologias, entre elas nanoporos [32,33], micro/nanotubos [34,35], microcontaineres [36,37], etc.

Por exemplo, uma das estratégias para sintetizar poli(pirrol) nanoporoso é a síntese dirigida por molde (*template*). Este método consiste em eletrodepositar o polímero sobre um molde, o qual é em seguida removido, dando origem à estrutura nanométrica organizada em três dimensões. Esse tipo de síntese pode ser efetuada, por exemplo, empregando-se como molde partículas esféricas coloidais de poli(estireno) [38], dando origem à filmes de poli(pirrol) nanoestruturado [32,33,39].

O crescimento de filmes sobre partículas coloidais de poli(estireno) produz, após a eliminação do molde, materiais com poros interconectados, apresentando diâmetros desde 20 nm até 1 µm (dependendo do diâmetro das esferas empregadas), com arranjo tridimensional hexagonal [33,38]. Esses filmes apresentam propriedades únicas devido à elevada razão área superficial/volume, característica de materiais nanoestruturados. O processo de síntese encontra-se esquematizado na Figura 1.2, a qual ilustra também o efeito de aumento de área superficial obtido, em relação a um filme maciço.



Figura 1.2. Esquema ilustrativo do processo de nanoestruturação de filmes eletroquimicamente formados, via molde de esferas de poli(estireno). Reproduzido da referência 38.

Outra estratégia de nanoestruturação do poli(pirrol) via molde é a utilização de membranas poliméricas obtidas por "*track-etch*" ou membranas de alumina porosa, para a síntese de micro/nanofios ou túbulos [40,41]. As membranas do tipo "*track-etch*" estão disponíveis comercialmente, em uma variedade de tamanho de poros (a partir de 10 nm). Entretanto, esses moldes apresentam baixa porosidade (10⁹ poros cm⁻²), e os poros encontram-se aleatoriamente distribuídos pela superfície da membrana. As membranas de alumina apresentam porosidades tipicamente maiores (10¹⁵ poros cm⁻²), e os poros, obtidos em diâmetros a partir de 5-10 nm, estão organizados em um arranjo hexagonal [40]. Como no caso da nanoestruturação via molde de poli(estireno), a deposição do poli(pirrol) sobre essas membranas também pode ser realizada eletroquímica ou quimicamente (utilizando-se um agente oxidante).

Além dos métodos de nanoestruturação do poli(pirrol) utilizando-se moldes, há também a possibilidade de obtenção direta de nanoestruturas, como no caso da deposição eletroquímica de nanofios [42-45], microtúbulos [34] ou microcontaineres de poli(pirrol) [36,37]. Há também a possibilidade de se sintetizar quimicamente nanoestruturas de poli(pirrol) do tipo nanofios [46,47], nanotubos [35] e microtúbulos [48]. Em todos os exemplos de síntese química de nanoestruturas de poli(pirrol), verifica-se a elevada influência de parâmetros experimentais (razão monômero / oxidante, temperatura, natureza do oxidante, entre outros) na morfologia e propriedades físico-químicas dos nanomateriais obtidos.

1.4. Biossensores

Biossensores são dispositivos capazes de recuperar informações analíticas do ambiente operacional, utilizando componentes biológicos (enzimas, células, DNA) como parte do sensor. O biocomponente confere uma alta seletividade devido ao reconhecimento molecular específico do analito, e tem um papel fundamental em produzir uma espécie prontamente detectável, caso o analito em si não o seja. A determinação de uréia pode ser realizada por biossensores baseados em enzimas. Nesses biossensores, um filme da enzima ativa ao substrato em análise é imobilizado sobre a superfície de um sensor clássico, o qual mede a concentração dos produtos formados no curso da reação enzimática. A enzima urease, freqüentemente encontrada em sistemas biológicos (plantas, algas, fungos) [4], apresenta um papel importante nesse processo por catalisar a reação de decomposição da uréia:

 $NH_2CONH_2 + 3H_2O \xrightarrow{urease} 2NH_4^+ + HCO_3^- + OH^-$ (i)

A reação catalisada ocorre 10¹⁴ vezes mais rápido do que a não-catalisada, e com meia-vida na ordem de microsegundos [4]. Como pode se observar na reação (i), a hidrólise da uréia ocasiona um aumento no pH do meio. Além disso, em meio básico há a formação de amônia (NH₃) como um dos produtos da reação catalítica

da urease [20]. Anualmente, cerca de 7x10⁶ toneladas de amônia são liberadas no meio ambiente pelas indústrias e por outras atividades provocadas pelo homem, como queima de biomassa e de combustíveis fósseis [50]. Dadas as fontes e propriedades dessa substância, plantas terrestres e organismos aquáticos são potencialmente alvos de risco [51,52]. Por outro lado, a determinação de amônia em solos nos quais seus sais são usados como fertilizantes também é importante, pois um excesso de amônia altera a acidez do solo, alterando o ciclo de nutrição e o balanço ecológico [53]. A principal aplicação industrial do uso de amônia está relacionada à fabricação de fertilizantes e de explosivos.

Vários estudos têm sido feitos a fim de se desenvolver biossensores de monitoramento de uréia [54]. Alguns deles envolvem a preparação de sensores à base de urease utilizando eletrodos íon-seletivos [55-57], eletrodos de gás amônia [58] e eletrodos de pH [2,59-61]. Biossensores que empregam respostas potenciométricas têm sido comumente utilizados, devido à sua simplicidade e funcionalidade [62-66]. Propõe-se nesta tese a determinação de uréia modificando-se um eletrodo metálico (Pt, Au) com um filme do polímero condutor poli(pirrol), e sobre ele uma camada da enzima urease, que catalisa a reação de hidrólise da uréia a amônia [67]. A escolha do poli(pirrol) foi baseada no fato de serem conhecidas as propriedades desse polímero como transdutor amperométrico na detecção de amônia [68-70], a qual é oxidada a NO em meio alcalino [71]. A resposta amperométrica gerada corresponde à re-oxidação do poli(pirrol) no potencial de operação do sensor. Desta forma, pode-se também utilizar este mecanismo na determinação indireta da uréia, via amônia, como esquematizado na Figura 1.3.



Figura 1.3. Esquema de funcionamento do biossensor de uréia em pHs elevados.

1.5. Aplicação dos Nanomateriais em Biossensores

Visto que a busca por sensores e biossensores eletroquímicos mais sensíveis, seletivos e duráveis é constante, muita pesquisa tem sido realizada na área de desenvolvimento de novas plataformas de detecção. Neste sentido, há uma tendência crescente de aplicação dos nanomateriais em dispositivos de detecção, devido principalmente a alguns fatores:

(a) o funcionamento desses dispositivos depende fundamentalmente de interações e reações em escala atômica e molecular, e a possibilidade de manipular os materiais nestas escalas através da nanotecnologia promete introduzir mudanças dramáticas no desenho dos sensores e em suas aplicações;

(b) como resultado da nanoestruturação, materiais com enorme relação área superficial/volume são obtidos, disponibilizando mais sítios de interação com reagentes externos do que um análogo maciço;

(c) a elevada área superficial interna dessas matrizes nanoestruturadas permite a imobilização de compostos que conferem novas propriedades de detecção (reconhecimento molecular, permeabilidade seletiva, eletrocatálise, etc) [72];

(d) em casos como a imobilização de mediadores químicos diretamente sobre nanoestruturas metálicas (Au, Pt) [73-75] ou condutoras (polímeros condutores) [76-78], a transferência eletrônica entre a enzima e as nanoestruturas é facilitada, aumentando a sensibilidade de detecção e reduzindo o tempo de resposta.

A nanoestruturação dos filmes poliméricos tem por finalidade o aproveitamento desses efeitos sinérgicos obtidos ao se empregar os nanomateriais, visando sempre maiores eficiências de detecção dos analitos de interesse (amônia e uréia, no caso deste trabalho).

1.6. Interferentes

Em análises de amostras reais, uma fonte comum de interferentes em determinações amperométricas é a presença de espécies na amostra que também sofrem reações redox dentro da faixa de potencial utilizada na determinação do analito. O potencial relativamente baixo empregado neste trabalho (0,35V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}) excluirá algumas substâncias que possuam altos potenciais de oxidação. Entretanto, as principais fontes de interferências em matrizes clínicas, como os ácidos ascórbico e úrico (cujas estruturas são apresentadas na Figura 1.3), são oxidadas nesse potencial [79,80].



Figura 1.3. Estruturas dos ácidos úrico e ascórbico.

Desta maneira, com o intuito de aumentar a seletividade de detecção, filmes poliméricos permeoseletivos vêm sendo utilizados na redução do sinal de interferentes [79], e tais filmes agem segundo diferentes mecanismos. O Nafion[®] atua como filme de exclusão de carga, ou trocador catiônico, visto que a presença de grupamentos negativos (sulfonato) em sua estrutura faz com que compostos carregados negativamente sejam repelidos, e compostos carregados positivamente sejam atraídos [81,82]. Poli(vinilpiridina), ao contrário, repele cátions e atrai ânions. Acetato de celulose e polímeros fenólicos atuam como filmes de exclusão de tamanho, pois são permeáveis a espécies menores, retendo as espécies de maior tamanho [79,82,83]. A Figura 1.4 apresenta um esquema ilustrativo da permeoseletividade desses polímeros.



Figura 1.4. Modelos de camadas permeoseletivas. (a) filme baseado em exclusão de carga, causando a repulsão de espécies com a mesma carga elétrica e permitindo a passagem de espécies neutras ou de carga oposta. (b) filme baseado em exclusão de tamanho; esta camada permite apenas a passagem de espécies pequenas, impedindo a entrada de espécies maiores.

Assim, torna-se possível a utilização destas duas formas de eliminação de interferentes, uma vez que a amônia é uma molécula pequena e eletricamente neutra, ao contrário das espécies interferentes que são moléculas comparativamente grandes, e se encontram negativamente carregadas devido ao pH alto (10,0) da solução tampão utilizada nas medidas de detecção do analito. Mas um

inconveniente dessas duas formas de exclusão é a utilização de um polímero isolante, como o Nafion[®] e o acetato de celulose.

Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa abordaram a utilização de uma barreira seletiva à amônia, utilizando um polímero condutor eletrônico, o poli(5amino-1-naftol), cuja estrutura é apresentada na Figura 1.5. Este foi polimerizado eletroquimicamente sobre a superfície do poli(pirrol), mostrando uma resposta satisfatória de exclusão de interferentes [67].



Figura 1.5. Estrutura do poli(5-amino-1-naftol).

Analisando-se a estrutura do poli(5-amino-1-naftol), observa-se a presença de grupos hidroxila livres. Essa característica é de grande interesse, uma vez que os mesmos poderiam ser utilizados como grupos ancoradores, nos quais poderiam se imobilizar diversas espécies, incluindo enzimas, segundo ilustra a Figura 1.6 a seguir.



Figura 1.6. Esquema de um eletrodo de Pt modificado com poli(pirrol), poli(5amino-1-naftol) e urease.

1.7. Métodos de Imobilização de Enzimas

Uma tarefa essencial na construção de biossensores baseados em polímeros condutores é imobilizar eficientemente e efetivamente a biomolécula no eletrodosubstrato, de maneira que ela mantenha sua atividade biológica inicial. Segundo a classificação de Wallace *et al.* [17], dois métodos principais são utilizados na fabricação de biossensores, e ambos serão discutidos a seguir.

1.7.1. Inclusão da Espécie Biológica na Matriz Polimérica Simultaneamente à Polimerização

A construção de um biossensor via eletropolimerização-deposição direta é um processo simples e de uma etapa. A eletropolimerização é realizada em uma solução contendo o monômero, a espécie biológica e o eletrólito suporte. As duas técnicas comumente utilizadas na eletrodeposição direta são os métodos potenciostático e galvanostático. No primeiro, o potencial deve ser cuidadosamente controlado para se assegurar que a integridade do componente que está sendo incorporado se mantenha durante a formação do filme polimérico, e neste método é necessário registrar a variação da corrente em função do tempo para o controle criterioso da quantidade de polímero formada. Por outro lado, a utilização do método galvanostático assegura que a taxa de polimerização é controlada e constante durante o processo de deposição, e também há a tendência de formação de biossensores com filmes poliméricos mais porosos. Os métodos galvanostático e potenciostático apresentam duas desvantagens: uma delas é que o componente biológico se orienta aleatoriamente na matriz polimérica, muitas vezes tornando o

sítio ativo inacessível ao analito-alvo; a outra desvantagem é que em alguns casos ocorre a desnaturação da enzima.

1.7.2. Inclusão da Espécie Biológica na Matriz Polimérica após a Polimerização

Neste segundo tipo de abordagem, a espécie biológica é imobilizada após a eletrodeposição do filme polimérico, seguindo diversas metodologias, dentre as quais cinco são as principais :

a) Adsorção

Técnicas de adsorção são empregadas na imobilização dos componentes biológicos na superfície do polímero condutor, solucionando então o problema de inacessibilidade citado anteriormente. São utilizadas principalmente em casos em que enzima e substrato têm alta afinidade eletrostática, mas um problema inerente a este método é a dessorção, ou lixiviação da enzima da matriz polimérica resultante de variações pequenas de pH e força iônica, diminuindo então a estabilidade e

b) Aprisionamento

O método de aprisionamento é baseado na disposição das enzimas dentro de uma rede polimérica, de um gel, de membranas, etc, com o intuito de se prevenir perdas por lixiviação. Os materiais empregados para aprisionar enzimas podem ser orgânicos ou inorgânicos, sendo mais utilizados os polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, poli(acrilatos), etc. Uma vantagem desse método é que raramente ocorrem alterações conformacionais na estrutura enzimática, preservando assim sua atividade biológica. Por outro lado, deve-se escolher apropriadamente as condições experimentais, de modo a se aprisionar as enzimas sem isolá-las do ambiente externo, para não impedir a aproximação do analito.

c) Ligações Cruzadas

A imobilização de enzimas pode ser efetuada também através de ligações cruzadas com outras moléculas, sejam elas outras proteínas ou moléculas contendo grupos funcionais específicos. O reagente mais comumente empregado como *cross-linker* é o glutaraldeído, uma molécula homo-bifuncional [84]. As reações de *cross-linking* são realizadas muitas vezes sob condições severas, que podem levar a uma mudança conformacional do centro ativo da enzima, ocasionando então uma significativa perda de atividade. Geralmente o método de imobilização de enzimas via ligações cruzadas é utilizado em conjunto com outros métodos, com o intuito de estabilizar as enzimas adsorvidas e também para prevenir a lixiviação das mesmas.

d) Ligação Química ao Substrato

Uma elevada estabilidade da enzima sobre a matriz polimérica é um importante fator na construção de um biossensor, o que confere a ele maior durabilidade e, portanto, reduz o custo de cada medida. A principal causa da baixa durabilidade é a lixiviação do componente biológico do material sobre o qual se encontra imobilizado. Então, estudos são necessários no sentido de se minimizar ao máximo a lixiviação, e este objetivo pode ser atingido caso ligações fortes e eficientes sejam formadas entre o componente biológico e a matriz polimérica. Um dos procedimentos que se utiliza no caso de imobilização de enzimas é a reação de acoplamento carbodiimida, que consiste em ligar covalentemente a enzima, que

apresenta grupos carboxila em sua estrutura, ao polímero contendo grupos -NH2 terminais. Um exemplo típico é apresentado por Rajesh et al. [1]. Neste trabalho, se utiliza o copolímero poli(N-3-aminopropilpirrol-co-pirrol) como matriz polimérica, e a enzima urease é imobilizada quimicamente via ligações carbodiimida, resultando em um grande recobrimento de enzima sobre o eletrodo. Outro procedimento viável é a ligação química da enzima ao substrato polimérico por meio de moléculas denominadas âncoras, como o cloreto cianúrico. Esta molécula pode, segundo o esquema de reações apresentado na Figura 1.7, ligar-se covalentemente a um substrato polimérico contendo grupos -OH livres e à enzimas contendo grupamentos -NH₂ [85]. Este método foi utilizado neste trabalho para imobilizar covalentemente a urease ao polímero poli(5-amino-1-naftol) [67], que conforme apresentado possui grupos –OH livres em sua estrutura. Uma das vantagens deste método é simplicidade: poucas etapas experimentais são necessárias, e as condições de preparo são brandas. Porém, no caso de biossensores eletroquímicos, um inconveniente do método é que a molécula âncora utilizada (cloreto cianúrico) não é condutora eletrônica. Foram obtidos resultados interessantes ao utilizar esse método de imobilização, os quais serão discutidos em seções posteriores desta tese.



Figura 1.7. Esquema de reações de ancoramento de uma enzima (E) sobre um substrato polimérico contendo grupos –OH livres.

e) Deposição Eletrostática Camada por Camada

A técnica de automontagem baseada na interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos (compostos anfifílicos [86], polieletrólitos [87]) foi proposta na década de 90 por Decher e colaboradores [87]. Ela consiste na imersão de um substrato sólido que apresenta determinada carga (inerente ou adquirida após tratamento superficial) em uma solução contendo espécies de carga oposta, para que ocorra a adsorção por atração eletrostática. Então, o conjunto deve ser lavado, para eliminar o excesso de material, e seco, e em seguida imerso em outra solução, que contenha agora espécies de mesma carga do substrato, resultando numa configuração do tipo "sanduíche", formada por camadas catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas [88]. A Figura 1.8 ilustra uma deposição genérica de material via automontagem eletrostática camada por camada (LbL).



Figura 1.8. Ilustração da deposição por atração eletrostática de 3 bicamadas de materiais genéricos.

Essa técnica de deposição tem sido utilizada nas mais diversas áreas, como no desenvolvimento de baterias de íon-lítio [89], dispositivos eletrocrômicos [90] e de sensores [91,92], pois além de ser bastante versátil, apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos. Entre elas, pode-se citar: a força motriz da montagem de multicamadas é simplesmente a atração iônica entre cargas opostas, sendo possível adsorver até uma centena de camadas [87]; há independência do tamanho e morfologia do substrato; formam-se de filmes bastante finos, cuja espessura pode ser controlada através do número de bicamadas, da concentração da solução de material adsorvente, da temperatura, etc [93].

Uma das desvantagens desta técnica é observada no caso em que se utiliza, por exemplo, nanopartículas condutoras e um poliíon isolante de carga oposta, com finalidades eletroquímicas. Foi reportado em literatura que a eletroatividade do eletrodo é mantida apenas até certo número de bicamadas, a partir do qual a conectividade elétrica entre as nanopartículas e o substrato é perdida [89].

2. OBJETIVOS

De maneira geral, os dados descritos nesta tese têm por objetivo mostrar o desenvolvimento de novos sensores e biossensores para detecção amperométrica de amônia e uréia. Para isto, será introduzida a síntese de substratos de poli(pirrol) convencional (maciço) e nanoestruturado (macroporoso e nanofios), visando sempre compreender os processos envolvidos, bem como obter melhores performances de detecção dos analitos.

Os resultados discutidos estão divididos em diferentes temas, e cada um deles apresenta os objetivos específicos mostrados a seguir.

(a) Detecção de Amônia por Poli(pirrol) Maciço

Otimizar o sensor de amônia em função da carga de poli(pirrol) e do potencial de trabalho, e testar a ação do poli(5-amino-1-naftol) na diminuição do sinal de interferentes como os ácidos úrico ascórbico.

(b) Detecção de Uréia por Biossensores baseados em Poli(pirrol) Maciço

Incorporar a enzima urease à matriz polimérica, estudando-se a influência do tipo de imobilização dessa enzima no desempenho e durabilidade do biossensor.

Otimizar a carga de poli(5-amino-1-naftol) eletrodepositada sobre o poli(pirrol) maciço, em função da sensibilidade de detecção de uréia.

(c) Detecção de Uréia por Biossensores baseados em Poli(pirrol) Macroporoso

Incorporar a enzima urease ao poli(pirrol) macroporoso via imobilização covalente ao poli(5-amino-1-naftol), através da reação com cloreto cianúrico, e também segundo o método de deposição eletrostática camada por camada.

Na imobilização da enzima pelo método LbL, analisar a influência do tempo de imersão do eletrodo nas soluções de policátion e urease, e do número de bicamadas nas sensibilidades de detecção de uréia. Determinar a quantidade de enzima imobilizada por ciclo de deposição (bicamada) com o auxílio da técnica de microbalança a cristal de quartzo.

(d) Detecção de Amônia por Poli(pirrol) Macroporoso

Aplicar os filmes de poli(pirrol) macroporoso, contendo diferentes densidades de carga deste polímero, como sensores de amônia, comparando seus desempenhos com os obtidos com sensores análogos maciços.

(e) Detecção de Amônia por Nanofios de Poli(pirrol)

Realizar e otimizar a síntese dos nanofios de poli(pirrol), utilizando-se como dopante o ânions perclorato (CIO_4^{-}). Verificar a eletroatividade do poli(pirrol) dopado com CIO_4^{-} frente a detecção de amônia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Eletrodos

Como eletrodo de trabalho, empregou-se nos experimentos eletroquímicos placas de platina ou placas de ouro depositado sobre vidro (cujas áreas ativas foram delimitadas), bem como eletrodos comerciais de platina de secção circular de 1,6 mm de diâmetro (0,02 cm²). A limpeza dos eletrodos de secção circular de Pt consistiu no polimento dos mesmos com alumina de diferentes granulometrias, na ordem a seguir: suspensão 4 (1,0 μ m) – suspensão 3 (0,3 μ m) – suspensão 2 (0,05 μ m). As placas de Pt e de Au são limpas em solução piranha (3 H₂SO₄: 1 H₂O₂ v/v). Após lavagem com água, todos os eletrodos são colocados em banho de ultrassom por 5 minutos em acetona e em seguida em água deionizada.

Como referência foi empregado um eletrodo de Ag/AgCI/KCI_{sat}, e como eletrodo auxiliar utilizou-se uma placa de Pt, limpa antes de cada experimento por exposição à chama de bico de Bunsen.

3.2. Reagentes

Pirrol (**Aldrich**, 99%) foi purificado por destilação e mantido em refrigerador sob atmosfera de N₂ e protegido de luz. Ácido dodecilbenzenosulfônico (sal de sódio), monômero (5-amino-1-naftol) (5-NH₂-1-NAP) 97%, acetato de celulose, cloreto cianúrico 99%, poli(estireno) 10% em água (partículas de 460 nm de diâmetro), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA) 20% em água, LiClO₄ (**Aldrich**), acetona, etanol, NaOH, HCl, H₃BO₃ (**Synth**, p.a.), glutaraldeído 25% v/v (**Merck**), NH₄Cl (**Mallinckrodt**, p.a.), uréia, ácidos L-ascórbico e úrico, BSA 200 mg mL⁻¹, urease (EC 3.5.1.5, tipo III, 35000 unidades g^{-1}), triton[®] X-100 (**Sigma**), tolueno, NaH₂PO₄.H₂O e Na₂HPO₄.7H₂O (**Nuclear**) foram utilizados como recebidos.

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada por um sistema Elga UHQ.

3.3. Instrumental

A eletropolimerização dos monômeros e os testes amperométricos de detecção de amônia e uréia foram realizados em uma célula eletroquímica convencional, de três eletrodos, com o auxílio de um potenciostato/galvanostato Autolab modelo PGSTAT 30 (Eco Chemie).

Para secagem dos eletrodos contendo as esferas de poli(estireno) foi empregada uma estufa à vácuo da Heraeus Instruments, modelo Vacutherm.

Nos experimentos com a microbalança a cristal de quartzo (MCQ), foram utilizados cristais de quartzo piezelétricos de corte AT com frequência 6,0 MHz (Valpey-Fischer), 25 mm de diâmetro e 0,32 cm² de área de Au piezelétrica (fator de sensibilidade integral 6,45 x 10⁷ cm² Hz g⁻¹). As variações de frequência foram medidas com o auxílio do instrumento Stanford Research System, modelo SR620, acoplado a um circuito oscilatório.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um equipamento JEOL JSM-5900LV FEG-SEM (*Field Emission Gun – Scanning Electron Microscope*), disponível no Instituto de Química da USP.

3.4. Eletropolimerização dos Monômeros

A polimerização do pirrol sobre o eletrodo de Pt de secção circular (0,02 cm²) foi realizada potenciostaticamente a 0,7 V vs. Ag/AgCl/KCl_{sat}, em uma µ-célula

eletroquímica (Figura 3.1) na qual eram introduzidos cerca de 200 μ L de solução de pirrol 50 mmol L⁻¹ e DBSA (dopante) 25 mmol L⁻¹. A deposição do poli(pirrol) sobre as placas de Au e Pt foi realizada em um béquer de 10 mL, pois o tamanho (0,5 x 1,0 cm²) e o formato dessas placas impossibilitam seu acoplamento à μ -célula (2,0 cm de diâmetro e 1,6 cm de altura).



Figura 3.1. µ-célula eletroquímica.

A carga de poli(pirrol) depositada sobre o eletrodo pode ser variada controlando-se a duração da amperometria, uma vez que a integral do amperograma (área da curva i vs. t) fornece diretamente o valor de carga de polímero eletrodepositada. O item (a) da Figura 3.2 ilustra a deposição potenciostática de 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) sobre um eletrodo de Pt.

O monômero (5-amino-1-naftol) foi polimerizado sobre o filme de poli(pirrol) por voltametria cíclica a 50 mV s⁻¹, em um béquer contendo 5 mL de solução 5,0 mmol L⁻¹ de monômero e 1,0 mol L⁻¹ de HCl, conforme descrito em literatura [94]. No primeiro e segundo ciclos, o potencial é varrido entre 0,0 e 0,9 V, e do terceiro ciclo em diante, entre 0,0 e 0,7 V. O emprego de potenciais menos positivos do terceiro ciclo em diante previne a sobreoxidação das unidades poliméricas em formação. Os voltamogramas obtidos durante a polimerização do (5-amino-1-naftol) (50 ciclos) estão apresentados no item (b) da Figura 3.2.



Figura 3.2. (a) Polimerização de 2,5 C cm⁻² de pirrol sobre eletrodo de Pt, a 0,7 V em μ-célula eletroquímica. (b) Polimerização do (5-amino-1-naftol) por voltametria cíclica, 50 ciclos, a 50 mV s⁻¹, em meio ácido (HCl 1,0 mol L⁻¹).

3.5. Otimização do Sensor de Amônia

A resposta amperométrica do sensor de poli(pirrol) frente à adição de amônia foi verificada em 5,0 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua. Para otimizar os parâmetros do sensor visando maiores sensibilidades de detecção, os testes foram realizados cronoamperometricamente em potenciais variando desde 0,3 até 0,4 V, e empregando-se eletrodos contendo densidades de carga de poli(pirrol) entre 0,5 e 3,0 C cm⁻². Alíquotas de solução de NH₄Cl de concentração conhecida eram adicionadas periodicamente ao sistema. Todos os experimentos foram realizados a 25±1 °C, e repetidos ao menos 2 vezes.

3.6. Utilização do Poli(5-Amino-1-Naftol) para Redução do Sinal de Interferentes

Para verificar a ação do poli(5-amino-1-naftol) na redução do sinal de interferentes detectados eletroquimicamente pelo poli(pirrol) concomitantemente à amônia, preparou-se um eletrodo contendo 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e em seguida depositou-se o poli(5-amino-1-naftol) sobre ele. Com este eletrodo contendo ambos os polímeros condutores, foi realizado um teste de detecção amperométrica a 0,35 V,

em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, adicionando-se periodicamente alíquotas de soluções de NH₄CI e interferentes (ácido I-ascórbico e ácido úrico) de concentração conhecida.

3.7. Biossensores de Uréia Maciços

3.7.1. Formas de Imobilização da Enzima Urease

Na medida em que a construção do biossensor de uréia proposto se dá através da incorporação da enzima urease na matriz de poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol), se faz necessário um estudo acerca da influência do tipo de imobilização empregada na resposta fornecida pelo biossensor. Para tanto, comparou-se quatro tipos de imobilização da enzima sobre um eletrodo contendo 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol). Este último polímero foi obtido por 50 ciclos de voltametria em meio de monômero (5 mmol L⁻¹) e HCl (1,0 mol L⁻¹).

As metodologias empregadas para a imobilização da urease sobre o eletrodo bipolimérico estão descritas a seguir.

A) Imobilização Espontânea

Neste experimento, o eletrodo permaneceu imerso em uma solução aquosa de urease 0,1 mg mL⁻¹ por 3 horas, em geladeira (4,0 °C). O intuito era verificar se a enzima se incorporaria espontaneamente à matriz polimérica.

B) Imobilização por Barreira Física de Acetato de Celulose

Neste caso, foram depositados sobre o eletrodo 10,0 µL de solução de urease 50,0 mg mL⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. O eletrodo foi mantido a 4,0 °C em geladeira até completa evaporação do solvente (água), e então se depositou
sobre ele 10,0 µL de solução acetato de celulose 1% em massa em acetona. Novamente o eletrodo é mantido em geladeira e, ao se obter a secagem do solvente (acetona), procede-se com os testes amperométricos.

A Figura 3.3 ilustra as etapas de preparação do biossensor descrito acima.



Figura 3.3. Etapas de preparação do biossensor contendo a urease imobilizada fisicamente com acetato de celulose.

C) Ligações Cruzadas com Glutaraldeído

O glutaraldeído é um aldeído bifuncional e reativo frente a grupos amino, favorecendo seu uso como "*cross-linker*" com enzimas (proteínas). A imobilização da urease via ligações cruzadas com glutaraldeído promove o entrelaçamento de várias unidades de enzima.

O procedimento de preparo do eletrodo consiste em adicionar sobre ele 10,0 µL de uma solução recém-preparada contendo urease 2,5 mg mL⁻¹, albumina de soro bovino (BSA, uma proteína estabilizante de enzimas) 5,0 mg mL⁻¹ e glutaraldeído 0,15% v/v, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Mantém-se o eletrodo em geladeira a 4° C até completa secagem do solvente, e então se realizam os testes amperométricos.

A Figura 3.4 apresenta esquematicamente a preparação do eletrodo descrito.



Figura 3.4. Esquema de preparação do biossensor contendo urease imobilizada por ligações cruzadas com glutaraldeído.

D) Ligação Química ao Poli(5-Amino-1-Naftol)

Neste tipo de imobilização, o intuito é ligar covalentemente a enzima ao poli(5amino-1-naftol), utilizando-se como "âncora" o reagente cloreto cianúrico, conforme ilustrado no esquema de reações apresentado na introdução (Fig. 1.7). O procedimento experimental consiste em inserir o eletrodo contendo os dois polímeros em uma solução etanóica de cloreto cianúrico 100,0 mg mL⁻¹, sob agitação e à temperatura ambiente, por 4-5 horas. Em seguida, o eletrodo é lavado com água destilada e imerso em uma solução de urease 50,0 mg mL⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, nas mesmas condições, por 24 horas. A Figura 3.5 ilustra o processo descrito.



Figura 3.5. Ilustração do procedimento de ancoramento da urease ao poli(5-amino-1-naftol) por ligações covalentes.

Para quantificar a massa de urease imobilizada quimicamente ao substrato, utilizou-se uma microbalança a cristal de guartzo. Sobre o eletrodo piezelétrico (área eletroativa de ouro = 0.32 cm^2), foram eletrodepositados por amperometria 2.5 C cm⁻² de poli(pirrol), e em seguida procedeu-se com a polimerização do (5-amino-1-naftol), por voltametria cíclica (50 ciclos, a 50 mV s⁻¹, em solução de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCI 1.0 mol L⁻¹). Então, o eletrodo contendo ambos os polímeros foi imerso na solução etanóica de cloreto cianúrico 100,0 mg mL⁻¹, conforme descrito no parágrafo anterior. A frequência de oscilação do eletrodo foi anotada após 5 h de imersão na solução de cloreto cianúrico (após lavagem do eletrodo com água deionizada e secagem em fluxo de N₂). Em seguida, o eletrodo modificado foi imerso na solução de urease 50,0 mg mL⁻¹ por 24 h, e ao final foi lavado com água deionizada e seco sob N₂. Sua frequência de oscilação foi anotada novamente, e desta forma, a diferença entre a frequência tomada antes da imobilização da urease e após sua ligação covalente ao substrato pode ser correlacionada com a massa de urease efetivamente ligada ao eletrodo. A correlação é realizada através da Equação de Sauerbrey [95]:

∆f = -k∆m

Na qual Δf é a variação de frequência em Hz, Δm é a variação de massa em gramas, e k é o fator de sensibilidade integral, que correlaciona os dois últimos, e corresponde a 6,45 x 10⁷ cm² Hz g⁻¹.

Para o experimento em análise, foi encontrado o valor de 115,0 μg cm⁻² de urease imobilizada covalentemente sobre o substrato. Fazendo a correlação com a área dos eletrodos de Pt utilizados nos demais experimentos (0,02 cm²), concluiu-se que **2,3 μg de urease** são quimicamente ligadas ao poli(5-amino-1-naftol) através do método de ancoramento.

3.7.2. Biossensores sem Poli(5-Amino-1-Naftol)

Biossensores contendo apenas o poli(pirrol), sem poli(5-amino-1-naftol), foram desenvolvidos para verificar o efeito do segundo polímero nas sensibilidades de detecção de uréia.

Sobre um eletrodo base contendo 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) apenas, depositouse por *casting* uma solução recém-preparada contendo urease, BSA e glutaraldeído. Biossensores contendo diferentes proporções entre os três reagentes foram analisados, conforme mostra a Tabela 3.1. Os eletrodos foram mantidos em geladeira (4 °C) até completa evaporação do solvente, e em seguida foram testados frente à detecção de uréia.

Biossensor	[Urease] mg mL ⁻¹	<mark>[BSA]</mark> mg mL ⁻¹	[Glutaraldeído] % v/v
1	25,0	40,0	5,0
2	5,0	10,0	0,30
3	2,5	5,0	0,15

Tabela 3.1. Concentrações de urease, BSA e glutaraldeído nas soluções depositadas sobre 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol).

3.7.3. Determinação do pH Ideal de Detecção de Uréia

Com o intuito de verificar o pH no qual a detecção de uréia é mais favorecida, preparou-se soluções tampão de diferentes pHs, e então realizou-se o teste amperométrico com o biossensor em cada solução. Para pHs entre 8,14 e 10,20, utilizou-se tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (cujo pH foi ajustado com NaOH), e para pH 7,17 foi empregado o tampão fosfato 50 mmol L + KCl 50 mmol L⁻¹.

O biossensor analisado continha 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol), e a urease (3,5 mg mL⁻¹) foi imobilizada através de ligações cruzadas com glutaraldeído (0,19% v/v), seguindo a metodologia já explicada anteriormente.

3.7.4. Otimização da Quantidade de Poli(5-Amino-1-Naftol) no Biossensor

A quantidade de poli(5-amino-1-naftol) eletrodepositada sobre 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) foi variada de acordo com o número de ciclos de voltametria utilizados para polimerizar o monômero (5-amino-1-naftol). Foram analisados eletrodos contendo filmes de poli(5-amino-1-naftol) obtidos a partir de 10 a 70 ciclos de voltametria (da maneira usual), os quais foram submetidos ao procedimento de imobilização covalente da urease ao poli(5-amino-1-naftol), segundo metodologia descrita no item 3.7.1 (D). Em seguida, os biossensores assim obtidos foram empregados na detecção amperométrica de uréia, para avaliação de seus desempenhos.

3.7.5. Detecção Amperométrica de Uréia

Todos os testes amperométricos de detecção de uréia foram realizados a 0,35 V, em 5,0 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0 (pH otimizado). A solução era continuamente agitada e alíquotas solução de uréia eram adicionadas periodicamente à solução. Os experimentos foram efetuados a 25±1 °C, e as análises foram sempre feitas, no mínimo, em duplicata.

3.8. Biossensores de Uréia Macroporosos

A metodologia de preparo dos biossensores macroporosos consiste inicialmente na formação do poli(pirrol) sobre o molde de esferas de poli(estireno), o qual é em seguida removido, dando origem ao filme macroporoso. Após a obtenção do poli(pirrol) nanoestruturado, segue-se com a imobilização da urease, que foi realizada de duas formas: (a) imobilização covalente, após deposição do poli(5amino-1-naftol) sobre o poli(pirrol) nanoestruturado, ou (b) imobilização camada por camada (*layer by layer*) diretamente sobre o poli(pirrol). Os procedimentos de imobilização da urease sobre a matriz macroporosa serão apresentados nos próximos itens.

De maneira mais detalhada, a preparação do poli(pirrol) macroporoso consiste nas seguintes etapas [39]:

(1) adição sobre o eletrodo (Pt, 0,02 cm²) de 10 μ L de solução aquosa contendo poli(estireno) (microesferas de 460 nm de diâmetro) 0,5% em massa e Triton[®] X-100 (um surfactante não iônico, contendo tanto unidades hidrofílicas quanto hidrofóbicas) 1x10⁻⁶ mol L⁻¹;

(2) evaporação do solvente em câmara de umidade constante (caixa de isopor contendo um béquer preenchido com água destilada), pois quanto mais lenta a evaporação, melhor o arranjo das microesferas no eletrodo;

(3) repetição dos itens (1) e (2) por mais duas vezes;

(4) colocação do eletrodo em estufa a 100 °C, sob vácuo, por 4 horas, para que as microesferas se fixem umas às outras, impedindo dissolução ao serem colocadas na solução de pirrol;

(5) realiza-se a eletropolimerização do pirrol conforme procedimento descrito no item 3.4, deixando o eletrodo imerso na solução de monômero por ao menos 30 minutos antes de iniciar a polimerização (para permitir a percolação da solução por toda a extensão do molde);

(6) insere-se o eletrodo em um béquer contendo tolueno, por 24 horas, para dissolução das esferas de poli(estireno), obtendo-se a nanoestruturação do polímero;

A Figura 3.6 ilustra as etapas (5) e (6).



Figura 3.6. Ilustração das etapas (5) e (6) da metodologia de preparo do poli(pirrol) macroporoso.

3.8.1. Imobilização Covalente da Urease no Substrato Macroporoso

Após a preparação do filme de poli(pirrol) macroporoso (0,25 C cm⁻²), foi eletrodepositado sobre ele um filme de poli(5-amino-1-naftol). Novamente efetuou-se a otimização da quantidade deste polímero presente no biossensor de acordo com o número de ciclos de voltametria utilizados para sua síntese (10-50 ciclos). Sobre a matriz bipolimérica, imobiliza-se a urease covalentemente através da reação com cloreto cianúrico (mesma metodologia descrita no item 3.7.1 (D)), e em seguida testa-se o desempenho do biossensor obtido frente à detecção amperométrica de uréia.

3.8.2. Imobilização da Urease no Substrato Macroporoso via Deposição LbL

Após a nanoestruturação via molde do poli(pirrol), cuja densidade de carga depositada sobre a Pt foi 0,25 C cm⁻², prossegue-se com a imobilização da urease nesta matriz nanoestruturada através da técnica de automontagem camada por camada, descrita na introdução.

A Tabela 3.2 apresenta a natureza das cargas de cada espécie utilizada nos experimentos, e a metodologia de imobilização de uma bicamada está sumarizada na Tabela 3.3., e ilustrada na Figura 3.7. Uma bicamada consiste, neste caso, na

deposição de uma camada de PDDA^{*} (poli(cloreto de dialildimetilamônio) sobre o poli(pirrol) (0,25 C cm⁻²), e depois uma camada de urease, sobre o PDDA. Esse procedimento pode ser sistematicamente repetido "n" vezes, sendo obtidas portanto "n" bicamadas. Foram comparados os resultados obtidos com eletrodos contendo 5 e 15 bicamadas.

Tabela 3.2. Densidade de carga	das substâncias utiliza	adas na imobilização d	camada por camada.
--------------------------------	-------------------------	------------------------	--------------------

Espécie	Tipo de Carga	Justificativa		
Poli(Pirrol)	Negativa	Encontra-se dopado com íons dodecilbenzenosulfonato (DBS ⁻), que		
	Negativa	conferem densidade de carga negativa superficial ao polímero		
PDDA	Positiva	É um policátion		
Urease	Negativa	Ponto Isoelétrico = 4,9 (pH utilizado = 10,0)		

Tabela 3.3. Seqüência de imersão do eletrodo contendo poli(pirrol) macroporoso para preparode uma bicamada.

Etapas	Duração (s)
1 – PDDA 5,0 mg mL ⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0)	1800 ou 3600
2 – Lavagem em tampão borato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0)	60
3 – Secagem sob fluxo de N ₂	10
4 – Urease 50,0 mg mL ⁻¹ + BSA 25 mg mL ⁻¹	1800 ou 3600
em tampão borato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0)	
5 – Lavagem em tampão borato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 10,0)	60
6 – Secagem sob fluxo de N ₂	10



Figura 3.7. Ilustração do procedimento de preparação de uma bicamada. Após cada lavagem em tampão borato, o eletrodo é seco sob jato de N₂.

^{*} PDDA foi escolhido pois dentre as duas opções de policátions disponíveis no laboratório (PDDA e PAH – hidrocloreto de polialilamina), ele era o mais adequado considerando-se o elevado pH utilizado (pH 10,0).

A imobilização da urease através da montagem camada por camada pode ser realizada automaticamente com o auxílio de um robô (Figura 3.8), denominado "Robô LbL", desenvolvido em uma parceria entre os profs. Susana I. C. de Torresi, Roberto M. Torresi e a empresa Prossiga. Este robô possui um programa que permite escolher e variar diversos parâmetros, dentre eles: agitação durante a imersão do eletrodo, secagem do mesmo com N₂ e sua duração, tempo de imersão em cada béquer (5 mL), número de ciclos (bicamadas), e número de béqueres em que o eletrodo será imergido. A utilização desse robô tornou mais simples, rápida e prática a preparação de eletrodos utilizando a técnica de montagem camada por camada, que antigamente era feita de forma manual.



Figura 3.8. Robô LbL

3.8.3. Determinação da Massa de Urease Imobilizada por Bicamada

Para a quantificação da massa de urease imobilizada eletrostaticamente em cada bicamada, foi utilizada a técnica de microbalança a cristal de quartzo. O eletrodo piezelétrico utilizado tem área eletroativa de 0,32 cm² de ouro. Foi realizada a

platinização desse eletrodo a -0.5 V vs Ag/AgCl/KCl_{sat} em solução de ácido hexacloroplatínico 5 mmol L⁻¹, por 40 minutos. Em seguida, a superfície do eletrodo foi limpa efetuando-se 10 ciclos de voltametria a 200 mV s⁻¹ (de -0,9 a 2,1 V), em ácido sulfúrico 2,0 mol L⁻¹. Sobre o eletrodo depositou-se então o molde de esferas de poli(estireno) (empregando-se um volume maior de solução de esferas - 5 x 20 μL - visto que a área desse eletrodo é muito maior do que a área do de platina empregado normalmente), e depois realizou-se a eletrodeposição do poli(pirrol), cuja densidade de carga depositada foi 0,25 C cm⁻², a mesma empregada nos experimentos descritos no item 3.8.2. Após remoção do molde por dissolução em tolueno, utilizou-se o mesmo procedimento de deposição das bicamadas descrito também naquele item. A variação de frequência obtida entre o eletrodo antes e após imersão em cada uma das soluções (PDDA e urease) foi monitorada, e a massa de urease depositada pode ser calculada aplicando-se a relação de Sauerbrey [95], que já foi apresentada nesta seção.

3.9. Detecção Amperométrica de Amônia pelo Poli(pirrol) Macroporoso

Estudou-se adicionalmente a aplicação da plataforma de poli(pirrol) macroporoso como sensor de amônia. Para este fim, preparou-se eletrodos nanoestruturados seguindo a metodologia descrita no item 3.8.

Os testes amperométricos de detecção de amônia com eletrodos de poli(pirrol) macroporoso foram realizados a 0,35 V em 5,0 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Verificou-se as respostas frente à adição de amônia empregando-se eletrodos contendo entre 0,10 e 0,50 C cm⁻¹ de polímero macroporoso eletrodepositado. Como comparação, eletrodos análogos maciços contendo as mesmas quantidades de poli(pirrol) também foram empregados na detecção de amônia. Durante a detecção

amperométrica, a solução era continuamente agitada e alíquotas de concentração conhecida de NH₄CI foram adicionadas periodicamente à solução. Todos os experimentos foram realizados a 25±1 °C, e foram repetidos ao menos 2 vezes.

3.10. Detecção Amperométrica de Amônia por Nanofios de Poli(pirrol)

Buscando-se outra opção de nanoestruturação dos filmes de poli(pirrol), estudou-se a deposição direta de nanofios desse polímero, através de técnicas eletroquímicas (voltametria de pulso normal e amperometria). A principal vantagem desses métodos de nanoestruturação é que a eletrodeposição ocorre de maneira que os nanofios são obtidos diretamente sobre o eletrodo, sem a necessidade de emprego de moldes. Entretanto, conforme será explicado na seção "resultados e discussão", a baixa eletroatividade dos nanofios obtidos limita as sensibilidades de detecçã, devido à natureza do dopante empregado na síntese (ClO₄⁻, em detrimento ao DBS⁻, utilizado em todos os outros experimentos apresentados neste trabalho).

A preparação dos eletrodos contendo os nanofios será descrita nos itens a seguir, e os testes de detecção amperométrica de amônia foram realizados da maneira convencional (0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação, com adições periódicas de alíquotas de NH₄Cl de concentração conhecida).

3.10.1. Nanofios Sintetizados por Voltametria de Pulso Normal

Um dos métodos de preparação de nanofios de poli(pirrol) consiste em aplicar a voltametria de pulso normal ao eletrodo de trabalho (Au, 0,02 cm²), estando este último mergulhado em uma solução de pirrol 0,1 mol L⁻¹ e LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹, preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0. Esta metodologia foi proposta por Ghanbari e colaboradores [42], e consiste em variar o potencial do eletrodo entre 0 e 0,8 V de maneira pulsada, conforme ilustrado na Figura 3.9. Utiliza-se os seguintes parâmetros experimentais: degrau de potencial = 4 mV, largura do pulso = 0,4 s, e período do pulso = 1,4 s. Durante a síntese dos nanofios foram empregados diferentes números de ciclos de deposição (5 a 70), sendo que o procedimento ilustrado na Figura 3.9 consiste em apenas 1 ciclo.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se DBSA 0,1 mol L⁻¹ ao invés de LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹, com o intuito de verificar se ocorre a síntese dos nanofios de poli(pirrol) dopado com DBS⁻.





3.10.2. Nanofios Sintetizados por Amperometria

Neste método, a síntese dos nanofios de poli(pirrol) dopado com perclorato é realizada potenciostaticamente a 0,7 V vs Ag/AgCl/KCl_{sat}, sobre eletrodos de Au (0,02 cm²), a partir de uma solução contendo pirrol 0,1 mol L⁻¹ e LiClO₄ 0,10 mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Para a tentativa de síntese dos nanofios dopados com DBS⁻, o procedimento é similar, sendo utilizada uma solução contendo DBSA 0,1 mol L⁻¹ ao invés do LiClO₄.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção de NH₃ por Poli(pirrol) Maciço

A primeira etapa deste trabalho consiste na determinação dos parâmetros ótimos de funcionamento do **sensor** de amônia, e esta otimização é necessária visto que a detecção de uréia pelo **biossensor** proposto ocorre de maneira indireta. Na realidade, a espécie detectável eletroquimicamente é a amônia, a qual é produto da hidrólise da uréia sob ação catalítica da urease, segundo a reação:

 $NH_2CONH_2 + 3 H_2O \xrightarrow{urease} 2 NH_4^+ + HCO_3^- + OH^-$ [96]

Em meio básico, como o utilizado nos experimentos descritos a seguir (pH 10,0), ocorre a desprotonação dos íons amônio, favorecendo a presença majoritária de amônia, NH₃, em solução. A amônia por sua vez pode ser detectada amperometricamente pelo poli(pirrol), conforme descrito na introdução.

4.1.1. Otimização Quanto à Carga de Poli(pirrol)

A polimerização do pirrol é realizada por cronoamperometria, a 0,7 V. Uma vez que o resultado deste tipo de experimento eletroquímico é um gráfico de corrente versus tempo, a área desse gráfico fornece a carga de polímero eletrodepositada, e desta maneira, variando-se o tempo de aplicação do potencial, podem ser obtidas diferentes cargas de polímero sobre o eletrodo. A Figura 4.1 exemplifica a eletrodeposição de 2,0 C cm⁻² de poli(pirrol) sobre Pt (0,02 cm²).

Conforme descrito no procedimento experimental, a polimerização é feita em uma μ -célula eletroquímica, e o volume de solução (Py 50,0 mmol L⁻¹ + DBS⁻ 25,0 mmol L⁻¹) empregado neste caso é pequeno, cerca de 200,0 μ L. O perfil de deposição que se observa no cronoamperograma da Fig. 4.1, no qual a corrente se torna

constante a partir de 100s, é condizente com a teoria de a reação se tornar limitada por transporte de massa, considerando-se que não há agitação da solução durante a reação. É válido salientar que a polimerização do pirrol em diferentes densidades de carga segue o mesmo comportamento apresentado na Fig. 4.1.



Figura 4.1. Deposição potenciostática (0,7 V) de 2,0 C cm⁻² de PPy sobre Pt, a partir de solução aquosa contendo Py 50,0 mmol L⁻¹ + DBS⁻ 25,0 mmol L⁻¹.

Para a detecção amperométrica de amônia, foram empregados eletrodos cujas densidades de carga de poli(pirrol) eletrodepositado variou entre 0,5 e 3,0 C cm⁻². Os testes de detecção consistem na aplicação de um potencial fixo (0,35 V neste caso) ao eletrodo de trabalho, contido numa célula eletroquímica convencional (3 eletrodos), cujo eletrólito suporte é tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10,0). Os resultados obtidos com os eletrodos contendo diferentes quantidades de poli(pirrol) encontramse na Figura 4.2. Nesses experimentos, cada salto de corrente corresponde à adição ao eletrólito de uma alíquota de solução de NH₄Cl de concentração conhecida, ocasionando um incremento de 0,1 mmol L⁻¹ na concentração total de NH₄⁺.



Figura 4.2. Testes amperométricos de detecção de NH₃ por eletrodo contendo PPy em diferentes densidades de carga: (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5; (d) 2,0; (e) 2,5 e (f) 3,0 C cm⁻². E= 0,35V, pH= 10,0 (tampão borato 0,1 mol L⁻¹) e incremento de 0,1 mmol L⁻¹ de NH₄CI por adição, sob agitação contínua.

O principal parâmetro que se utiliza para comparar o desempenho dos diferentes sensores é a sensibilidade de detecção do analito que cada um apresenta. O cálculo dessa grandeza é realizado da seguinte forma:

(a) Constrói-se um gráfico da densidade de corrente em função da concentração de analito:

A partir do amperograma de detecção de amônia, lê-se a densidade de corrente nos patamares, após a adição do analito, cujo incremento na concentração é conhecido (0,1 mmol L⁻¹ por adição, nos exemplos da Fig. 4.2). Nesses patamares, a corrente é estável por ter atingido um limite difusional. Obtidos os valores de densidade de corrente correspondentes a cada incremento de concentração, o gráfico de j versus [NH₄CI] pode ser construído.

(b) Traça-se a reta que melhor se ajusta aos pontos experimentais:

Aplicando-se uma regressão linear aos pontos experimentais do gráfico j versus [NH₄CI], obtém-se uma reta, conhecida como curva analítica, cujo coeficiente angular corresponde à sensibilidade (S) do sensor frente à detecção do analito. O valor do coeficiente de correlação (R) da reta obtida também é um parâmetro importante, pois quanto mais próximo de 1,0, melhor a adequação da reta aos dados experimentais.

Os gráficos apresentados na Figura 4.3. são obtidos de acordo com a metodologia descrita nas etapas (a) e (b) acima, a partir dos amperogramas contidos na Fig. 4.2.



Figura 4.3. Curvas analíticas, sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) dos sensores apresentados na Fig. 4.2. (a) 0,5; (b) 1,0; (c) 1,5; (d) 2,0; (e) 2,5; (f) 3,0 C cm⁻² de PPy, conforme indicado.

A tendência observada nesses experimentos é de aumento da sensibilidade de detecção de amônia quanto maior a densidade de carga de poli(pirrol) no sensor, até o valor de 2,5 C cm⁻², conforme ilustrado na Figura 4.4. Esta observação é importante no sentido de comprovar a ação do poli(pirrol) como transdutor do sensor, uma vez que a resposta eletroquímica do dispositivo está diretamente ligada à quantidade de poli(pirrol) presente. Entretanto, acima de 2,5 C cm⁻², a sensibilidade de detecção de amônia diminui. Este resultado é consistente com o fato descrito na literatura [70] e observado experimentalmente, de que filmes mais espessos se tornam não-aderentes e são facilmente removidos da superfície do eletrodo pela simples ação de um jato de água.

Ainda na Fig. 4.3, outra característica apresentada por todos os seis sensores é a saturação da resposta amperométrica a partir de 0,4 mmol L⁻¹, o que significa que, para concentrações de amônia acima deste valor, o que se observa é uma diminuição progressiva dos saltos de corrente. Por este motivo a regressão linear é traçada com base apenas nos 5 primeiros pontos ([NH₄CI] \leq 0,4 mmol L⁻¹), que correspondem à faixa linear de detecção. Considerando-se uma eventual aplicação desses sensores na determinação de amônia em amostras clínicas, nas quais a concentração dessa espécie varia entre 18-72 µmol L⁻¹ [80], a faixa linear de concentrações é adequada e inclusive extrapola em cerca de 4 vezes o valor máximo geralmente encontrado nesse tipo de amostra.



Figura 4.4. Sensibilidade de detecção de amônia (em pH 10,0 e a 0,35V) em função da densidade de carga de PPy presente no sensor.

Foram analisados também filmes cuja densidade de carga de poli(pirrol) era menor que 0,5 C cm⁻² (0,05 e 0,25 C cm⁻²). Entretanto, as respostas obtidas foram negligíveis, visto que a quantidade de poli(pirrol) era insuficiente para realizar a transdução do sinal químico em sinal elétrico (corrente). No início do crescimento do filme polimérico o eletrodo adquire uma coloração amarelo-translúcida, que corresponde à forma neutra do polímero. Aumentando o tempo de polarização, o eletrodo torna-se azul escuro e, em seguida, uma camada preta de polímero é obtida, esta última correspondendo ao poli(pirrol) oxidado [10]. Quando se depositou o poli(pirrol) em densidades de carga inferiores a 0,5 C cm⁻², observou-se que o eletrodo não atingia a coloração azul-escura, indicando a formação de um filme bastante fino do polímero, fato que explica as sensibilidades desprezíveis obtidas.

Em suma, a quantidade de poli(pirrol) que confere melhor desempenho ao sensor frente à detecção de amônia é 2,5 C cm⁻², e portanto será mantida nos próximos experimentos apresentados.

4.1.2. Otimização quanto ao Potencial de Trabalho

A finalidade desta etapa do trabalho consiste na determinação do potencial no qual a detecção de amônia é mais eficiente, isto é, o potencial no qual a sensibilidade é maior. Para tanto, foram analisados os amperogramas de detecção realizados em três potenciais distintos: 0,30, 0,35 e 0,40 V (Figura 4.5). Nesses experimentos, fixouse a densidade de carga de poli(pirrol) em 2,5 C cm⁻², e o pH da solução em 10,0 (tampão borato 0,1 mol L⁻¹). Cada incremento de corrente corresponde a uma adição de solução de NH₄Cl em concentração conhecida, e para cada adição a concentração total de NH₄⁺ aumentava 60 µmol L⁻¹.



Figura 4.5. Testes amperométricos de detecção de NH₃ em diferentes potenciais, conforme indicado. Carga de PPy do sensor = 2,5 C cm⁻². Testes em pH 10,0 (tampão borato 0,1 mol L⁻¹) e incremento de 60 μmol L⁻¹ por adição de NH₄Cl, sob agitação contínua.

Na Figura 4.6 encontram-se as curvas analíticas relativas aos sensores testados nos três potenciais (Fig. 4.5). A análise dessas curvas revela que nos três potenciais a faixa de detecção de amônia é linear até concentrações bem acima das tipicamente encontradas em amostras clínicas (18-72 µmol L⁻¹), e que a maior sensibilidade de detecção é obtida quando o potencial aplicado é 0,35 V, e também

nessa condição se obtém uma melhor adequação da reta aos pontos experimentais, verificada pelo coeficiente de correlação mais próximo de 1,0.



Figura 4.6. Curvas analíticas, sensibilidades (S) e coeficientes de correlação (R) dos sensores apresentados na Fig. 4.5. Testes a (a) 0,30, (b) 0,35 e (c) 0,40 V, conforme indicado.

As sensibilidades obtidas em função do potencial de operação do sensor estão apresentadas na Figura 4.7. Variações de 50 mV no potencial em que é realizada a detecção de amônia são responsáveis por alterações consideráveis na sensibilidade, e dentre os analisados, o potencial mais favorável para a transdução é 0,35 V. Portanto, este será o potencial empregado nas próximas detecções.



Figura 4.7. Sensibilidade de detecção de amônia em função do potencial de operação.

O resultado apresentado na Fig. 4.7 pode ser corroborado pelo voltamograma cíclico de um filme de poli(pirrol), realizado a 50 mV s⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (Figura 4.8). Observa-se nesse voltamograma que o máximo do pico de oxidação encontra-se exatamente em 0,35 V, demonstrando a maior eletroatividade do polímero neste potencial.



Figura 4.8. Voltamograma cíclico de um filme de PPy, realizado em tampão borato 0,1 mol L⁻¹, pH 10,0, a 50 mV s⁻¹.

4.2. Utilização do Poli(5-Amino-1-Naftol) na Redução do Sinal de Interferentes

Conforme descrito na introdução, o poli(5-amino-1-naftol) é um polímero que pode ser utilizado com a finalidade de minimizar o sinal amperométrico gerado por espécies interferentes, como por exemplo os ácidos úrico e ascórbico, que se oxidam na mesma faixa de potenciais que o analito de interesse. Desta forma, será analisado nesta etapa o potencial desse polímero na redução ou supressão do sinal dos dois interferentes citados. Essa análise é interessante na medida em que o poli(5-amino-1-naftol) também poderá ser utilizado na construção do biossensor de uréia, e caso seja observado o efeito esperado, esse polímero terá um papel duplo no biossensor: além

de reduzir o sinal de possíveis espécies interferentes, permitirá a imobilização covalente da urease à matriz polimérica.

Foram realizados dois experimentos no sentido de verificar a ação do poli(5amino-1-naftol). No primeiro deles, utilizou-se um sensor contendo apenas poli(pirrol) (2,5 C cm⁻²), preparado da maneira convencional, e no segundo foi eletrodepositado por voltametria cíclica (50 ciclos) um filme de poli(5-amino-1-naftol) sobre o poli(pirrol). Em ambos os casos foram realizados testes amperométricos, durante os quais se adicionou, após o NH₄CI, os ácidos ascórbico e úrico. Foram feitas três adições de cada um dos compostos, e cada uma delas corresponde a um incremento de concentração de 60 µmol L⁻¹ do respectivo composto. Os testes foram realizados a 0,35 V, sob agitação contínua, em meio de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Os resultados desses dois experimentos encontram-se nas Figuras 4.9 e 4.10, respectivamente.



Figura 4.9. Cronoamperograma de detecção de amônia, ácido ascórbico e ácido úrico, pelo sensor contendo <u>apenas poli(pirrol)</u>. Efetuou-se 3 adições consecutivas de cada um dos compostos, conforme indicado. E= 0,35 V; tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0; agitação contínua.



Figura 4.10. Cronoamperograma de detecção de amônia, ácido ascórbico e ácido úrico, pelo sensor contendo <u>poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol)</u>. Efetuou-se 3 adições consecutivas de cada um dos compostos, conforme indicado. E= 0,35 V; tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0; agitação contínua.

Na Fig. 4.9, que apresenta o teste de detecção de amônia e interferentes por um sensor contendo apenas poli(pirrol), se observa que, no potencial de 0,35V, são gerados sinais amperométricos após a adição dos ácidos ascórbico e úrico, e os saltos de corrente relativos a esses interferentes são inclusive maiores do que os da própria amônia.

Entretanto, na Fig. 4.10, que mostra o teste de detecção de amônia e interferentes pelo sensor contendo ambos poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol), observa-se que este último polímero não apenas reduz, e sim praticamente suprime o sinal dos interferentes adicionados, em relação ao sinal gerado pela oxidação da amônia. Este resultado é bastante interessante, e pode ser explicado de maneira simples. O poli(5-amino-1-naftol) apresenta em sua estrutura vários grupos OH livres (ver Fig. 1.5 da introdução), ocasionando uma alta densidade eletrônica sobre sua superfície. Os interferentes ácidos ascórbico e úrico apresentam-se na forma aniônica no pH básico mantido durante as análises, e dessa forma são repelidos eletrostaticamente pelo poli(5-amino-1-naftol). Essa ação eletrostático-repulsiva do

poli(5-amino-1-naftol) frente aos ácidos ascórbico e úrico impede que essas espécies carregadas se aproximem ao poli(pirrol), ocasionando a supressão do sinal amperométrico verificada na Fig. 4.10.

4.3. Biossensores de Uréia Maciços

A construção do biossensor de uréia proposto nesta tese consiste em incorporar a enzima urease ao sensor de amônia otimizado, descrito nos itens anteriores. Inicialmente, a intenção é aliar as propriedades de detecção amperométrica de amônia pelo poli(pirrol), e a diminuição do sinal de interferentes resultante da ação eletrostático-repulsiva do poli(5-amino-1-naftol). Após a incorporação da enzima urease à matriz bi-polimérica, o biossensor assim obtido se caracterizará pela detecção indireta da uréia, uma vez que a urease catalisa a reação de hidrólise da uréia em amônia, e esta última espécie é que será detectada eletroquimicamente. Nesse sentido, um resultado fundamental que comprova que a detecção da uréia não ocorre sem a presença de enzima é apresentado na Figura 4.11, que corresponde a um teste de detecção amperométrica realizado a 0,35 V e em pH 10,0, conforme usual, utilizando-se o sensor contendo 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) poli(5-amino-1-naftol) adicionadas е apenas. Nesse experimento foram periodicamente alíquotas de solução de uréia, cada uma ocasionando um aumento de 0,6 mmol L⁻¹ na concentração total desse analito. A análise desse experimento revela que não há detecção de uréia pelo sensor contendo apenas os dois polímeros, uma vez que não ocorre a produção de amônia, que é a espécie detectável. Como será verificado nos itens a seguir, a presença da urease é fundamental para a viabilidade da detecção de uréia.



Figura 4.11. Verificação da detecção de uréia pelo sensor contendo *poli(pirrol) (2,5 C cm⁻²) + poli(5-amino-1-naftol), sem urease*. Efetuou-se 3 adições de solução de uréia, conforme indicado, cada uma ocasionando um incremento de 0,6 mmol L⁻¹. E= 0,35 V; tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0; agitação contínua.

4.3.1. Comparação entre os Diferentes Tipos de Imobilização da Urease

Na etapa de desenvolvimento do biossensor para detecção de uréia, foram estudadas diferentes maneiras de se incorporar a enzima urease no sensor de amônia, isto é, na matriz polimérica de poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol). Quatro métodos foram analisados visando-se obter maiores sensibilidades de detecção do analito, neste caso a uréia. Os resultados e a discussão pertinente a cada forma de imobilização encontram-se a seguir.

A) Imobilização Espontânea

De acordo com a metodologia descrita na parte experimental, a proposta desse experimento era verificar a adsorção espontânea da enzima na matriz polimérica (poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol)). A partir da análise do teste amperométrico mostrado na Figura 4.12, conclui-se que o procedimento empregado foi inadequado, pois praticamente não houve imobilização da urease, e essa afirmação é baseada no fato de não se observar saltos de corrente após sucessivas

adições de uréia à solução. Provavelmente, nas condições experimentais empregadas (apenas 3 h de imersão do eletrodo em solução diluída de enzima, a 4 °C), a quantidade de enzima imobilizada seja ínfima, e também a lavagem do eletrodo com água deionizada antes do início do teste talvez ocasione a lixiviação das unidades de enzima eventualmente adsorvidas. Outra explicação é a ocorrência de repulsão entre a urease (carregada negativamente em pH 10,0) e os grupos –OH livres do poli(5-amino-1-naftol), que apresentam elevada densidade eletrônica.



Figura 4.12. Cronoamperograma de detecção de uréia pelo biossensor preparado via imobilização espontânea. Efetuou-se sucessivas adições de solução de uréia, conforme indicado, cada uma ocasionando um incremento de 0,6 mmol L⁻¹. E= 0,35 V; tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0; agitação contínua.

B) Imobilização por Barreira Física de Acetato de Celulose

Este tipo de imobilização consiste em formar uma barreira física sobre o filme de enzima, impedindo que elas sejam lixiviadas, conforme ilustra a Figura 4.13. A barreira escolhida neste caso foi o acetato de celulose, um polímero bastante empregado para esse propósito.



Figura 4.13. Esquema da imobilização da urease pelo acetato de celulose, uma barreira física que impede a perda de enzimas (urease) por lixiviação.

O teste de detecção de uréia e a curva analítica obtidos com esse tipo de biossensor encontram-se na Figura 4.14. Como usual, a detecção foi realizada a 0,35 V e em solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante. Alíquotas de solução de uréia eram periodicamente adicionadas ao sistema, causando um aumento de 0,6 mmol L⁻¹ na concentração de uréia por adição. Cada salto observado na Fig. 4.14 (a) corresponde a uma adição de uréia. A formação desses saltos é devida à reoxidação do poli(pirrol), ocasionada após a oxidação da amônia a NO, ressaltando-se que a formação da amônia é resultado da ação catalítica da urease.

A sensibilidade de detecção de uréia desse biossensor é baixa (S= 0,02 µA cm⁻² mmol⁻¹ L). Acredita-se que a formação da barreira física de acetato de celulose sobre as enzimas dificulta a difusão das moléculas de uréia até o sítio ativo das enzimas, diminuindo portanto a produção de amônia e também a corrente gerada.

Por outro lado, a reta traçada (Fig. 4.14 (b)) ajusta-se muito bem aos pontos experimentais, e o intervalo de resposta linear é amplo, considerando-se que a concentração de uréia tipicamente presente em amostras clínicas encontra-se entre 1,3 e 3,5 mmol L⁻¹ [1].



Figura 4.14. (a) Cronoamperograma de detecção de uréia pelo biossensor cuja imobilização da urease é feita por barreira física de acetato de celulose. E= 0,35 V, tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, incremento de 0,6 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante. (b) Curva analítica do biossensor, sua sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) da regressão linear.

C) Imobilização por Ligações Cruzadas com Glutaraldeído

A formação de ligações cruzadas entre o glutaraldeído e a urease tem por finalidade reduzir novamente a perda das enzimas por lixiviação ao longo da utilização do biossensor, e também facilitar a difusão do analito até o centro ativo de reação das enzimas imobilizadas. O glutaraldeído é uma molécula freqüentemente empregada em aplicações bioquímicas como um *crosslinker* homobifuncional (apresenta dois grupos aldeído terminais) reativo frente a grupos amino presentes em enzimas, por exemplo. Desta maneira, a reação do glutaraldeído com a urease ocasiona a formação de uma rede entrecruzada dessas espécies, conforme esquematizado na Figura 4.15.



Figura 4.15. Ilustração da formação de redes interpenetrantes de urease e glutaraldeído no biossensor cuja imobilização da enzima é feita por ligações cruzadas.

A preparação desse biossensor consistiu na deposição por *casting* de 10 μL de solução de urease 2,5 mg mL⁻¹, BSA 5,0 mg mL⁻¹ e glutaraldeído 0,15% v/v sobre o eletrodo contendo os dois polímeros. Então o eletrodo é mantido a 4 °C até evaporação do solvente. Os resultados obtidos com esse biossensor encontram-se na Figura 4.16. A sensibilidade obtida neste caso é bem maior, S= 0,18 μA cm⁻² mmol⁻¹ L, comparando-se com o último biossensor apresentado (imobilização da urease por barreira física). Atribui-se esse aumento de sensibilidade à maior facilidade de aproximação da uréia ao sítio reativo da enzima, uma vez que elas estão mais expostas do que no caso anterior, conforme se ilustrou esquematicamente na Fig. 4.15.

Ainda na Fig. 4.16, observa-se no gráfico (b) que a reta ajusta-se bem aos pontos experimentais, e que a faixa de concentrações na qual a resposta é linear até cerca de 4,5 mmol L⁻¹ de uréia. Essa saturação da resposta ocorre devido: (a) à grande quantidade de analito que é hidrolisado pela enzima em um determinado tempo, sobrecarregando-a e causando uma diminuição de sua atividade, e (b) à ocorrência de interações irreversíveis entre o poli(pirrol) e a amônia em concentrações elevadas, causando a diminuição da eletroatividade do polímero.



Figura 4.16. (a) Cronoamperograma de detecção de uréia pelo biossensor cuja imobilização da urease é feita por ligações cruzadas. E= 0,35 V, tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, incremento de 0,6 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante. (b) Curva analítica do biossensor, sua sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) da regressão linear.

O biossensor preparado e testado (Fig. 4.16) foi mantido por seis dias a 4 °C imerso em solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Ao se repetir o teste de detecção de uréia no sexto dia, o resultado obtido é a redução em 3 vezes no valor de sensibilidade de detecção de uréia (Figura 4.17; S= 0,06 μA cm⁻² mmol⁻¹ L). Conforme descrito anteriormente, no tipo de imobilização da enzima empregado nesse biossensor, se formam ligações cruzadas entre a urease e o glutaraldeído, mas não entre ambos e o substrato polimérico. Desta maneira, com o passar do tempo provavelmente boa parte do filme contendo urease entrecruzada com glutaraldeído se desprenda do eletrodo, diminuindo a quantidade de enzima presente e causando a redução na sensibilidade.



Figura 4.17. Repetição do teste de detecção amperométrica de uréia, após 6 dias de preparo do biossensor. E= 0,35 V, tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, incremento de 0,6 e 1,2 mmol L⁻¹ de uréia por adição, conforme indicado, sob agitação constante.

D) Imobilização por Ligação Química ao Poli(5-Amino-1-Naftol)

Para a obtenção de biossensores cuja sensibilidade de detecção de uréia seja elevada e se mantenha assim ao longo do tempo, mantêm-se os esforços para encontrar uma metodologia de imobilização da enzima mais adequada a esse propósito.

Nesse sentido, uma maneira elegante de imobilizar a urease sobre o poli(5amino-1-naftol) consiste em ligá-los quimicamente através de uma ligação covalente. Com esse propósito, faz-se uso de uma molécula denominada "âncora", o cloreto cianúrico, de estrutura apresentada na Figura 4.18, e cuja ação foi detalhada na introdução. A ligação covalente formada entre a enzima e o substrato deve extinguir o problema de perda da enzima por lixiviação ao longo do tempo.



Figura 4.18. Fórmula estrutural do cloreto cianúrico.

A preparação do biossensor consistiu, na primeira etapa, em ligar quimicamente a urease ao poli(5-amino-1-naftol). Em seguida, realizou-se o procedimento de imobilizar a urease por ligações cruzadas, da mesma maneira descrita no item C (utilizando-se o glutaraldeído). Um esquema do design do biossensor é apresentado na Figura 4.19. O intuito de preparar o biossensor desta maneira é poder compará-lo àquele cuja imobilização da enzima ocorre via ligações cruzadas apenas, e então atribuir qualquer melhora no desempenho do dispositivo à presença das ligações químicas entre a urease e o poli(5-amino-1-naftol), visto que esta é a única diferença entre os dois biossensores.



Figura 4.19. Ilustração do procedimento de preparo do biossensor cuja imobilização da urease foi realizada por ligação química ao poli(5-amino-1-naftol), e em seguida por formação de ligações cruzadas com glutaraldeído.

Foram realizados testes de detecção de uréia utilizando-se o biossensor ilustrado na Fig. 4.19 em quatro ocasiões distintas: no dia em que foi preparado e após 6, 15 e 20 dias. No intervalo entre os experimentos o eletrodo foi mantido a 4 °C imerso em solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Os experimentos realizados no primeiro e décimo quinto dias encontram-se na Figura 4.20.



Figura 4.20. Cronoamperogramas de detecção de uréia pelo biossensor cuja imobilização da urease é feita por ligação química, e respectivas curvas analíticas, nas quais: sensibilidade = S e coeficiente de correlação da regressão linear = R. (a) e (b) correspondem ao teste do 1° dia, (c) e (d) ao do 15° dia. E= 0,35 V, tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, incremento de 0,6 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante.

Para facilitar a discussão e torná-la menos repetitiva, a partir daqui serão empregadas as seguintes abreviações, designando os biossensores a partir do respectivo método de imobilização da urease:

IE = Imobilização Espontânea; IBF = Imobilização via Barreira Física; ILC = Imobilização via Ligações Cruzadas; ILQS = Imobilização via Ligação Química ao Substrato.

Verifica-se na Fig. 4.20 um aumento da sensibilidade do biossensor ILQS em cerca de quatro vezes, do primeiro ao décimo quinto dia. Primeiramente atribuiu-se essa melhora no desempenho do biossensor à formação de novas ligações entre as

enzimas presentes na camada contendo glutaraldeído e âncoras que possivelmente não tenham reagido, aumentando assim a quantidade de urease imobilizada quimicamente. Entretanto, após a realização de um experimento onde se imobilizou a urease apenas via ligações químicas ao poli(5-amino-1-naftol), sem a adição da camada de glutaraldeído, verificou-se o mesmo comportamento, isto é, um aumento da sensibilidade ao longo do tempo. Desta maneira atribui-se essa melhora na resposta à melhor acomodação da estrutura enzimática ao longo do tempo, expondo mais seu sítio ativo ao meio analítico.

Além disso, ao se comparar as sensibilidades de detecção deste biossensor com os demais apresentados até aqui, conforme sumarizado na Tabela 4.1, observase que:

(a) no primeiro dia, a sensibilidade do biossensor ILQS é bem maior que do IBF, mas apresenta a mesma ordem de grandeza do biossensor ILC;

(b) do sexto ao décimo quinto dia a sensibilidade do biossensor ILQS atinge um patamar estável em cerca de 0,50 μA cm⁻² mmol⁻¹ L, enquanto os outros biossensores praticamente perdem sua capacidade de detecção de uréia;

(c) somente a partir do vigésimo dia o biossensor ILQS não apresenta mais resposta amperométrica apreciável frente à detecção da uréia.

A relativa estabilidade do biossensor ILQS em comparação aos demais se deve à formação efetiva de ligações químicas entre a urease e o poli(5-amino-1naftol), impedindo que as enzimas imobilizadas quimicamente se desprendam do substrato, causando o fenômeno de lixiviação já descrito anteriormente.

Forma de Imobilização	1 [°] dia S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L	6 [°] dia S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L	<mark>15[°] dia</mark> S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L	<mark>20[°] dia</mark> S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L
Espontânea (IE)	-	-	-	-
Barreira Física (IBF)	0,02	-	-	-
Ligações Cruzadas (ILC)	0,18	0,06	-	-
Ligação Química ao	0.12	0.47	0.50	
Substrato (ILQS)	0,13	0,47	0,50	-

Tabela 4.1. Sensibilidade de detecção de uréia dos diferentes biossensores em função do tempo.

Outro fato importante a se considerar na comparação entre os diferentes biossensores é a quantidade de enzima presente em cada um deles, que afeta diretamente os valores de sensibilidade obtidos. A Tabela 4.2 traz as sensibilidades apresentadas na Tabela 4.1 normalizadas pela massa de urease imobilizada. O cálculo da massa é feito diretamente a partir da concentração e do volume das soluções de urease empregadas para o preparo dos biossensores IBF e ILC. Para a determinação da massa de urease imobilizada quimicamente ao poli(5-amino-1-naftol), através do cloreto cianúrico, utilizou-se uma microbalança a cristal de quartzo. O procedimento, descrito na seção experimental, consiste em verificar a frequência de vibração de um cristal de quartzo piezelétrico contendo o eletrodo em dois momentos: a) após a ligação do cloreto cianúrico. Desta forma, a variação de frequência obtida é relativa à deposição de urease através da ligação covalente ao substrato, e a massa de enzima imobilizada pode ser então calculada a partir da Equação de Sauerbrey:

 $\Delta f = -k\Delta m$

Na qual: k = fator de sensibilidade integral = $6,45 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ Hz g}^{-1}$.

 Tabela 4.2. Sensibilidade de detecção de uréia dos biossensores em função do tempo. Valores normalizados pela massa de urease imobilizada.

Forma de Imobilização	<mark>1[°] dia</mark> S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L mg ⁻¹	<mark>15[°] dia</mark> S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L mg ⁻¹	<mark>Urease</mark> m / mg
Espontânea (IE)	-	-	-
Barreira Física (IBF)	0,04	-	5,00 x 10 ⁻¹
Ligações Cruzadas (ILC)	3,60	-	5,00 x 10 ⁻²
Ligação Química ao Substrato (ILQS)	2,49	9,56	5,23 x 10 ⁻²

Considerando então as sensibilidades normalizadas a partir da massa de urease efetivamente presente no biossensor, observa-se mais pronunciadamente o efeito benéfico da imobilização covalente da urease na estabilidade do biossensor.

4.3.2. Biossensores sem Poli(5-Amino-1-Naftol)

Adicionalmente, foram desenvolvidos biossensores contendo apenas um polímero, o poli(pirrol) (2,5 C cm⁻²), e a urease imobilizada diretamente sobre ele, com a finalidade de comparar as respostas obtidas com biossensores apresentando ou não poli(5-amino1-naftol). Nestes experimentos, empregou-se o método de imobilização da urease via ligações cruzadas com glutaraldeído, que consiste em depositar por *casting* sobre o filme de poli(pirrol) uma solução recém-preparada de urease, BSA e glutaraldeído. Foram analisadas três condições distintas de preparo, conforme apresentado na Tabela 4.3.

Biossensor	[Urease] mg mL ⁻¹	<mark>[BSA]</mark> mg mL ⁻¹	[Glutaraldeído] % v/v
1	25,0	40,0	5,0
2	5,0	10,0	0,30
3	2,5	5,0	0,15

Tabela 4.3. Concentrações de urease, BSA e glutaraldeído, utilizadas nos três experimentos.
Em seguida foram realizados testes de detecção de uréia com os três biossensores nas condições usuais, e as respectivas curvas analíticas encontram-se nas Figuras 4.21 a 4.23, relativas aos biossensores 1 a 3 da Tabela 4.3, respectivamente.

O que se poderia concluir equivocadamente através da análise dessas figuras é que a sensibilidade de detecção de uréia é inversamente proporcional à concentração de urease. Entretanto, deve-se considerar que o glutaraldeído em concentrações elevadas pode agir como uma barreira difusional entre a enzima e o meio analítico, e dessa forma mesmo utilizando-se grandes concentrações de urease, o bloqueio físico impede a aproximação da uréia aos sítios ativos da enzima, diminuindo então a sensibilidade de detecção.



Figura 4.21. Curva analítica do <u>biossensor 1</u>, sua sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) da regressão linear. Detecção a 0,35V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, com incrementos de 2,0 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante.



Figura 4.22. Curva analítica do <u>biossensor 2</u>, sua sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) da regressão linear. Detecção a 0,35V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, com incrementos de 2,0 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante.



Figura 4.23. Curva analítica do <u>biossensor 3</u>, sua sensibilidade (S) e coeficiente de correlação (R) da regressão linear. Detecção a 0,35V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, com incrementos de 2,0 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante.

O biossensor 3, descrito na Tabela 4.3, foi realizado nas mesmas condições que o apresentado anteriormente (item 4.3.1), o qual se denominou ILC (imobilização por ligações cruzadas), exceto que neste último o poli(5-amino-1-naftol) também estava presente. Ao se comparar então as sensibilidades de detecção de uréia de ambos os biossensores, observa-se que no caso em que não se utiliza o poli(5amino-1-naftol) sensibilidades cerca de trinta vezes maiores são obtidas (ver Tabela 4.4). Embora o poli(5-amino-1-naftol) também seja um polímero condutor, provavelmente a quantidade desse polímero presente no eletrodo (obtida a partir 50 ciclos de voltametria a 50 mV s⁻¹ em solução de monômero) seja excessiva, isto é, forma-se um filme espesso, prejudicando assim a difusão da amônia até o poli(pirrol), que é efetivamente o transdutor eletroquímico A veracidade desta afirmação será averiguada no item 4.3.4.

Além disso, a condutividade do polímero nas condições experimentais empregadas deve ter sido reduzida, pois se sabe que esse polímero apresenta condutividade de cerca de 10⁻³ S cm⁻¹ apenas em pHs ácidos e meios orgânicos [44], não sendo o caso dos experimentos realizados neste trabalho (pH 10,0).

Biossensor ILC	<mark>Sensibilidade</mark> S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L
sem poli(5-amino-1-naftol)	6,02
com poli(5-amino-1-naftol)	0,18

 Tabela 4.4. Comparação das sensibilidades de detecção de uréia dos biossensores

 ILC contendo ou não poli(5-amino-1-naftol).

Nos tipos de imobilização da urease por ligações cruzadas com glutaraldeído e por barreira física de acetato de celulose, a presença do poli(5-amino-1-naftol) não é essencial, como no caso da imobilização por ligações químicas descrita anteriormente, método no qual ligações covalentes são promovidas entre a urease e esse polímero. A utilização desse polímero foi necessária para poder comparar os biossensores em termos apenas das diferentes formas de imobilização da urease, uma vez que o substrato bipolimérico era o mesmo em todos os experimentos. Além disso, como foi demonstrado em seções anteriores, o poli(5-amino-1-naftol) apresenta

um grande potencial na supressão do sinal de interferentes, justificando então sua presença em todos os biossensores.

4.3.3. Justificativa do pH empregado nas análises

Um dos primeiros parâmetros que se procurou otimizar no caso do biossensor de uréia foi o pH mantido durante as análises, visto que a atividade enzimática é reconhecidamente dependente dessa variável. Foram realizados testes de detecção amperométrica de uréia em pHs variando entre 7,17 e 10,20, e os resultados encontram-se na Figura 4.24. Esses experimentos foram realizados com um biossensor contendo apenas poli(pirrol) em densidade de carga igual a 2,5 C cm⁻², e a forma de imobilização da urease utilizada foi a formação de ligações cruzadas com glutaraldeído (neste caso sem BSA). O procedimento de preparo do eletrodo consiste em depositar por *casting* sobre o poli(pirrol) 10 μL de solução 3,5 mg mL⁻¹ de urease e 0,19% de glutaraldeído v/v. Então, aguarda-se a secagem do filme mantendo o eletrodo a 4 °C. Como usual, os experimentos são realizados a 0,35 V, em uma célula contendo 5,0 mL de tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (para pHs entre 8,14 e 10,20) ou tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ + KCl 50 mmol L⁻¹ (para pH 7,17), sob agitação contínua. São adicionadas alíquotas de solução de uréia que ocasionam, cada uma, um aumento de 0,6 mmol L⁻¹ na concentração total.



Figura 4.24. Cronoamperogramas de detecção de uréia em diferentes pHs, conforme indicado. (a) tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ + KCI 50 mmol L⁻¹; (b), (c) e (d) tampão borato 0,1 mol L⁻¹. E= 0,35 V, incremento de 0,6 mmol L⁻¹ de uréia por adição, sob agitação constante. Eletrodo contendo 2,5 C cm⁻² de PPy, urease 3,5 mg mL⁻¹ + glutaraldeído 0,19% v/v.

Verifica-se na Fig. 4.24 que a resposta amperométrica do biossensor frente à detecção de uréia é estritamente dependente do pH do meio. Entre os pHs 7,17 e 8,14, não se observa nenhum salto de corrente após as adições de uréia. Em pH 9,08 começa a obtenção de resposta às adições, entretanto muito pequena (centésimos de microampéres por adição). Apenas em pH 10,20 é que saltos maiores de corrente são gerados, e estes resultados estão diretamente ligados à conversão dos íons amônio (NH₄⁺), formados na reação de hidrólise da uréia pela urease, à amônia (NH₃), que é a espécie mensurável eletroquimicamente pelo poli(pirrol). Em pHs menos básicos (ex: 7 a 9), a conversão não é majoritária, pois o equilíbrio de

desprotonação encontra-se pouco deslocado no sentido de formação de amônia. Logo, se há pouco ou nenhum analito (NH₃) em solução, pequena ou nula será a resposta do biossensor. Por outro lado, em um pH tão alto quanto 10,20 ocorre a formação majoritária de amônia, e então a detecção deste analito é favorecida. É importante ressaltar que o sinal detectado por todos os biossensores apresentados neste relatório é, sem dúvida, relativo à formação de amônia a partir da hidrólise da uréia por <u>via enzimática</u>, e não devido ao elevado pH, conforme demonstrado na Fig. 4.11. Outra observação importante é que a atividade enzimática não foi comprometida em pH 10,20, uma vez que o aparecimento dos saltos de corrente está relacionado à detecção da amônia produzida pela ação catalítica da enzima.

4.3.4. Otimização da Quantidade de Poli(5-Amino-1-Naftol) no Biossensor

Conforme se sugeriu no item 4.3.2, uma limitação dos biossensores de uréia propostos era a baixa sensibilidade obtida ao se utilizar o poli(5-amino-1-naftol) polimerizado através de 50 ciclos de voltametria cíclica. Uma das possíveis explicações para isso é que essa quantidade de polímero estaria formando um filme relativamente espesso, prejudicando assim a difusão da amônia formada até o poli(pirrol), o transdutor eletroquímico do biossensor. Então, para verificar melhor esse efeito, decidiu-se otimizar a quantidade de poli(5-amino-1-naftol) depositada sobre o poli(pirrol).

A plataforma sobre a qual foram preparados os biossensores apresentados neste item consiste de um eletrodo de Pt recoberto com 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol). Sobre este polímero efetuou-se a eletropolimerização do monômero (5-amino-1-naftol), via voltametria cíclica a 50 mV s⁻¹, partindo-se de uma solução 5,0 mmol L⁻¹ de monômero e 1,0 mol L⁻¹ de ácido clorídrico. Em seguida, realizou-se a

imobilização covalente da urease ao poli(5-amino-1-naftol), através do cloreto cianúrico, segundo procedimento descrito na seção experimental. A otimização da quantidade de carga de poli(5-amino-1-naftol) presente no eletrodo foi controlada através do número de ciclos de voltametria. Foram preparados eletrodos submetidos a 10, 30, 50 e 70 ciclos, e os resultados encontram-se nas Figuras 4.25 a 4.28, respectivamente, conforme indicado nas legendas. Nessas figuras, o gráfico (a) corresponde à eletrodeposição do monômero, e o gráfico (b) é o teste amperométrico de detecção de uréia, realizado nas condições usuais, com adições de solução de uréia de concentração conhecida.



Figura 4.25. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 2,5 C cm⁻² de PPy: <u>10 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Cronoamperograma de detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.



Figura 4.26. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 2,5 C cm⁻² de PPy: <u>30 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCI 1,0 mol L⁻¹. (b) Cronoamperograma de detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.



Figura 4.27. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 2,5 C cm⁻² de PPy: <u>50 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Cronoamperograma de detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.



Figura 4.28. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 2,5 C cm⁻² de PPy: <u>70 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCI 1,0 mol L⁻¹. (b) Cronoamperograma de detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.

Com relação à eletrodeposição do poli(5-amino-1-naftol) (item (a) das Figuras 4.25 a 4.28), verifica-se que a corrente de máximo do pico em 0,3 V, correspondente à oxidação do polímero formado [94], aumenta do 10° ao 50° ciclo, passando de 13 a 15 μ A, e a partir de 50 ciclos se mantém estável em 15 μ A. A partir dessas informações, verifica-se que uma quantidade crescente de poli(5-amino-1-naftol) se deposita sobre o poli(pirrol) até 50 ciclos de deposição, não aumentando mais apreciavelmente a partir deste número de ciclos.

Como conseqüência disso, observa-se nos testes cronoamperométricos (item (b) das mesmas figuras) uma tendência de aumento da sensibilidade de detecção de uréia em função do aumento do número de ciclos, isto é, da quantidade de poli(5-amino-1-naftol) depositada. Por exemplo, na Fig. 4.25 (b), relativa a 10 ciclos de deposição, as variações de densidade de corrente obtidas ao se adicionar uréia à solução são muito pequenas, mesmo aumentando-se a concentração de cada alíquota adicionada (de 0,6 até 10,0 mmol L⁻¹ de incremento por adição), traduzindo-

se no ruído observado no cronoamperograma. Quanto menores as densidades de corrente registradas, maior é o ruído, devido à sensibilidade do potenciostato utilizado. Ainda nesta figura, observa-se também que a adição de íons amônio à solução fornece um aumento na densidade de corrente, indicando que o filme de poli(pirrol) está eletroquimicamente acessível à amônia formada pela hidrólise da uréia pela urease. É importante relembrar que o aumento de densidade de corrente se deve à reoxidação do poli(pirrol) no potencial empregado (0,35 V), após sua redução concomitante à oxidação da amônia, formando NO [71].

Testes cronoamperométricos de detecção de uréia mais regulares, menos ruidosos e mais sensíveis são obtidos com os biossensores preparados a partir de 50 e 70 ciclos de deposição do poli(5-amino-1-naftol). Nesses casos (item (b) das figuras 4.27 e 4.28) as adições de uréia fornecem maiores aumentos de densidade de corrente, principalmente com incremento de 10,0 mmol L⁻¹ por adição (3 últimos degraus dos cronoamperogramas). Nestes casos inclusive os incrementos de concentração menores geram patamares estáveis.

No item 4.3.2 ("Imobilização da Urease sobre Sensores sem Poli(5-Amino-1-Naftol)"), foi sugerido que as baixa sensibilidades de detecção de uréia dos biossensores contendo poli(5-amino-1-naftol), em comparação aos análogos contendo apenas poli(pirrol), poderiam ser devidas a um problema difusional gerado, uma vez que o emprego de 50 ciclos de voltametria para a deposição do segundo polímero estaria formando um filme muito espesso, dificultando a passagem da amônia. Entretanto, o que se verifica a partir dos novos experimentos apresentados neste item é que, independentemente do número de ciclos de voltametria aplicados durante a síntese, a variação nos valores de sensibilidade de detecção de uréia obtidos após a imobilização covalente da urease é muito pequena, conforme apresenta a Tabela 4.5. Os valores de sensibilidade mostrados apresentam erro de cerca de 5%, calculado a partir dos valores de sensibilidade obtidos com três biossensores idênticos preparados em dias diferentes.

Número de ciclos	Sensibilidade S / μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L	
10	-	
30	0,10	
50	0,12	
70	0,11	

Tabela 4.5. Sensibilidade de detecção de uréia do biossensor em função do número de ciclos de voltametria aplicados durante a polimerização do (5-amino-1-naftol).

Desta maneira, o que se conclui a partir dos novos dados é que o fator limitante da sensibilidade de detecção não é a espessura do filme de polímero formado sobre o poli(pirrol), uma vez que mesmo aumentando ligeiramente a quantidade de poli(5-amino-1-naftol) eletrodepositada (através do aumento do número de ciclos de voltametria), a sensibilidade não varia de maneira apreciável.

Além do pH de trabalho (10,0) não ser favorável para a eletroatividade do poli(5-amino-1-naftol), conforme já foi relatado, muito provavelmente a limitação da sensibilidade nos biossensores em que se imobiliza a enzima covalentemente ao substrato ocorre devido à quantidade de urease que pode ser ligada quimicamente ao polímero, através dos grupos –OH livres do mesmo. Propõe-se então a existência de uma saturação desses sítios reativos, uma vez que a área superficial dos diferentes filmes deva ser praticamente a mesma, ocasionando o ancoramento de uma quantidade muito parecida de enzima em todos os casos, explicando então o fato de as sensibilidades obtidas serem tão próximas. Se a quantidade de enzima imobilizada

não muda, a capacidade de conversão catalítica da uréia em amônia é sempre a mesma, e como resultado as sensibilidades dos biossensores permanecem praticamente inalteradas

Então, a análise dos resultados obtidos sugere que, dentre os biossensores desenvolvidos, o que apresenta desempenho ligeiramente melhor é realmente aquele preparado com 50 ciclos de deposição do poli(5-amino-1-naftol). É importante ressaltar que os valores de sensibilidade de todos os biossensores apresentados são intrinsecamente baixos, entretanto dentre eles o que apresenta maior valor relativo é o preparado a partir de 50 ciclos de deposição do poli(5-amino-1-naftol). Os valores de sensibilidade obtidos são pequenos devido à pouca quantidade de urease que pode ser imobilizada através desta metodologia (2,3 µg, conforme obtido por experimentos em microbalança a cristal de quartzo).

Tendo em vista as observações descritas, decidiu-se aumentar a quantidade de enzima imobilizada no biossensor, mas ainda utilizando-se a técnica de imobilização covalente. A maneira vislumbrada para tal finalidade foi aumentar a área superficial da matriz polimérica^{*}, conforme será apresentado e discutido nos itens a seguir.

Obviamente, mantendo-se constante a área geométrica do eletrodo base (Pt ou Au).

4.4. Biossensores de Uréia Macroporosos

Uma vez identificado o desafio de aumentar a sensibilidade de detecção de uréia através da imobilização de uma quantidade maior de urease na matriz polimérica, a estratégia adotada foi nanoestruturar a plataforma polimérica, via um molde de esferas de poli(estireno), com o objetivo de se obter um transdutor com maior área superficial, conforme ilustrado na Figura 4.29.



Figura 4.29. Ilustração do efeito de aumento da área superficial em um eletrodo nanoestruturado, em relação a um maciço.

4.4.1. Imobilização Covalente da Urease no Substrato Macroporoso

A metodologia empregada na nanoestruturação via molde (ou *template*) do poli(pirrol) foi descrita na seção experimental, e o resultado obtido antes da polimerização do (5-amino-1-naftol) pode ser visto na Figura 4.30, que corresponde a uma micrografia eletrônica de varredura do poli(pirrol) nanoestruturado.



Figura 4.30. Micrografia de um eletrodo contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) nanoestruturado via *template* de partículas de poli(estireno) de 460 nm de diâmetro.

A micrografia da Fig. 4.30 mostra que o objetivo de se obter uma elevada área superficial foi atingido com sucesso, através da utilização de um método relativamente simples e eficaz. Nota-se também que a rede de poros é interligada, não prejudicando a condução do sinal elétrico, como em outros casos (nanopartículas apresentam o problema de conexão elétrica, justificando a escolha do método de nanoestruturação via *template*).

Um resultado eletroquímico que comprova a obtenção de maior área superficial ativa do eletrodo nanoestruturado é apresentado na Figura 4.31, que corresponde aos voltamogramas cíclicos de eletrodos contendo 0,5 C cm⁻² de poli(pirrol) maciço ou nanoestruturado, realizados a 50 mV s⁻¹, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Observa-se nesses voltamogramas que as correntes de oxidação/redução em cerca de -0,4 /-0,7 V são ambas maiores para o eletrodo nanoestruturado, indicando que neste caso mais sítios eletroativos estão disponíveis (acessíveis), resultado da maior área superficial apresentada por esse eletrodo.



Figura 4.31. Voltamogramas cíclicos de eletrodos contendo 0,5 C cm⁻² de PPy/DBS⁻ maciço ou nanoestruturado, conforme indicado. v = 50 mV s⁻¹, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0.

Após ter sido obtida a nanoestruturação do filme de poli(pirrol), polimerizou-se o (5-amino-1-naftol) sobre ele, da maneira convencional, utilizando-se de 10 a 50 ciclos de voltametria, para realizar agora a otimização da quantidade desse polímero presente no eletrodo macroporoso. Os voltamogramas relativos à eletrodeposição do (5-amino-1-naftol) em diferentes quantidades e os correspondentes testes cronoamperométricos de detecção de uréia encontram-se nas Figuras 4.32 a 4.36. A densidade de carga de poli(pirrol) utilizada foi 0,25 C cm⁻², pois verificou-se que densidades de carga como as empregadas nos biossensores maciços (2,5 C cm⁻²) ocasionavam a perda da estrutura nanométrica, uma vez que o poli(pirrol) ultrapassava o limite (a altura) das nanoesferas, sendo obtido então um material superficial maciço (esse tópico será melhor detalhado em itens posteriores). A urease foi covalentemente ligada ao substrato polimérico através do ancoramento com cloreto cianúrico, e os testes de detecção de uréia foram realizados a 0,35 V, em solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua, com

adições de uréia à solução causando aumentos na concentração total indicados nos gráficos.



Figura 4.32. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 0,25 C cm⁻² de PPy nanoestruturado: <u>10 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.



Figura 4.33. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 0,25 C cm⁻² de PPy nanoestruturado: <u>20 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração variados, conforme indicado.



Figura 4.34. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 0,25 C cm⁻² de PPy nanoestruturado: <u>30 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração conforme indicado.



Figura 4.35. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 0,25 C cm⁻² de PPy nanoestruturado: <u>40 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração conforme indicado.



Figura 4.36. (a) Voltamogramas cíclicos de deposição do poli(5-amino-1-naftol) sobre 0,25 C cm⁻² de PPy nanoestruturado: <u>50 ciclos</u>, a 50 mV s⁻¹, a partir de solução aquosa de monômero 5,0 mmol L⁻¹ e HCl 1,0 mol L⁻¹. (b) Detecção de uréia a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação constante, com adições de uréia ocasionando incrementos de concentração conforme indicado.

Quanto à eletropolimerização do (5-amino-1-naftol), correspondente ao item (a) das Figuras 4.32 a 4.36, novamente se observa a tendência de aumento da corrente do pico de oxidação presente em 0,3 V com o aumento do número de ciclos de deposição. Parte-se de 11 μ A na polimerização utilizando 10 ciclos, e atinge-se 22 μ A, ao empregar 50 ciclos.

Com relação aos testes de detecção de uréia, apresentados no item (b) das mesmas figuras, nota-se que curvas mais estáveis e sensíveis são obtidas ao se empregar os biossensores contendo 40 e 50 ciclos de polimerização do (5-amino-1-naftol). Entretanto, ao efetuar-se uma análise comparativa das sensibilidades de detecção de um biossensor nanoestruturado e um maciço análogo, ambos contendo 0,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e 50 ciclos de polimerização do (5-amino-1-naftol), o resultado é diferente do esperado. Conforme mostra a Figura 4.37, a sensibilidade do biossensor nanoestruturado $(0,43 \ \mu A \ cm^{-2} \ mmol^{-1} \ L)$ é realmente maior que a do maciço $(0,35 \ \mu A \ cm^{-2} \ mmol^{-1} \ L)$, entretanto a diferença não é tão grande quanto se

esperaria devido ao efeito de área ganho com o eletrodo nanoestruturado. Então, foi obtida uma micrografia do filme nanoestruturado após os 50 ciclos de polimerização do (5-amino-1-naftol), para verificar a ocorrência de alguma modificação morfológica do filme, e o resultado encontra-se na Figura 4.38. Comparando-se o aspecto morfológico do filme nanoestruturado contendo apenas poli(pirrol) (Fig. 4.30) e aquele contendo também poli(5-amino-1-naftol) (Fig. 4.38), nota-se claramente que ocorre a perda do perfil macroporoso tridimensional do substrato polimérico neste último caso. O monômero (5-amino-1-naftol) se polimeriza preenchendo os poros do poli(pirrol) nanoestruturado, conferindo um caráter praticamente maciço ao filme, o que explicaria os valores de sensibilidade tão próximos obtidos.



Figura 4.37. Curvas analíticas obtidas a partir de testes de detecção de uréia com biossensores (a) nanoestruturado e (b) maciço, ambos contendo 0,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol) depositado em 50 ciclos.



Figura 4.38. Micrografia eletrônica de varredura de eletrodo nanoestruturado contendo 0,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e poli(5-amino-1-naftol) eletrodepositado em 50 ciclos de voltametria.

Desta forma, como poli(5-amino-1-naftol) é imprescindível na imobilização da urease através do método de formação de ligações covalentes ao substrato, e este método havia se mostrado o mais eficiente dentre os apresentados para a construção dos biossensores maciços, criou-se a necessidade de estudar novos métodos de imobilização da urease à matriz polimérica macroporosa, sem a utilização do poli(5-amino-1-naftol), de forma a manter o perfil nanoestruturado dos novos filmes desenvolvidos.

4.4.2. Imobilização da Urease no Substrato Macroporoso via Deposição LbL

Tendo em vista as desvantagens impostas ao se utilizar o poli(5-amino-1naftol) para a imobilização da urease sobre o poli(pirrol) nanoestruturado, decidiu-se eliminá-lo da matriz polimérica. Desta maneira, um novo método de imobilização deveria ser estudado, e foi escolhida a técnica de deposição camada por camada, desenvolvida por Decher e colaboradores [86-88], devido à sua simplicidade experimental e inúmeras vantagens, descritas na introdução. A intenção desses experimentos é aliar as vantagens de se empregar filmes nanoestruturados (maior área superficial, facilidade de difusão do analito entre os poros interconectados, etc) à metodologia simples e versátil da deposição camada por camada. A Figura 4.39 ilustra o objetivo supracitado, e corresponde hipoteticamente a um filme nanoestruturado de poli(pirrol), cujos poros servem como sítios de imobilização alternada de PDDA (um policátion, estruturas vermelhas) e urease (esferas laranjas).

Serão comparados os resultados obtidos ao se estudar biossensores maciços e nanoestruturados, preparados com 5 e 15 bicamadas de PDDA e urease, variando-se o tempo de imersão do eletrodo em cada solução.



Figura 4.39. Ilustração do processo de imobilização da urease camada por camada, em um filme de poli(pirrol) nanoestruturado.

Nos experimentos apresentados a seguir, eletrodos de platina contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) nanoestruturado foram utilizados como eletrodos base. O poli(pirrol) encontra-se dopado íons dodecilbenzenosulfonato com (DBS⁻), incorporados à matriz polimérica durante a síntese eletroquímica, conferindo assim uma densidade de carga negativa superficial a esse polímero. Desta forma, o eletrodo base é inserido alternadamente em uma solução de material de carga positiva (PDDA, um policátion), e em seguida de carga negativa (urease, que apresenta carga negativa no pH empregado, 10), permanecendo imerso em cada solução durante 30 minutos. O procedimento exato, bem como as concentrações e conteúdos das soluções foram esclarecidos na parte experimental.

As Figuras 4.40 e 4.41 correspondem aos testes de detecção de uréia (item (a)) e às curvas analíticas (item (b)) dos biossensores maciços, cuja imobilização da urease pelo método camada por camada foi realizada através de 5 e 15 ciclos de deposição, respectivamente. Os testes cronoamperométricos foram efetuados da maneira usual, a 0,35 V, em solução tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob contínua agitação. Alíquotas de solução de uréia foram adicionadas continuamente, provocando incrementos na concentração total de 40,0 mmol L⁻¹ por adição, conforme indicado.



Figura 4.40. (a) Teste de detecção de uréia empregando <u>biossensor maciço</u> contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) e <u>5 bicamadas</u>, a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua, com adições periódicas de uréia. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).



Figura 4.41. (a) Teste de detecção de uréia empregando <u>biossensor maciço</u> contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) e <u>15 bicamadas</u>, a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua, com adições periódicas de uréia. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).

As Figuras 4.42 e 4.43 a seguir são análogas às duas anteriores, mas correspondem aos biossensores cujos filmes poliméricos de poli(pirrol) foram nanoestruturados através do molde com esferas de poli(estireno), e contém também 5 e 15 bicamadas de urease, respectivamente. O procedimento empregado nesses testes de detecção de uréia e na deposição da urease é exatamente o mesmo dos experimentos com os biossensores maciços apresentados nas Figuras 4.40 e 4.41.



Figura 4.42. (a) Teste de detecção de uréia empregando <u>biossensor nanoestruturado</u> contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) e <u>5 bicamadas</u>, a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua, com adições periódicas de uréia. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).



Figura 4.43. (a) Teste de detecção de uréia empregando <u>biossensor nanoestruturado</u> contendo 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol) e <u>15 bicamadas</u>, a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação contínua, com adições periódicas de uréia. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).

Vários aspectos interessantes podem observados nas Figuras 4.40 a 4.43, entre eles a ótima estabilidade das curvas cronoamperométricas, traduzida na obtenção de patamares bastante regulares após cada adição de uréia; intervalo linear de concentrações bastante ampliado, em relação aqueles obtidos com biossensores preparados via imobilização covalente da urease; menores tempos de resposta; bons coeficientes de correlação (R) das curvas analíticas, bem próximos a 1,0. Estes resultados provavelmente referem-se a uma melhor cinética de detecção envolvida. Sugere-se que ao se utilizar esse tipo de imobilização da urease, via deposição eletrostática camada por camada, mais enzima pode ser adsorvida sobre a matriz polimérica, o que ocasiona o aumento no intervalo linear citado, aumentando também a sensibilidade de detecção (observar que no caso da imobilização covalente, são utilizados 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol) e são obtidas sensibilidades na ordem de 0,1 μA cm⁻² mmol⁻¹ L; no caso da imobilização via deposição camada por camada, somente 0,25 C cm⁻² de transdutor, isto é, 10 vezes menos, está presente no biossensor).

Observa-se também que ao comparar eletrodos da mesma classe (maciços ou nanoestruturados) contendo 5 e 15 bicamadas, quanto maior o número de bicamadas, maior a sensibilidade de detecção, o que é resultado da maior quantidade de enzima imobilizada com 15 ciclos de deposição.

Porém, um resultado inesperado foi obtido, analisando-se os experimentos apresentados. Comparando-se a resposta do biossensor maciço com o nanoestruturado, ambos contendo 5 bicamadas (a análise daqueles contendo 15 bicamadas é análoga), observa-se que a sensibilidade de detecção de uréia do maciço, apesar de ter a mesma ordem de grandeza, é ligeiramente maior (0,05 versus 0,02 µA cm⁻² mmol⁻¹ L). Conforme ilustrado na Fig. 4.39, a intenção de se

imobilizar a urease nos eletrodos nanoestruturados era fazer uso das cavidades nanométricas obtidas (460 nm de diâmetro) para imobilizar uma maior quantidade de urease, em comparação com o filme maciço (de superfície "*flat*"; ver Fig. 4.29). Entretanto, os dados de sensibilidade mostram que praticamente a mesma quantidade de enzima foi imobilizada nos dois casos. Os motivos sugeridos para ocorrência deste fato são:

(a) a existência de um possível efeito de capilaridade, impedindo que a soluções de PDDA (policátion utilizado) e urease penetrem por toda a estrutura porosa do poli(pirrol) nanoestruturado, ocorrendo então a adsorção eletrostática dessas espécies apenas na superfície do poli(pirrol);

(b) ainda na mesma linha do item anterior, pode-se sugerir que a matriz nanoestruturada ainda contenha tolueno (utilizado para dissolver as esferas de poli(estireno) utilizadas como molde) em seu interior. Apesar de essa substância ser bastante volátil, sua evaporação pode ser dificultada no interior dos poros formados. Assim, a interação das soluções de PDDA e urease com o poli(pirrol) nanoestruturado pode ser prejudicada no interior do poli(pirrol) nanoestruturado pela presença da espécie orgânica;

(c) o tempo em que o eletrodo nanoestruturado permanece imerso nas soluções de PDDA e urease talvez não seja suficientemente longo para favorecer a difusão dessas substâncias até as partes mais internas da rede porosa, causando a adsorção eletrostática apenas na superfície do filme. O mesmo raciocínio pode ser seguido quanto à agitação, que talvez não foi tão vigorosa quanto deveria, dificultando também a difusão.

Neste sentido, foram adotadas medidas para minimizar os problemas encontrados. A primeira delas foi deixar o eletrodo nanoestruturado em dessecador à

vácuo por no mínimo 2 horas após ter sido retirado do tolueno, para eliminação do solvente residual. A outra medida foi aumentar o tempo de imersão nas soluções de PDDA e urease, de 30 minutos para 1 hora, realizando também a agitação dessas soluções de maneira mais vigorosa. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, como mostra a Figura 4.44.



Figura 4.44. Curvas analíticas obtidas a partir de testes de detecção de uréia empregando <u>biossensor nanoestruturado</u> contendo 0,25 C cm⁻² de PPy e (a) 5 e (b) 15 bicamadas de PDDA/urease. Testes amperométricos realizados a 0,35 V, nas condições usuais.

A partir das curvas analíticas apresentadas na Fig. 4.44, calculou-se as sensibilidades de detecção de uréia, e foram obtidos os valores 0,12 e 0,25 μ A cm⁻² mmol⁻¹ L para os biossensores contendo 5 e 15 bicamadas, respectivamente. Os testes amperométricos relativos aos dois biossensores foram realizados a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10) sob agitação, e com sucessivas adições de uréia, cada uma delas aumentando em 40,0 mmol L⁻¹ sua concentração total em solução. A adição de uréia em concentrações relativamente elevadas é necessária, uma vez que a quantidade de poli(pirrol) que se utiliza nesses biossensores nanoestruturados é pequena (0,25 C cm⁻²) comparando-se àqueles apresentados em etapas anteriores, nas quais a imobilização da urease se dava por aprisionamento em acetato de celulose, por ligações cruzadas com glutaraldeído ou por imobilização covalente ao substrato [67]. Nesses casos, utilizava-se 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol). Como esse polímero condutor é o transdutor eletroquímico do biossensor (se reduzindo ao realizar a conversão da amônia, gerada enzimaticamente, a NO), se houver apenas uma pequena quantidade desse polímero presente no eletrodo, maior deverá ser a concentração de analito agregada à solução, para que a corrente gerada seja detectável e com maior relação sinal/ruído. Para comprovar essa teoria, foram realizados testes de detecção amperométrica de uréia com biossensores nanoestruturados em condições idênticas aos da Fig. 4.44, exceto pela adição de quantidades menores de uréia (0,6 - 10 mmol L⁻¹). Foi observado então que não há geração de corrente em magnitudes mensuráveis, maiores que o ruído, impedindo a obtenção de curvas-padrão confiáveis.

Outra observação que pode ser feita acerca da Fig. 4.44 é que o intervalo linear de concentrações vai de 4,4 a 150,0 mmol L^{-1} para o biossensor com 5 bicamadas, e de 3,9 a 100,0 mmol L^{-1} para aquele contendo 15 bicamadas, sendo

que os limites inferiores correspondem ao limite de detecção calculados para os dois biossensores. Para concentrações de uréia acima da faixa linear, observa-se uma gradativa diminuição da corrente gerada. Em princípio, dois motivos podem ser responsáveis por essa perda de atividade do biossensor em concentrações elevadas: um deles é a lixiviação do material depositado sobre o eletrodo após determinado tempo de análise, lembrando-se que apesar de as forças eletrostáticas atrativas que mantém PDDA e urease aderidos ao poli(pirrol) serem relativamente fortes, existe a constante agitação da solução durante os testes amperométricos. O segundo motivo foi sugerido pelo pesquisador Gero Decher, criador da técnica de automontagem camada por camada, durante a apresentação desses resultados no VII Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. Segundo ele, a adição repetitiva de uréia em concentrações elevadas pode ocasionar mudanças estruturais nas bicamadas, alterando, portanto, suas propriedades (compactação, interações intercamadas, etc).

Comparando-se os resultados dos biossensores contendo 5 e 15 camadas de urease, observa-se que ao se aumentar 3 vezes a quantidade de camadas, a sensibilidade de detecção aumenta de 0,12 para 0,25 µA cm⁻² mmol⁻¹ L, cerca de 2 vezes. E ainda, ao se comparar as sensibilidades obtidas com biossensores preparados por imersões de 30 minutos (Figuras 4.42 e 4.43) e de 1 hora (Fig. 4.44) nas soluções de PDDA e urease, conforme sumarizado na Tabela 4.6, chega-se a conclusões interessantes. Tomando-se como exemplo os biossensores contendo 5 bicamadas (o raciocínio para os de 15 bicamadas é idêntico), obtidas com os tempos de imersão de 30 minutos e 1 hora, nota-se que a sensibilidade de detecção aumenta 6 vezes duplicando-se o tempo de imersão. Esse resultado é bastante interessante e indica que apenas dobrar o tempo de deposição das camadas de PDDA e urease é

responsável por um aumento de cerca de 6 vezes na quantidade de urease imobilizada pois provavelmente há um melhor aproveitamento das cavidades do PPy nanoestruturado. Convém ressaltar também que a colocação do eletrodo de PPy nanoestruturado no dessecador à vácuo (para eliminação do tolueno residual) e a melhor agitação das soluções durante a adsorção da enzima e do policátion podem também ter sido responsáveis por parte dessa melhora na sensibilidade.

Tabela 4.6. Comparação dos parâmetros analíticos dos biossensores contendo 5 e 15 bicamadas,preparados por imersão nas soluções de PDDA e urease por 30 minutos ou 1 hora.

	30 minutos		1 hora	
	5 bicamadas	15 bicamadas	5 bicamadas	15 bicamadas
Sensibilidade (μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L)	0,02	0,04	0,12	0,25
Limite da faixa linear de resposta (mmol L ⁻¹)	300	300	150	100

Outro ponto importante, apresentado na Tabela 4.6, é a redução do intervalo linear de concentrações ao se empregar o tempo de imersão de 1 hora. Como esse comportamento torna-se evidente quanto maior o tempo de imersão, e também quanto maior o número de bicamadas, isso indica que a causa da redução da atividade do biossensor relaciona-se com a maior quantidade de material imobilizada. Conforme citado anteriormente, a agitação constante durante os testes amperométricos pode ocasionar o desprendimento de material do biossensor, diminuindo sua resposta após certo tempo de análise, e esta lixiviação seria mais evidente em biossensores contendo maiores quantidades de material, nos quais a adesão de todas as camadas ao eletrodo base seria mais dificultada, explicando o comportamento observado.

Assim, os experimentos apresentados permitem inferir que a técnica de deposição da urease pelo método de automontagem se mostrou bastante versátil,

pois seus parâmetros experimentais podem ser variados de forma a se obter os resultados desejados.

4.4.3. Determinação da Massa de Urease Imobilizada por Bicamada

Uma das questões que surgiram ao se trabalhar com a imobilização da urease através da técnica de automontagem camada por camada foi determinar qual a quantidade de enzima que pode ser eletrostaticamente aderida ao substrato polimérico. Para tanto, empregou-se uma microbalança a cristal de quartzo para monitorar a frequência de oscilação do eletrodo de poli(pirrol) nanoestruturado. A variação da frequência pode ser relacionada à variação de massa depositada no eletrodo através da Equação de Sauerbrey [95]:

$\Delta f = -(6,45x10^7 \text{ cm}^2 \text{ Hz g}^{-1}) \Delta m$

Nesses experimentos, utilizou-se um eletrodo de quartzo piezoativo recoberto com ouro, sobre o qual se depositou o PPy nanoestruturado (0,25 C cm⁻²), da maneira usual. O procedimento de imobilização camada por camada foi realizado, nesse caso, manualmente, visto que a configuração dos contatos elétricos desse eletrodo (ver Figura 4.45) não permite sua imersão em uma solução contida num béquer sem que haja a imersão dos contatos também. Logo, o Robô LBL não poderia ser utilizado. Esse eletrodo possui uma cela de vidro apropriada que permite a adição de soluções (cerca de 2-3 mL) sem molhar os contatos.

Figura 4.45. Ilustração do eletrodo de quartzo piezoelétrico recoberto com ouro com seus contatos elétricos (fios).

Estando então o eletrodo na cela e conectado à microbalança, efetuou-se a adição da solução de PDDA 5,0 mg mL⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10) à cela e iniciou-se o monitoramento da frequência do eletrodo em função do tempo. Após 1 hora, retirou-se a solução da cela, lavou-se o eletrodo com tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10) e em seguida ele foi seco sob fluxo de N₂. Então se adicionou à cela a solução de urease 50,0 mg mL⁻¹ + BSA 25 mg mL⁻¹ em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10), e novamente monitorou-se a frequência do eletrodo por 1 hora. A lavagem e secagem do eletrodo foram realizadas em seguida, e todo o procedimento descrito configura a formação de 1 bicamada. O método foi repetido 3 vezes, e portanto foram obtidas 3 bicamadas sobre o eletrodo de PPy

nanoestruturado.

Sabendo-se então a variação de frequência do eletrodo imediatamente antes da adição da urease, e após o tempo de 1 hora de imobilização (depois da lavagem e secagem), pode-se calcular a massa de urease depositada, segundo a equação de Sauerbrey. A Figura 4.46 apresenta o gráfico de frequência do eletrodo em função do tempo, relativo à segunda camada de urease imobilizada. Através desse gráfico foi possível determinar que se imobilizam 740,6 µg cm⁻² de urease por bicamada. Considerando-se o eletrodo utilizado nos testes amperométricos, que apresenta área de 0,02 cm², pode-se inferir que a massa de urease imobilizada por bicamada nesse eletrodo é 14,8 µg. Na Fig. 4.46 é possível notar também que a deposição é praticamente linear durante a 1 hora de imersão.



Figura 4.46. Frequência do eletrodo versus tempo, para a segunda camada de urease imobilizada.

A Figura 4.47 apresenta uma micrografia do eletrodo nanoestruturado após a deposição das 3 bicamadas. Observa-se que os poros encontram-se regularmente distribuídos, mostrando a eficácia do processo de nanoestruturação com molde de esferas de poli(estireno). Nota-se também nessa imagem a presença de materiais dispersos pelas cavidades, correspondendo aos aglomerados PDDA/urease, formados durante a deposição camada por camada.



Figura 4.47. Imagem MEV do eletrodo nanoestruturado após imobilização das 3 bicamadas de PDDA/urease.

4.5. Detecção Amperométrica de Amônia pelo Poli(pirrol) Macroporoso

O poli(pirrol) nanoestruturado pode ser empregado em diferentes aplicações. Uma delas é sua utilização como transdutor e plataforma de imobilização da enzima no biossensor de uréia, conforme foi apresentado nos itens anteriores. Outra aplicação, diretamente relacionada à anterior, é o emprego dessa matriz polimérica nanoestruturada como sensor de amônia, que é o precursor do biossensor de uréia [67], uma vez que a detecção desse analito ocorre de forma indireta, via amônia (espécie eletroquimicamente ativa), conforme mostra a Figura 4.48.



Figura 4.48. Esquema de funcionamento do biossensor de uréia, cuja detecção é indireta, via amônia.

O perfil de um teste de detecção amperométrica de amônia pelo poli(pirrol) nanoestruturado (0,30 C cm⁻²), e a respectiva curva analítica são mostrados na Figura 4.49. Cada degrau de corrente observado na amperometria corresponde à adição de íons amônio em solução (tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0), aumentando a concentração total em 20 μ mol L⁻¹. Este eletrodo apresentou uma sensibilidade de detecção de amônia bastante elevada (93,3 μ A cm⁻² mmol⁻¹ L), considerando a pouca quantidade de poli(pirrol) depositada, e a resposta é linear até 120 μ mol L⁻¹, o que é bastante promissor considerando-se a faixa típica de concentração presente em amostras clínicas (18-72 μ mol L⁻¹).



Figura 4.49. (a) Detecção amperométrica de amônia pelo PPy nanoestruturado (0,30 C cm⁻²). E = 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação. Adições periódicas de solução de NH₄Cl aumentam a concentração total em 20 μmol L⁻¹. (b) Curva analítica correspondente ao teste (a).

Mas o aspecto mais interessante dos sensores de amônia nanoestruturados pode ser melhor visualizado ao se realizar um estudo comparativo dos desempenhos desses sensores com os dos sensores maciços, sintetizados de maneira similar, sendo a utilização do molde de esferas de poli(estireno) a única diferença entre eles. Vários sensores de amônia maciços e nanoestruturados foram preparados, variando a carga de poli(pirrol) eletrodepositada entre 0,10-0,50 C cm⁻². A Tabela 4.7 sumariza a comparação entre esses sensores em termos da sensibilidade de detecção de amônia, que foram calculadas a partir de testes amperométricos realizados nas mesmas condições daquele apresentado na Figura 4.49.

Densidade de carga de PPv	Sensibilidade (μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L)		Observações	
(C cm ⁻²)	Maciço	Nano		
0,10	0	-	sensores maciços não detectam NH ₃ ; os nano detectam, mas saturação ocorre em baixas concentrações	
0,15	0	-		
0,20	-	70,0	sensores maciços: sem resposta significativa sensores nano: altas sensibilidades	
0,30	-	93,3		
0,50	85,5	84,0	bloqueio das nanoestruturas	

 Tabela 4.7. Sensibilidade de detecção de amônia dos sensores maciços e nanoestruturados em função da carga de PPy [39].

Os dados apresentados na Tabela 4.7 permitem inferir que sensores maciços formados por até 0,15 C cm⁻² de poli(pirrol) não detectam amônia, visto que a quantidade de transdutor presente é ínfima. Por outro lado, os sensores nanoestruturados correspondentes apresentaram respostas amperométricas, mas a saturação ocorreu em concentrações tão baixas quanto 40 μmol L⁻¹.

De 0,20 a 0,30 C cm⁻² de poli(pirrol), os sensores maciços apresentaram aumento mínimo de corrente ao adicionar-se a amônia, enquanto as sensibilidades obtidas com os análogos nanoestruturados foram bastante altas, 70,0 e 93,3 μA cm⁻² mmol⁻¹ L, respectivamente. Esses resultados mostram as vantagens de se nanoestruturar o transdutor polimérico: menores quantidades de polímero são necessárias para detectar amônia de modo mais sensível e rápido. Esta melhora em relação aos sensores maciços pode ser atribuída à maior área ativa disponível, conforme mostrado na micrografia da Fig. 4.30, e também (e talvez principalmente) à maior facilidade de difusão do analito (amônia) por toda a extensão do transdutor, através dos poros interconectados do material nanostruturado. Para corroborar essa hipótese, alguns cálculos simples, baseados em geometria (utilizando-se a área do eletrodo, diâmetro e área das esferas de polí(estireno), etc) foram efetuados,
considerando-se apenas a camada mais externa do PPy nanoestruturado (assumindo que a altura dessa camada corresponde à meia esfera de PS). Assim, foi possível estimar que a área superficial dessa camada de PPy nanoestruturado é somente cerca de 2 vezes maior do que a de um filme maciço liso. Desta forma, mostra-se que o aumento de sensibilidade dos sensores nanoestruturados em relação aos análogos maciços realmente é uma consequência não somente da maior área superficial, mas também do acesso facilitado do analito às partes mais internas no transdutor nanoestruturado.

Entretanto, quando 0,50 C cm⁻² de poli(pirrol) foram eletrodepositados nos sensores maciços e nanoestruturados, observa-se que as sensibilidades obtidas encontram-se na mesma ordem de magnitude (85,5 e 84,0 μA cm⁻² mmol⁻¹ L, respectivamente). Este resultado indica que nesta condição, o polímero cresceu sobre o molde, cobrindo-o, conforme esquematizado na Figura 4.50. Neste caso, o perfil nanoestruturado é perdido, e o resultado final é um filme maciço, explicando as sensibilidades obtidas.



Figura 4.50. Esquema de crescimento do PPy sobre o molde de esferas de poli(estireno) (PS) [39].

Apesar de terem sido observados efeitos sinérgicos desses filmes macroporosos frente à detecção de amônia [39], a imobilização da enzima urease nessas mesmas matrizes não resultou em sensibilidades de detecção de uréia muito maiores do que as obtidas por um biossensor maciço análogo (ver item 4.4.2). Apesar do tamanho dos poros (cerca de 460 nm) ser suficientemente grande para acomodar várias unidades de enzima, o grande problema que se instaura é a baixa permeabilidade das mesmas por toda a extensão do filme nanoestruturado. Isso ocorre devido ao fato de existir ar dentro das cavidades, tornando essas superfícies ligeiramente hidrofóbicas. Além disso, identifica-se também um efeito de capilaridade, devido ao reduzido tamanho dos poros, prevenindo igualmente a enzima e o eletrólito de penetrar por todo o filme macroporoso.

Em adição ao problema de molhabilidade dos filmes nanoestruturados sintetizados, outro aspecto em relação às nanoestruturas do tipo porosas (de morfologia côncava) deriva de uma propriedade termodinâmica intrínseca desses materiais. Segundo a teoria de Young-Laplace, um átomo presente em uma superfície côncava apresenta potencial químico (µ) menor do que aquele sobre uma superfície convexa e, portanto, possui uma tendência menor a reagir [97]. Portanto, ao se empregar esse tipo de superfície, por exemplo, na detecção de uréia, não se deve esperar um aumento muito grande da sensibilidade, uma vez que o efeito do aumento de área não é o único fator a ser considerado. A ilustração de uma superfície côncava (como os filmes macroporosos) e uma convexa (como nanopartículas ou nanofios) é mostrada na Figura 4.51.



Figura 4.51. Ilustração de uma partícula sobre uma superfície côncava e sobre uma convexa.

4.6. Detecção Amperométrica de Amônia por Nanofios de Poli(pirrol)

Visto que entre os objetivos desta tese encontra-se o desenvolvimento de métodos de nanoestruturação da plataforma polimérica com o objetivo final de se detectar amônia e uréia, e dadas as propriedades de baixa molhabilidade e as características termodinâmicas intrínsecas de superfícies porosas [97] discutidas no item anterior, optou-se por desenvolver nanoestruturas de concavidade oposta à dos nanoporos. A estratégia escolhida foi a síntese eletroquímica de nanofios de poli(pirrol), sem a utilização de moldes. Primeiramente foi testada a eletrodeposição por voltametria de pulso normal (VPN) [42], e em seguida por amperometria. A principal vantagem de se utilizar estes métodos é que nestes casos a nanoestruturação prescinde de moldes, visto que o mecanismo de formação dos fios baseia-se apenas na composição da solução e no programa de potenciais aplicado ao eletrodo. A seguir serão discutidos os mecanismos de formação e os resultados obtidos com ambos os tipos de eletrodeposição direta.

4.6.1. Nanofios Sintetizados por Voltametria de Pulso Normal

Uma das metodologias eletroquímicas de formação de nanofios de poli(pirrol) sem a necessidade de utilização de moldes consiste na eletrodeposição do pirrol por voltametria de pulso normal (VPN) [42]. Este tipo de voltametria apresenta uma programação peculiar de variação do potencial em função do tempo, conforme ilustrado na Figura 3.9 da seção experimental, sendo os potenciais inicial e base iguais a 0,0 V, e o potencial final 0,8 V. A eletrodeposição ocorre a partir de uma solução de pirrol 0,1 mol L⁻¹ e LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹, preparada em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0).

Realizou-se a síntese dos nanofios variando-se o número de ciclos de VPN entre 5 e 70. A Figura 4.52 apresenta as imagens MEV dos filmes depositados sobre eletrodos de ouro. Essas micrografias revelam o aumento do recobrimento e do comprimento dos nanofios conforme aumenta o número de ciclos de VPN empregado na síntese. Utilizando-se de 5 a 10 ciclos, pouco polímero é depositado sobre o substrato, sendo possível visualizar a fase inicial de crescimento dos fios. De 30 a 70 ciclos observa-se melhor o aumento do comprimento dos fios, partindo de aproximadamente 500 nm, no primeiro caso, até cerca de 800 nm no último (a determinação exata do comprimento é dificultada pelo grande enovelamento dos fios).

Conforme já foi extensivamente discutido nesta tese, a sensibilidade de detecção de amônia está diretamente relacionada à quantidade de poli(pirrol) presente no eletrodo, já que este polímero condutor age como transdutor eletroquímico no sensor. Desta forma, a possibilidade de se modular a quantidade de poli(pirrol) no eletrodo através do número de ciclos de VPN empregado durante a síntese é interessante neste trabalho, pois além de ser uma metodologia prática, mostrou-se uma alternativa eficiente de preparação de nanofios de maneira reprodutível.



Figura 4.52. Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de poli(pirrol) preparados variando-se o número de ciclos de VPN. (a) 5, (b) 10, (c) 30, (d) 50, (e) 70 ciclos.

Os testes de detecção de amônia realizados com os eletrodos preparados a partir de diferentes ciclos de VPN (filmes mostrados na Fig. 4.52) confirmam a tendência de aumento da sensibilidade em função do aumento da quantidade de poli(pirrol) eletrodepositada. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 4.8.

A resposta amperométrica desses eletrodos é satisfatória, sendo inclusive linear em uma faixa ampla de concentração, conforme mostra a Figura 4.53, relativa à detecção com o eletrodo preparado por 30 ciclos de VPN.

Sensibilidade Número de ciclos de VPN $(\mu A \text{ cm}^{-2} \text{ mmol}^{-1} \text{ L})$ 5 _ 10 _ 30 1.55 50 4,00



Tabela 4.8. Sensibilidade de detecção de amônia dos diferentes eletrodos contendo nanofios de poli(pirrol) dopado com perclorato.



Figura 4.53. (a) Detecção amperométrica de amônia por eletrodo contendo nanofios de PPy/CIO4, preparado pela técnica de VPN (30 ciclos). E= 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Adições de alíquotas de solução de NH4CI, cada uma aumentando a concentração total na solução em 120 µmol L⁻¹. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).

Entretanto, ao se comparar os desempenhos de eletrodos contendo os nanofios com os de análogos maciços, percebe-se que as sensibilidades de detecção de amônia dos maciços é cerca de 4 a 7 vezes maior, conforme mostra a Tabela 4.9 (a comparação é feita com os dados da Tabela 4.8).

Os eletrodos contendo poli(pirrol) maciço foram preparados similarmente aos contendo nanofios, exceto que a solução de monômero (Py 0,1 mol L^{-1} + LiClO₄ 0,1 mol L^{-1}) foi preparada em água, ao invés de em tampão fosfato. A eletrodeposição foi realizada igualmente por VPN.

Número de ciclos de VPN	<mark>Sensibilidade</mark> (μA cm ⁻² mmol ⁻¹ L)
10	-
30	11,19
50	15,68

 Tabela 4.9.
 Sensibilidade de detecção de amônia dos diferentes eletrodos contendo poli(pirrol) maciço dopado com perclorato.

A Figura 4.54 apresenta o teste de detecção de amônia, realizado nas condições usuais, empregando-se como sensor o eletrodo maciço de poli(pirrol) dopado com perclorato, preparado a partir de 30 ciclos de VPN, e o item (b) desta mesma figura corresponde à respectiva curva analítica. Comparando-se esse resultado com o apresentado na Fig. 4.53, nota-se que a detecção com o sensor maciço fornece patamares de corrente mais estáveis, e a resposta amperométrica pode ser obtida com baixas concentrações de NH₄CI (3,0 μ mol L⁻¹), enquanto que com o eletrodo análogo contendo nanofios, a detecção só ocorre a partir da adição de 120,0 μ mol L⁻¹ de analito.



Figura 4.54. (a) Detecção amperométrica de amônia por eletrodo PPy/ClO₄⁻ maciço, preparado pela técnica de VPN (30 ciclos). E= 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0. Adições de alíquotas de solução de NH₄Cl, cada uma aumentando a concentração total na solução em 6, 20 ou 120 μmol L⁻¹. (b) Curva analítica correspondente ao teste do item (a).

Os filmes contendo nanofios de poli(pirrol) dopado com perclorato, preparados a partir da técnica de voltametria de pulso normal, não foram mais eficientes do que seus análogos maciços na detecção amperométrica de amônia. No item a seguir, serão apresentados resultados concernentes à eletrodeposição dos nanofios por amperometria, para avaliar o efeito da técnica de deposição na eletroatividade dos filmes obtidos.

4.6.2. Nanofios Sintetizados por Amperometria

Com exceção à síntese de nanofios de poli(pirrol) por voltametria de pulso normal, a técnica eletroquímica majoritariamente utilizada para a polimerização do pirrol (maciço ou macroporoso) neste trabalho foi a amperometria. A amperometria apresenta como principal vantagem a determinação direta da carga de polímero eletrodepositada (através da área da curva i vs. t), e possibilita então que diferentes eletrodos sejam comparados diretamente em função da quantidade de poli(pirrol) presente no sensor. Desta forma, decidiu-se verificar se a amperometria ocasiona também a formação dos nanofios, conforme observado com a voltametria de pulso normal.

A eletrodeposição sobre eletrodo de ouro ocorreu a partir de solução de pirrol 0,1 mol L⁻¹ e LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹, preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Aplicou-se 0,7 V ao eletrodo de trabalho, e a carga de poli(pirrol) depositada foi controlada através da duração da amperometria. A Figura 4.55 apresenta as micrografias eletrônicas de varredura de eletrodos contendo de 0,05 a 0,50 C cm⁻² de poli(pirrol).



Figura 4.55. Micrografias eletrônicas de varredura de filmes de poli(pirrol) preparados por amperometria, variando-se a duração da deposição até atingir a carga desejada: (a) 0,05, (b) 0,15, (c) 0,25 e (d) 0,50 C cm⁻².

Observa-se nas micrografias da Fig. 4.55 que os filmes formados por densidades de carga de poli(pirrol) entre 0,05 e 0,25 C cm⁻² apresentam tendência de aumento do recobrimento dos nanofios sobre o substrato, bem como de aumento no comprimento dos nanofios formados. A partir de 0,25 C cm⁻² de poli(pirrol), aparentemente o recobrimento da superfície é total, e apenas o comprimento dos nanofios (e consequentemente seu enovelamento) aumenta ligeiramente.

Ao realizar testes de detecção de amônia com os eletrodos cujas morfologias foram mostradas na Fig. 4.55, verificou-se novamente o aumento da sensibilidade de detecção conforme se aumenta a carga de poli(pirrol) no sensor. A Figura 4.56 apresenta a curva analítica construída a partir do amperograma de detecção de amônia a 0,35 V (condições usuais) pelo sensor contendo 0,50 C cm⁻² de nanofios de poli(pirrol) (filme (d) da Fig. 4.55). Para fins de comparação, a Figura 4.57 traz uma curva analítica análoga, relativa a teste de detecção empregando-se um eletrodo contendo também 0,50 C cm⁻² de poli(pirrol), mas neste caso um filme maciço. Para a síntese do filme maciço, a polimerização é feita a partir de uma solução aquosa de pirrol 0,1 mol L⁻¹ e LiClO₄ 0,1 mol L⁻¹ apenas, sem tampão fosfato.



Figura 4.56. Curva analítica correspondente à detecção amperométrica de amônia por eletrodo contendo 0,50 C cm⁻² de nanofios de PPy/CIO₄⁻. Detecção realizada a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação, com adições de alíquotas de solução de NH₄CI.



Figura 4.57. Curva analítica correspondente à detecção amperométrica de amônia por eletrodo contendo 0,50 C cm⁻² de PPy/CIO₄⁻ maciço. Detecção realizada a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação, com adições de alíquotas de solução de NH₄CI.

Comparando-se as Figs. 4.56 e 4.57, observa-se que o filme apresentando nanofios de poli(pirrol) obtidos por amperometria também não é mais eletroativo frente à detecção de amônia do que seu análogo maciço. A sensibilidade de detecção do sensor maciço é cerca de 90 vezes maior do que o nanoestruturado. Provavelmente, esse efeito seja devido ao caráter mais hidrofóbico do filme contendo nanofios de poli(pirrol).

Foi reportado em literatura que o ângulo de contato de água sobre filmes de poli(anilina) obtidos quimicamente na forma de fios (sobre molde orgânico) são da ordem de 104°, enquanto que para filmes obtidos similarmente, mas cuja morfologia é granular (nanopartículas agregadas) o ângulo de contato diminui para 60°, devido à variação da microestrutura superficial [98]. Esse resultado mostra o aumento da hidrofobicidade do filme nanoestruturado em relação ao maciço, e outros estudos descrevem o mesmo comportamento [99-101]. Assim, o efeito relatado em literatura pode ser estendido para explicar os resultados experimentais obtidos nesta tese. A maior hidrofobicidade dos filmes contendo nanofios de poli(pirrol) previne a percolação da solução contendo o analito por toda a extensão do filme, reduzindo a potencial utilização da maior área superficial desses filmes, em relação aos análogos maciços. Existem outros parâmetros que influenciam a molhabilidade de filmes de polímeros condutores, conforme resumido na Tabela 4.10, os quais podem corroborar as conclusões obtidas. Entre eles pode-se ressaltar a natureza do íon dopante e do substrato condutor sobre o qual o polímero é depositado [102,103], e principalmente o potencial ao qual o polímero é submetido [104].

Substrato	Solvente	Ângulo de Contato (°)	Observações	Referência
PAni/Cl ⁻ granular		60	aumento da rugosidade aumenta a hidrofobicidade	[98]
PAni/Cl ⁻ nanofios	H ₂ U	104		
PPy/PFOS ⁻ * maciço	ЦО	105		[99]
PPy/PFOS ⁻ * granular	H ₂ U	152		
CF/PPy/NO3 ⁻		83	verificação do efeito do substrato condutor (CF= folha de carbono) e do íon dopante	[102]
CF/PPy/Dodecilsulfonato	H ₂ O	42		
PPy/Cl ⁻		52,8		
PPy/Dodecilsulfonato	H ₂ O	69,1	efeito do íon dopante	[103]
PPy/Tosilato		80,0		
PPy/DBS⁻ a -0,6 V		75	aumento linear do	
PPy/DBS ⁻ a 0,0 V	DBS ⁻ 0,1 mol L ⁻¹	92	ângulo de contato em 3,0-3,5º a cada	[104]
PPy/DBS ⁻ a +0,6 V		111	100 mV	

	^						
Talada 440	A			films	a allor ful a a a		I't t
1 2 noi2 /1 111		CONTRAC 00	a ditorontoe	TIIMDC	nolimoricoe	adecritae i	en literati ra
	ALIGUIO GE	Contato ut		1111103			enn meratura.

*PFOS = Perfluoroctanosulfonato

Outra questão interessante, que se apresenta ao comparar as atividades dos filmes contendo nanofios de poli(pirrol) preparados por voltametria de pulso normal ou amperometria, é ilustrada na Figura 4.58. Nesta figura, verifica-se que a carga de poli(pirrol) presente no eletrodo preparado por amperometria é muito maior do que a eletrodepositada por voltametria de pulso normal, dada a maior área do voltamograma do primeiro eletrodo. Seria coerente esperar então que a sensibilidade de detecção de amônia do eletrodo preparado por amperometria fosse maior do que a do obtido por voltametria de pulso normal. Entretanto, não foi isso que se observou. Conforme se depreende das Figs. 4.53 (deposição por VPN; 30 ciclos) e 4.56 (deposição por amperometria; 0,5 C cm⁻²), a sensibilidade do sensor preparado por VPN é cerca de 13 vezes maior (1,55 versus 0,12 μA cm⁻² mmol⁻¹ L).



Figura 4.58. Voltamogramas cíclicos de eletrodos contendo nanofios de PPy/ClO₄⁻ preparados por (----) voltametria de pulso normal (30 ciclos) e (----) amperometria (0,05 C cm⁻² de PPy). Experimentos feitos em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH 10,0), a 50 mV s⁻¹.

Esse resultado aparentemente inusitado indica claramente que, neste caso, a molhabilidade dos filmes de nanofios de poli(pirrol) tem mais influência sobre a sensibilidade de detecção do que a carga de poli(pirrol) presente no sensor. Ao se comparar a morfologia dos filmes em questão (Fig 4.52 (c) e 4.55 (d)), verifica-se que os nanofios formados por amperometria encontram-se bem mais enovelados do que os obtidos por 30 ciclos de VPN, bem como o comprimento dos fios é maior no primeiro caso. É possível que essas características tornem o substrato mais hidrofóbico, uma vez que ar fica aprisionado nesses filmes de morfologia esponjosa.

Outro ponto relevante na discussão acerca dos filmes contendo nanofios é a baixa sensibilidade dessas plataformas frente à detecção de amônia, em comparação aos sensores maciços e macroporosos descritos anteriormente nesta tese. Na Fig. 4.56, por exemplo, a sensibilidade obtida com o eletrodo contendo 0,50 C cm⁻² de nanofios de poli(pirrol) é apenas 0,12 μA cm⁻² mmol⁻¹ L, o que leva a uma

questão importante que deve ser discutida neste momento: a natureza do íon dopante do poli(pirrol).

4.6.3. A Questão do Íon Dopante

A síntese dos nanofios de poli(pirrol) foi efetuada utilizando-se o perclorato (CIO₄⁻) como íon dopante, tanto na deposição por VPN quanto por amperometria, diferentemente de todos os outros (bio)sensores (maciços ou macroporosos) apresentados nesta tese, os quais continham poli(pirrol) dopado com íons dodecilbenzenosulfonato (DBS⁻). A estrutura química do DBS⁻ é mostrada na Figura 4.59.



Figura 4.59. Estrutura química do dodecilbenzenosulfonato de sódio.

Porém, experimentos revelaram que filmes de poli(pirrol) dopado com $CIO_4^$ são muito menos responsivos à amônia do que filmes análogos contendo o DBS⁻ como dopante, conforme mostra a Figura 4.60. Esta figura apresenta a sensibilidade de detecção de amônia e o limite superior da faixa linear de resposta de dois sensores contendo a mesma densidade de carga de poli(pirrol), sendo a única diferença entre eles a natureza do dopante (CIO_4^- ou DBS⁻). Para tanto, os filmes de poli(pirrol) foram preparados potenciostaticamente (0,7 V) a partir de soluções 50,0 mmol L⁻¹ de monômero pirrol e 25,0 mmol L⁻¹ de dopante.



Figura 4.60. (a) Sensibilidade de detecção de amônia e (b) e limite superior da faixa linear de resposta de sensores de poli(pirrol) maciço dopado com DBS⁻ ou ClO₄⁻, conforme indicado.

A menor eletroatividade do poli(pirrol) dopado com ClO₄⁻ deve estar associada ao processo de compensação de cargas envolvido nas reações redox do polímero condutor. Conforme bastante discutido em literatura, dependendo da natureza do íon dopante do polímero, os mecanismos de transporte iônico são distintos e influenciam a eletroatividade do material [25-27,105-107]. Quando a polimerização é feita em presença de íons inorgânicos de baixa massa molecular, como perclorato ou cloreto, por exemplo, o mecanismo de transporte que ocorre durante o processo redox envolve o movimento de ânions, tanto saindo como entrando na cadeia polimérica, para que se mantenha o balanço de cargas. Entretanto, ao se utilizar ânions de elevada massa molecular e anfifílicos como dopantes, sendo exemplos dessa classe de compostos o dodecilsulfato de sódio ou o dodecilbenzenosulfonato de sódio, o processo de compensação de cargas é diferente. Neste caso, tais ânions não possuem mobilidade suficiente para sair e entrar na cadeia polimérica, e desta forma o balanço de cargas passa a ser feito pelo movimento de cátions presentes no eletrólito. Assim, as diferenças nos mecanismos de transporte iônico envolvidos nos processos redox do poli(pirrol) dopado com ânions como o CIO_4^- ou o DBS⁻ provoca variações em sua eletroatividade [107], conforme descrito em literatura e observado experimentalmente. A Figura 4.61 (bem como a Fig. 4.60) confirma a menor eletroatividade do PPy/CIO₄⁻ frente ao PPy/DBS⁻, dada a menor corrente gerada por um processo redox do PPy/CIO₄⁻ em dado potencial. Essa figura mostra voltamogramas cíclicos em meio básico (pH 10,0) de eletrodos de poli(pirrol) contendo a mesma carga de polímero maciço eletrodepositado, sendo a única diferença entre eles o dopante empregado (DBS⁻ ou CIO₄⁻).



Figura 4.61. Voltamogramas cíclicos de eletrodos contendo 0,5 C cm⁻² de PPy dopado com DBS⁻ ou ClO_4^- , conforme indicado. v = 50 mV s⁻¹, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0.

Então, verificada a menor eletroatividade do poli(pirrol) dopado com CIO_4^- , estudou-se o efeito da troca desse dopante sobre a deposição dos nanofios. Duas estratégias foram adotadas: a primeira consistiu em adicionar o DBS⁻ durante a síntese dos nanofios (substituindo-se totalmente ou parcialmente o CIO_4^- na solução contendo o monômero), e a outra opção foi a tentativa de troca do CIO_4^- pelo DBS⁻ após a síntese convencional. Neste caso, realizou-se 100 ciclos de voltametria a 50 mV s⁻¹, em solução concentrada de DBS⁻ (0,1 mol L⁻¹), utilizando-se um eletrodo contendo os nanofios de poli(pirrol) dopado com CIO_4^- , preparado previamente.

A primeira estratégia adotada se mostrou ineficaz, uma vez que a observação dos eletrodos no microscópio eletrônico de varredura mostrou que a morfologia obtida era similar a de filmes maciços, sem sinais de formação de nanofios.

A segunda estratégia de troca do dopante também não foi bem sucedida, já que a análise eletroquímica e por espectroscopia na região do infravermelho dos eletrodos obtidos após ciclagem de potencial em solução de DBS⁻ não permitiu concluir que a troca do dopante foi realizada.

O fato de a troca do dopante CIO₄⁻ pelo DBS⁻ ter comprometido a formação dos nanofios de poli(pirrol) pode ser explicada através do mecanismo proposto em literatura [43] para o crescimento dessas nanoestruturas. Segundo a autora, a eletrodeposição do pirrol deve ser realizada em soluções contendo ânions nãoácidos (CIO₄⁻) e ácido-fracos (HPO₄²⁻), sendo este último essencial, visto que sua presença leva à formação de uma fina camada de poli(pirrol) superoxidado, que envolve a base dos nanofios. Na realidade, durante a oxidação do monômero pirrol, prótons são liberados, e os ânions ácido-fracos os capturam, até que em dado momento não há mais ânions disponíveis na interface, e desta forma a oxidação do pirrol pára. Como um potencial elevado é aplicado ao eletrodo (0,7-0,8 V), ocorre a oxidação da água, gerando radicais hidroxil que reagem com a camada de poli(pirrol) já formada, causando sua superoxidação e consequente desdopagem, liberando ânions.

Os radicais hidroxil formados também podem reagir entre si, formando H₂O₂, o qual é então oxidado a O₂. As "nanobolhas" de O₂ geradas protegem o poli(pirrol)

da superoxidação, e nesses locais a corrente pode continuar a fluir, dando continuidade à polimerização do pirrol.

As reações citadas e um esquema ilustrativo simplificado do crescimento do filme são apresentados na Figura 4.62.



Figura 4.62. Esquema ilustrativo (fora de escala) do crescimento dos nanofios de PPy e das reações envolvidas, de acordo com o mecanismo proposto na referência 43.

À primeira vista, a simples troca do ânion CIO_4^- pelo DBS⁻ na síntese não ocasionaria grandes mudanças no mecanismo de formação dos nanofios, uma vez que o principal agente do mecanismo é o $HPO_4^{2^-}$. Entretanto, ao se realizar essa mudança, troca-se um composto não-ácido (LiClO₄) por outro de caráter ácido (DBSA, pKa ~ -2,5), e certamente essa mudança de acidez dos componentes presentes na síntese afeta diretamente o mecanismo, iniciado pela liberação de íons H⁺ durante a oxidação do monômero pirrol.

4.7. Detecção de Uréia por Biossensor Contendo Nanofios de Poli(pirrol)

Apesar de terem sido obtidas baixas sensibilidades de detecção de amônia com os filmes contendo nanofios de poli(pirrol) dopado com perclorato, é possível utilizar esses eletrodos como plataformas para imobilização da enzima urease com a consequente obtenção do biossensor de uréia. O método escolhido para imobilização da urease sobre os nanofios foi a deposição camada por camada (10 bicamadas), já descrita anteriormente neste trabalho. A Figura 4.63 mostra a curva analítica obtida a partir de amperograma de detecção de uréia, realizado nas condições usuais.

O resultado apresentado na Fig. 4.63 mostra que é possível realizar a detecção amperométrica de uréia tendo-se como eletrodo base os nanofios de poli(pirrol) dopado com perclorato, após imobilização da enzima urease. Conforme esperado, a sensibilidade obtida com esse biossensor é bastante baixa (2,0 nA cm⁻² mmol⁻¹ L), mas como já foi apresentado anteriormente, o valor de sensibilidade pode ser ajustado de acordo com o número de bicamadas de enzima. A faixa linear de resposta do biossensor é ampla e o resultado é reprodutível, mostrando outra nova potencial aplicação para os eletrodos contendo nanofios.



Figura 4.63. Curva analítica correspondente à detecção amperométrica de uréia por eletrodo contendo 0,50 C cm⁻² de nanofios de PPy/CIO₄⁻, e urease imobilizada pela técnica LbL (10 bicamadas). Detecção realizada a 0,35 V, em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ e pH 10,0, sob agitação, com adições de alíquotas de solução de uréia.

5. CONCLUSÕES

Apresentou-se e discutiu-se nesta tese resultados concernentes ao desenvolvimento, otimização e compreensão de sensores e biossensores para detecção amperométrica de amônia e uréia, respectivamente. Duas abordagens foram dadas aos estudos: o emprego de matrizes de poli(pirrol) convencional (maciço) e também nanoestruturado (macroporoso ou nanofios) para detecção dos analitos de interesse, com o intuito de comparar os desempenhos dessas plataformas de detecção e analisar a problemática envolvida. Embora não se tenha obtido sensibilidades de detecção de uréia muito elevadas com as plataformas nanoestruturadas, a síntese das diferentes nanoestruturas de poli(pirrol) foi sistematizada com sucesso, e pode ser empregada em outras aplicações [108]. Foram obtidos resultados inéditos nesta tese, e se acredita que tenham contribuído para o avanço das pesquisas na área.

As conclusões específicas encontram-se a seguir, divididas de acordo com os temas abordados na seção de resultados de discussão.

(a) Detecção de Amônia por Poli(pirrol) Maciço

A detecção de amônia foi otimizada em termos da densidade de carga de poli(pirrol) presente no sensor e do potencial de operação do mesmo. Maiores sensibilidades foram obtidas com 2,5 C cm⁻² de poli(pirrol), e com o sensor operando a 0,35 V.

Verificou-se a utilização do poli(5-amino-1-naftol) como uma eficiente barreira redutora de sinal amperométrico gerado pelos interferentes ácido úrico e ácido ascórbico, e atribuiu-se o mecanismo à repulsão eletrostática entre o poli(5-amino-1-naftol) e os interferentes, negativamente carregados no pH utilizado (10,0).

(b) Detecção de Uréia por Biossensores baseados em Poli(pirrol) Maciço

Estudou-se a influência do método de imobilização da enzima urease sobre a matriz polimérica, e verificou-se que biossensores de melhor desempenho e durabilidade são obtidos com a formação de ligações covalentes entre a enzima e o poli(5-amino-1-naftol), visto que, dentre os métodos estudados, este tipo de imobilização impede a lixiviação da enzima, e provavelmente expõe melhor o sítio ativo ao ambiente contendo o analito.

Realizou-se também a otimização da quantidade de poli(5-amino-1-naftol) presente no biossensor. Observou-se que há pouca influência deste parâmetro na sensibilidade de detecção, visto que a massa de enzima imobilizada não deve variar. Adicionalmente, observou-se que as condições experimentais utilizadas (pH 10,0 e meio aquoso) não são favoráveis ao poli(5-amino-1-naftol), que apresenta boa condutividade apenas em pHs ácidos e meios orgânicos.

(c) Detecção de Uréia por Biossensores baseados em Poli(pirrol) Macroporoso

Introduziu-se o desenvolvimento de matrizes macroporosas de poli(pirrol) e sua utilização como base para os biossensores de uréia com o intuito de aumentar a área eletroativa disponível para imobilização de enzima e para a transdução do sinal, em relação à filmes análogos maciços.

Observou-se que a polimerização do poli(5-amino-1-naftol) sobre o poli(pirrol) macroporoso ocasiona o recobrimento e perda do perfil nanoestruturado do filme. Desta forma, foi iniciado o estudo de outro método de deposição da urease, mais apropriado para as matrizes nanoestruturadas: a imobilização eletrostática camada por camada. Observou-se que há influência do tempo de imersão do eletrodo nas soluções contendo o eletrólito positivo (PDDA) e negativo (urease) sobre o

desempenho do biossensor. Maiores sensibilidades foram obtidas com 1 hora de imersão, e com biossensores contendo 15 bicamadas de urease.

(d) Detecção de Amônia por Poli(pirrol) Macroporoso

Além da utilização das plataformas macroporosas de poli(pirrol) como base para biossensores de uréia, pode-se empregá-las também na detecção de amônia. Foi observado que as sensibilidades de sensores macroporosos frente à amônia são maiores do que as de sensores análogos maciços, apresentando a mesma densidade de carga de poli(pirrol). Atribuiu-se os melhores desempenhos à maior facilidade de difusão do analito por toda a extensão da matriz polimérica (cujos poros são interconectados), bem como à maior área superficial dos sensores nanoestruturados.

(e) Detecção de Amônia por Nanofios de Poli(pirrol)

Como alternativa à nanoestruturação utilizando-se moldes, como no caso da preparação do poli(pirrol) macroporoso, estudou-se a eletrodeposição direta de nanofios de poli(pirrol), empregando técnicas eletroquímicas como voltametria de pulso normal e amperometria. Verificou-se que os filmes contendo nanofios de poli(pirrol) podem ser empregados na detecção de amônia, mesmo o polímero estando dopado com o íon perclorato, o que diminui a eletroatividade do mesmo (em relação ao poli(pirrol) dopado com dodecilbenzenosulfonato). É necessário enfatizar que a baixa eletroatividade do poli(pirrol) dopado com perclorato limita a sensibilidade de detecção de amônia, e assim o efeito da geometria do substrato (nanofios vs. macroporos) não pôde ser avaliado.

Experimentos adicionais revelaram a potencial aplicação dos nanofios de poli(pirrol) na detecção de uréia, após imobilização da urease pelo método de automontagem camada por camada.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rajesh; Bisht, V.; Takashima, w.; Kaneto, K. Biomaterials 26 (2005) 3683.
- [2] Sahney, R.; Anand, S.; Puri, B. K.; Srivastava, A. K. Anal. Chim. Acta 578 (2006)156.
- [3] Kuralay, F.; Ozyoruk, H.; Yildiz, A. Sensor. Actuat. B-Chem. 114 (2006) 500-506.
- [4] Ciurli, S.; Benini, S.; Rypniewski, W. R.; Wilson, K. S.; Miletti, S.; Mangani, S. *Coordin. Chem. Rev.* 190-192 (1999) 331.
- [5] Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. R.; Heeger, A. J. *Chem Comm.* (1978) 578.
- [6] Mohammadi, A.; Inganas, O.; Lundström, I. J. Electrochem. Soc. 133 (1986) 947.

[7] Munstedt, H.; Kohler, G.; Mohwald, H.; Naegele, O.; Bittin, R. B.; Ely, G.; Meissner, E. *Synthetic Met.* 18 (1997) 259.

- [8] Beck, F. Electrochim. Acta 33 (1988) 839.
- [9] Mengoli, G.; Musiani, M. M.; Fleischmann, M.; Pletcher, D. J. Appl. Electrochem.14 (1984) 285.
- [10] Diaz, A. F.; Castillo, J. J.; Logan, J. A.; Lee, W. *J. Electroanal. Chem.* 129 (1981)115.
- [11] Diaz, A. F. Chem. Scripta 17 (1981) 145.
- [12] Bidan, G. Sensor. Actuat. B-Chem 6 (1992) 45.
- [13] Hanawa, T.; Kuwabata, S.; Yoneyama, H. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 84 (1988) 1587.
- [14] Miasik, J. J.; Hooper, A.; Tofield, B. C. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 82 (1986)1117.
- [15] Pandey, P. C. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 84 (1988) 2259.

- [16] Janata, J.; Josowicz, M. Nature Mater. 2 (2003) 19.
- [17] Wallace, G. G.; Smyth, M.; Zhao, H. Trac-Trend. Anal. Chem. 18 (1999) 245.
- [18] Diaz, A. F.; Kanazawa, K. K. Chem. Comm. (1979) 635.
- [19] Sadki, S.; Schottland, P.; Brodie, N.; Sabouraud, G. *Chem. Soc. Rev.* 29 (2000)283.
- [20] Chung, S. M.; Paik, W.; Yeo, I. H. Synthetic Met. 84 (1997) 155.
- [21] Appel, G.; Böhme, O.; Makalo, R.; Scheiber, D. *Chem. Phys. Letters* 313 (1999)411.
- [22] Kaynak, A. Mat. Res. Bulletin 32 (1997) 271.
- [23] Davidson, R. G.; Hammond, L. C.; Turner, T. G.; Wilson, A. R. Synthetic Met. 81 (1996) 1.
- [24] Liu, M. J.; Tzou, K.; Gregory, R. V. Synthetic Met. 63 (1994) 67.
- [25] Peres, R. C. D.; De Paoli, M. A.; Torresi, R. M. Synthetic Met. 48 (1992) 259.
- [26] Matencio, T.; De Paoli, M. A.; Peres, R. C. D.; Torresi, R. M.; Córdoba de Torresi, S. I. Synthetic Met. 72 (1995) 59.
- [27] Torresi, R. M.; Córdoba de Torresi, S. I.; Matencio, T.; De Paoli, M. A. *Synthetic Met.* 72 (1995) 283.
- [28] Voss, D. Nature 407 (2000) 442.
- [29] Frank, A. J.; Glenis, S.; Nelson, A. J. J. Phys. Chem. 93 (1989) 3818.
- [30] Argun, A. A.; Cirpan, A.; Reynolds, J. R. Adv. Mater. 15 (2003) 1338.
- [31] Yoon, H.; Jang, J. Adv. Funct. Mater. 19 (2009) 1567.
- [32] Sumida, T.; Wada, Y.; Kitamura, T.; Yanagida, S. *Chem. Commun.* (2000) 1613.
- [33] Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ghanem, M. A.; Toh, C. S. *J. Mater. Chem.* 11 (2001) 849.
- [34] Yang, Y.; Wan, M. J. Mater. Chem. 11 (2001) 2022.

- [35] Zhang, X.; Manohar, S. K. J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 14156.
- [36] Qu, L.; Shi, G.; Chen, F.; Zhang, J. Macromolecules 36 (2003) 1063.
- [37] Bajpai, V.; He, P.; Dai, L. Adv. Funct. Mater. 14 (2004) 145.
- [38] Bartlett, P. N. Electrochem. Soc. Interface 13 (2004) 28.
- [39] Gonçales, V. R.; Massafera, M. P.; Benedetti, T. M.; Moore, D. G.; Córdoba de
- Torresi, S. I.; Torresi, R. M. J. Braz. Chem. Soc. 20 (2009) 663.
- [40] Martin, C. R. Science 266 (1994) 1961.
- [41] Cai, Z.; Martin, C. R. J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 4138.
- [42] Ghanbari, K.; Bathaie, S. Z.; Mousavi, M. F. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1825.
- [43] Debiemme-Chouvy, C. Electrochem. Commun. 11 (2009) 298.
- [44] Jérôme, C.; Labaye, D. E.; Jérôme, R. Synthetic Met. 142 (2004) 207.
- [45] Jérôme, C.; Jérôme, R. Angew. Chem. Int. Ed. 37 (1998) 2488.
- [46] He, C.; Yang, C.; Li, Y. Synthetic Met. 139 (2003) 539.
- [47] Zhong, W.; Liu, S.; Chen, X.; Wang, Y.; Yang, W. *Macromolecules* 39 (2006)3224.
- [48] Liu, J.; Wan, M. J. Polym. Sci. Pol. Chem. 39 (2001) 997.
- [49] Kuralay, F.; Özyörük, H.; Yildiz, A. Sensor. Actuat. B-Chem 114 (2006) 500.
- [50] Felix, E. P.; Cardoso, A. A. Química Nova 27 (2004) 123.
- [51] Constable, M.; Charlton, M.; Jensen, F.; Mcdonald, K.; Craig, G.; Taylor, K. W. *Hum. Ecol. Risk Assessment* 9 (2003) 527.
- [52] Porrello, S.; Ferrari, G.; Lenzi, M.; Persia, E. Aquaculture 219 (2003) 485.
- [53] Krupa, S. V. Environm. Pollution 124 (2003) 179.
- [54] Singh, M.; Verma, N.; Garg, A. K.; Redhu, N. Sensor. Actuat. B-Chem 134 (2008) 345.

- [55] Adeloju, S. B.; Shaw, S. J.; Wallace, G. G. Anal. Chim. Acta 281 (1993) 621.
- [56] Kuralay, F.; Özyörük, H.; Yildiz, A. Sensor. Actuat. B-Chem 109 (2005) 194.
- [57] Lakard, B.; Herlem, G.; Lakard, S.; Antoniou, B.; Fahys, B. *Biosens. Bioelectron.*19 (2004) 1641.
- [58] Macsini, M.; Guilbault, G. G. Anal. Chem. 49 (1977) 795.
- [59] Koncki, R.; Chudzik, A.; Walcerz, I. J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 51.
- [60] Koncki, R.; Leszczynski, P.; Hulanicki, A.; Glab, S. Anal. Chim. Acta 257 (1992)67.
- [61] Wang, J. Q.; Chau, J. C.; Sun, T. P.; Hsiung, S. K.; Hsiung, G. B. Sensor. Actuat.B-Chem 91 (2003) 5.
- [62] Mizutani, F.; Yabuki, S.; Sato, Y.; Sawaguchi, T.; Iijima, S. *Electrochim. Acta* 45 (2000) 2945.
- [63] Adeloju, S. B.; Shaw, S. J.; Wallace, G. G. Anal. Chim. Acta 341 (1997) 155.
- [64] Kirstein, D.; Kirstein, L.; Scheller, F. Biosens. Bioelectron.1 (1985) 117.
- [65] Strehlitz, B.; Gründig, B.; Kopinke, H. Anal. Chim. Acta 403 (2000) 11.
- [66] Yakamoto, y.; Senda, M. Sensor. Actuat. B-Chem 13 (1993) 57.
- [67] Massafera, M. P.; Córdoba de Torresi, S. I. Sensor. Actuat. B-Chem 137 (2009)476.
- [68] Lähdesmäki, I.; Lewenstam, A.; Ivaska, A. Talanta 43 (1996) 125.
- [69] Trojanowicz, M.; Lewenstam, A.; Krawezyk, T. K. V.; Lähdesmäki, I.; Szczepek *Electroanalysis* 8 (1996) 233.
- [70] Dall'antonia, L. H.; Vidotti, M. E.; Córdoba de Torresi, S. I.; Torresi, R. M. *Electroanalysis* 14 (2002) 1577.
- [71] Vidotti, M.; Dall'antonia, L. H.; Córdoba de Torresi, S. I.; Bergamaski, K.; Nart, F.C. Anal. Chim. Acta 489 (2003) 207.

[72] Walcarius, Al.; Kuhn, A. Trac-Trend. Anal. Chem. 27 (2008) 593.

[73] Ben-Ali, S.; Cook, D. A.; Evans, S. A. G.; Thienpont, A.; Bartlett, P. N.; Kuhn, A. *Electrochem. Comm.* 5 (2003) 747.

[74] Szamockl, R.; Velichko, A.; Holzapfel, C.; Mücklich, F.; Ravaine, S.; Garrigue, P.;Sojic, N.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 533.

[75] Szamockl, R.; Velichko, A.; Mücklich, F.; Reculusa, S.; Ravaine, S.; Neugebauer, S.; Schuhmann, W.; Hempelmann, R.; Kuhn, A. *Electrochem. Comm.* 9 (2007) 2121.

[76] Crespilho, F. N.; Iost, R. M.; Travain, S. A.; Oliveira Jr., O. N.; Zucolotto, V. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3073.

[77] Fredj, H. B.; Helali, S.; Esseghaier, C.; Vonna, L.; Vidal, L.; Abdelghani, A. *Talanta* 75 (2008) 740.

[78] Njagi, J.; Andreescu, S. Biosens. Bioelectron. 23 (2007) 168.

[79] Lähdesmäki, I.; Kubiak, W. W.; Lewenstam, A.; Ivaska, A. *Talanta* 52 (2000) 269.

[80] Vidotti, M.; Dall'antonia, L. H.; Cintra, E. P.; Córdoba de Torresi, S. I. *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3665.

[81] Kubiak, W.; Wang, J. Anal. Chim. Acta 329 (1996) 181.

[82] Wang, J.; Tuzhi, P. Anal. Chem. 58 (1986) 3257.

[83] Wang, J.; Hutchins, L. D. Anal. Chem. 57 (1985) 1536.

[84] Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M. J.; Waldron, K. C. *Biotechniques* 37 (2004) 790.

[85] Cintra, E. P. Caracterização Espectroeletroquímica de Polímeros Condutores Preparados a Partir de Monômeros Bifuncionais. 2003. 144p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003. [86] Decher, G.; Hong, J. D. Macromol. Chem. Macromol. Symp. 46 (1991) 321.

[87] Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Thin Solid Films 210-211 (1992) 831.

[88] Decher, G. Science 277 (1997) 1232.

[89] Benedetti, T. M.; Bazito, F. F. C.; Ponzio, E. A.; Torresi, R. M. Langmuir 24 (2008) 3602.

[90] Vidotti, M.; Van Greco, C.; Ponzio, E. A.; Torresi, S. I. C. *Electrochem. Comm.* 8 (2006) 554.

- [91] Fiorito, P. A.; Gonçales, V. R.; Ponzio, E. A.; Torresi, S. I. C. *Chem. Comm.* 3 (2005) 366.
- [92] Ferreira, M.; Fiorito, P. A.; Oliveira Jr., O. N.; Torresi, S. I. C. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1611.
- [93] Paterno, L. G.; Mattoso, L. H. C.; Oliveira Jr., O. N. *Química Nova* 24 (2001) 228.
- [94] Cintra, E. P.; Córdoba de Torresi, S. I. Electroanal. Chem. 518 (2002) 33.
- [95] Varela, H.; Malta, M.; Torresi, R. M. Química Nova 23 (2000) 664.
- [96] Adeloju, S. B.; Shaw, S. J.; Wallace, G. G. Anal. Chim. Acta 323 (1996) 107.
- [97] Cao, G. Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications. Londres, Imperial College Press, 2007. p. 15-48.
- [98] Zhou, H.; Shi, Z.; Lu, Y. Synthetic Met. 160 (2010) 1925.
- [99] Xu, L.; Chen, W.; Mulchandani, A.; Yan, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 6009.
- [100] Wenzel, R. N. Ind. Eng. Chem. 28 (1936) 988.
- [101] Cassie, A. B. D.; Baxter, S. Trans. Faraday Soc. 40 (1944) 546.
- [102] Teasdale, P. R.; Wallace, G. G. React. Polym. 24 (1995) 157.

[103] Azioune, A.; Chehimi, M. M.; Miksa, B.; Basinska, T.; Slomkowski, S. *Langmuir* 18 (2002) 1150.

[104] Teh, K. S.; Takahashi, Y.; Yao, Z.; Lu, Y. W. Sensor. Actuat. A-Phys. 155 (2009) 113.

[105] Vidanapathirana, K. P.; Careem, M. A.; Skaarup, S.; West, K. Solid State Ionics 154-155 (2002) 331.

[106] Varela, H.; De Albuquerque Maranhão, S. L.; Mello, R. M. Q.; Ticianelli, E. A.;Torresi, R. M. Synthetic Met. 122 (2001) 321.

[107] Shimidzu, T.; Ohtani, A.; Iyoda, T.; Honda, K. *J. Electroanal. Chem.* 224 (1987)123.

[108] Ghenaatian, H. R.; Mousavi, M. F.; Kazemi, S. H.; Shamsipur, M. Synthetic *Met.* 159 (2009) 1717.

7. CURRÍCULO

Mariana Pereira Massafera

Dados Pessoais Nascimento 07/05/1984 - São Bernardo do Campo/SP - Brasil Endereço profissional Universidade de São Paulo, Instituto de Química
Avenida Prof. Lineu Prestes, 748, Bloco 5 Superior, Sala 577.
Butantã - São Paulo/SP - Brasil. CEP 05508-000.
Telefone: (11) 3091-2350 Endereço eletrônico mariana.massafera@gmail.com

Formação Acadêmica

2006 - 2010	Doutorado em Química Instituto de Química - Universidade de São Paulo Título: Nanoestruturação de Biossensores Enzimáticos para Detecção de Uréia Orientadora: Susana Inés Córdoba de Torresi Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
2002 - 2005	Bacharelado em Química Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo
1999 - 2001	Ensino Médio Colégio Villa Lobos (Amparo / SP)

Formação Complementar

2009	Principles and Applications of Diffusion at Ultramicroelectrodes International Society of Electrochemistry, Beijing, China
2009	Synchrotron Radiation in Materials Science. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
2008	Técnicas Eletroquímicas Localizadas e XPS. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
2008	Microscopia Eletrônica de Varredura. Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Guarujá, Brasil
2008	Microanálise no Microscópio Eletrônico de Varredura. Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, Guarujá, Brasil
2008	European School on Nanosciences & Nanotechnologies. Université Joseph Fourier, Grenoble, França
2007	Empreendedorismo Tecnológico: Criando Empresas de Base Tecnológica Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil

2007	Workshop "Eletrodos Modificados". Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil
2006	Curso de Espectroscopia Vibracional Prof. O. Sala. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
2004	Extensão universitária em Escola de Inverno em Sistemas Nanoestruturados. Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, Brasil
2004	VIII Disciplina Intersemestral: Mudanças Climáticas. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto, Brasil
2003	A Percepção da Cor e sua Medida. Instituto de Química de São Carlos - USP, São Carlos, Brasil

Atuação Acadêmica

1. Instituto de Química - Universidade de São Paulo

2009	Monitora (4 ^ª Escola de Eletroquímica)
2008	Estagiária PAE (QFL3402 Físico-Química Experimental)
2008	Monitora (3ª Escola de Eletroquímica)
2007	Estagiária PAE (QFL3402 Físico-Química Experimental)
2007	Representação discente de pós-graduação (Comissão de Cultura e Extensão)
2007	Monitora (2 ^ª Escola de Eletroquímica)
2007	Monitora (QFL2452 Físico-Química II)
2006	Monitora (1 ^ª Escola de Eletroquímica)
2006	Estagiária PAE (QFL2426 Físico-Química Experimental XVII)
2006	Monitora (QFL2636 Eletroquímica e Eletroanalítica)

2. Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN) - Nantes - France

2009	Estágio de pesquisa
2008	Estágio de pesquisa

3. Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo

2005

Representante discente (Comissão de Cultura e Extensão)

2005	5	Representante discente (Comissão interna do Programa USP- Recicla)
2002	2 - 2004	Aluna do Programa de Educação Tutorial PET
2004 - 2005		Bolsista FAPESP de iniciação científica (Eletroxidação de Formaldeído em Meio Ácido. Orientadora: Teresa Benita Iwasita de Vielstich)
Projetos		
2008 - presente	Utilização de Líquidos Iônicos na Preparação de Dispersões de Nanotubos de Carbono com Polímeros Condutores ou Polissacarídeos Financiadores: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)	
2006 - presente	Nanoestrutu Financiadora	iração de Biossensores Enzimáticos para Detecção de Uréia a: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Áreas de Atuação

1.	Química
2.	Físico-Química
3.	Eletroquímica
4.	Biossensores
5.	Polímeros Condutores
6.	Materiais Nanoestruturados

Idiomas

Alemão	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente
Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Francês	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2005	Prêmio Lavoisier - Melhor desempenho acadêmico do curso Bach. em Química Fundamental, turma 2002. Concedido pelo Conselho Regional de Química (CRQ) e Instituto de Química de São Carlos - USP.
2004	Menção Honrosa, XII SIICUSP, promovido pela Universidade de São Paulo e pelo CNPq.
1999	Olimpíada Brasileira de Física - 3º lugar regional. Concedido pela Sociedade Brasileira de Física.

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Gonçales, V. R., Massafera, M. P., Benedetti, T. M., Moore, D. G., Torresi, S. I. C., Torresi, R. M. Nanostructured thin films obtained by electrodeposition over a colloidal crystal template: applications in electrochemical devices. *Journal of the Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 663 - 673.

2. Massafera, M. P., Torresi, S. I. C. Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: Comparing enzyme immobilization methods. *Sensors and Actuators. B, Chem.* 137 (2009) 476 - 482.

3. de Lima, R. B., Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Catalysis of formaldehyde oxidation by electrodeposits of PtRu. *Journal of Electroanal. Chem.* 603 (2007) 142-148.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. Massafera, M. P., Torresi, S. I. C. Otimização da síntese de nanofios de poli(pirrol) e sua influência na detecção de amônia. Simpósio Iberoamericano de Eletroquímica, 2010, Madrid / Espanha.

2. Penna, T. C., Massafera, M. P., Riou, I., Chauvet, O., Torresi, S. I. C., Torresi, R. M. Síntese e caracterização de nanocompósitos de nanotubos de carbono e poli(anilina) preparados em líquidos iônicos. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009, Fortaleza / CE.

3. de Lima, R. B., Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Catálise da oxidação de formaldeído em eletrodepósitos de PtRu. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia / SP.

4. Massafera, M. P., Vidotti, M., Torresi, S. I. C.

Construção de um biossensor enzimático para detecção amperométrica de uréia em amostras clínicas. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia / SP.

5. Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Eletroxidação de formaldeído sobre eletrodepósitos de Pt, Ru e PtRu. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005, Londrina / PR.

6. Batista, E. A., Massafera, M. P., Iwasita, T.

Eletro-oxidação de formaldeído em meio ácido: resultados eletroquímicos e espectroscópicos. XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2004, Teresópolis / RJ.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Gonçales, V. R., Massafera, M. P., Galhardo, K. S., Silveira, L. T., Torresi, S. I. C. Relação geometria/tamanho/reatividade em materiais nanoestruturados aplicados a sensores e biossensores. 2º Workshop INCT Bioanalítica, 2010, Águas de Lindóia / SP.

2. Kanashiro, L. G., Massafera, M. P., Chauvet, O., Torresi, S. I. C., Torresi, R. M. Comportamento eletroquímico de compósitos de poli(anilina) e nanotubos de carbono preparados em líquido iônico. 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia / SP.

3. Massafera, M. P., Debiemme-Chouvy, C., Torresi, S. I. C. Poly(pyrrole) nanopores and nanowires as ammonia sensing platforms. 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2009, Beijing / China.

4. Massafera, M. P., Debiemme-Chouvy, C., Torresi, S. I. C. Synthesis and characterization of poly(pyrrole) nanopores and nanowires and application as ammonia sensors. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009, Rio de Janeiro / RJ.

5. Massafera, M. P., Torresi, S. I. C. Layer-by-Layer deposition of urease into nanostructured poly(pyrrole) for improvement of an urea biosensor. 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2008, Sevilha / Espanha.

6. Massafera, M. P., Torresi, S. I. C. LBL-based urea biosensors: the influence of preparation parameters in the detection kinetics. 7th Brazilian Materials Research Society Meeting, 2008, Guarujá / SP.

7. Massafera, M. P., Vidotti, M., Torresi, S. I. C. A influência dos métodos de imobilização de urease no funcionamento de um biossensor para detecção amperométrica de uréia. 30^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia / SP.

8. Massafera, M. P., Gonçales, V. R., Torresi, S. I. C. Nanoestruturação de filmes de poli(pirrol) com aplicação em sensores de amônia. 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia / SP.

9. Massafera, M. P., Gonçales, V. R., Torresi, S. I. C. Template nanostructuration of poly(Pyrrole) and poly(5-amine-1-naphtol) and its application to urea biosensor. 6th Brazilian Materials Research Society Meeting, 2007, Natal / RN.

10. Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Atividade de eletrodos de Pt, Ru e PtRu frente à reação de eletroxidação de formaldeído. XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos, 2005, São Carlos / SP.

11. Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. As vias de eletro-oxidação do formaldeído sobre platina em meio ácido. I Simpósio de Iniciação Científica do Programa de Educação Tutorial - IQSC, 2004, São Carlos / SP.

12. Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Estudo da atividade de eletrodos de PtRu nas vias de eletroxidação de formaldeído. XII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2004, São Paulo / SP.

13. Massafera, M. P., Batista, E. A., Iwasita, T. Influência do tempo de adsorção e da concentração de formaldeído nas densidades de corrente obtidas durante a eletro-oxidação sobre platina policristalina em meio ácido. XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos, 2004, São Carlos / SP.

Eventos

Participação em eventos

- 1. 60th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2009.
- 2. XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2009.
- 3. 11th International Conference on Advanced Materials, 2009.
- 4. Workshop Nacional de Biossensores, 2009.
- 5. 59th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2008.
- 6. 7th Brazilian Materials Research Society Meeting, 2008.
- 7. European School on Nanosciences and Nanotechnologies, 2008.
- 8. Journée des Doctorants de l'École Doctorale STIM, 2008.
- 9. 30^ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.
10. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

- 11. 6th Brazilian Materials Research Society Meeting, 2007.
- 12. XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- 13. XII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2005.
- 14. XII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2004.
- 15. XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de São Carlos, 2004.
- 16. XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry, 2004.

17. XIV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química (Araraquara/Ribeirão Preto/São Carlos), 2003.

18. 55^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), 2003.

Organização de eventos

- 1. Massafera, M. P. I Simpósio de Iniciação Científica PET, 2004.
- 2. Massafera, M. P. III Feira de Profissões da USP, 2003.