UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FUNDAMENTAL

Construção de Biossensores utilizando Polímeros Condutores Eletrônicos

Dissertação de Mestrado

ALUNO: *Pablo Alejandro Fiorito*
ORIENTADORA: *Prof. Dra. Susana Inés Córdoba de Torresi*

São Paulo – julho de 2001

DEDALUS - Acervo - CQ

30100004039

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fiorito, Pablo Alejandro

F521c Construção de biossensores utilizando polímeros condutores
eletrônicos / Pablo Alejandro Fiorito. -- São Paulo, 2001.

95p.
??

Dissertação (mestrado) -- Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Córdoba de Torresi, Susana Inés

1. Eletroquímica I. T. II. Córdoba de Torresi, Susana Inés,
orientador.

541.37 CDD

"Construção de Biossensores Utilizando Polímeros Condutores Eletrônicos"

PABLO ALEJANDRO FIORITO

*Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos
necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área:
Físico-Química.*

Aprovado por:

Profa. Dra. SUSANA INÊS CÓRDOBA DE TORRESI
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. SILVIA HELENA PIRES SERRANO
IQ - USP

Profa. Dra. SONIA REGINA BIAGGIO ROCHA
UFSCar

SÃO PAULO
27 DE JULHO 2001.

*A Nora, meu amor.
Aos meus pais e meu irmão que,
embora na distancia,
sempre estiveram ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Susana Córdoba de Torresi pela orientação dedicada e segura, pela confiança demonstrada e pela liberdade de trabalho concedida,

Ao José Eduardo, pela amizade e por estar sempre perto quando eu precisei de ajuda,

Ao Luiz Henrique, pelas valiosas discussões e pela paciência na correção de meus escritos,

Ao Laboratório de Espectroscopia Molecular IQ-USP, pela obtenção dos espectros Raman.

Ao Dr. Daniel Buttry da Universidade de Wyoming por ter cedido os derivados de ferroceno, sintetizados pelo seu grupo.

Aos colegas do Laboratório de Materiais Eletroativos, pela agradável convivência.

Aos funcionários do IQ-USP.

A FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Resumo	i
Abstract	ii
1 – Introdução	01
1.1 – Sensores Químicos	01
1.2 – Biossensores	05
1.3 – Biossensores enzimáticos amperométricos	09
1.3.1 – Primeira geração; o eletrodo de oxigênio	11
1.3.2 – Segunda geração; mediadores artificiais	13
1.3.3 – Terceira geração; transferência direta de elétrons	15
1.4 – Métodos de imobilização	18
1.4.1 – Adsorção	19
1.4.2 – Microencapsulamento	19
1.4.3 – Ligação covalente	21
1.4.4 – Entre-cruzamento	23
1.4.5 – Oclusão	24
1.5 – Biossensores para a determinação de glicose	30
1.6 – Objetivo do trabalho	32
2 – Parte experimental	33
2.1 – Reagentes e soluções	33
2.2 – Modificação dos eletrodos	33
2.2.1 – Poli(pirrol)	34
2.2.1.1 – Biossensor de controle	34
2.2.1.2 – Biossensor incluindo ferroceno	34
2.2.1.3 – Biossensor incluindo derivado do ferroceno	

solúvel em água	35
2.2.2 – Poli(N-metilpirrol)	36
2.2.2.1 – Biossensor de controle	36
2.2.2.2 – Biossensor incluindo ferroceno	36
2.3 – Medidas amperométricas	36
2.4 – Instrumentação	37
3 – Resultados e discussões	38
3.1 – Polimerização do pirrol	38
3.2 – Resposta do biossensor	44
3.3 – Efeito da concentração da enzima	48
3.4 – Efeito da espessura do filme polimérico na resposta do biossensor	51
3.5 – Efeito do potencial aplicado	52
3.6 – Efeito do oxigênio	56
3.7 – Influência do eletrólito suporte utilizado na polimerização sobre a resposta do sensor	59
3.8 – Construção de um biossensor contendo ferroceno modificado solúvel em água	62
3.9 – Efeito dos interferentes. O Nafion como membrana permeosseletiva	64
3.10 – Sobreoxidação do poli(pirrol). Efeito sobre o desempenho do biossensor	67
3.11 – Estabilidade dos sensores: Fc vs Fc ₁ I	71
3.12 – Polimerização do N-metilpirrol	73
4 – Conclusões	79
5 – Referências	81
6 – Curriculum Vitae	87

RESUMO

Neste trabalho são elaborados biossensores para a detecção amperométrica de glicose. Para isso, imobilizou-se a enzima glicose oxidase em matrizes de polímeros condutores. Foram construídos sensores utilizando-se poli(pirrol) e poli(N-metilpirrol).

Com o objetivo de substituir o oxigênio molecular na etapa de transdução do sinal, o ferroceno foi incorporado dentro do polímero condutor. Para isso, os polímeros foram elaborados utilizando misturas água-etanol como meio de polimerização. A inclusão do ferroceno no sensor resulta em maior sensibilidade à glicose ($4,33 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o biossensor preparado a partir da mistura água-etanol contendo o ferroceno e de $0,23 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o sensor sem ferroceno). Por outro lado, permite o funcionamento do sensor a potenciais menores que no caso do sensor sem ferroceno (0,4 V para o sensor com ferroceno vs. 0,65 V para o caso sem ferroceno).

O deslocamento do potencial de detecção para valores menos positivos não foi suficiente para evitar as interferências causadas pelos íons ascorbato e ureato. Para isto, mostrou-se 100% efetivo o recobrimento dos sensores com uma película de Nafion[®]. A sobreoxidação do poli(pirrol) também mostrou potencialidade para a eliminação de interferentes, embora o processo resulte na perda de sensibilidade, provavelmente causada pela desnaturação da enzima.

Quando usado o poli(N-metilpirrol) como suporte para a enzima, obtiveram-se melhores respostas, causadas pela possibilidade de se preparar filmes mais espessos, consequentemente de imobilizar maior quantidade de enzima, sem observar perda de resposta causada por problemas difusionais.

ABSTRACT

The present work describes the elaboration of a biosensor for glucose detection. The enzyme, glucose oxidase, was immobilized in different conducting polymers. Two different polymers were used: polypyrrole and poly(*N*-methylpyrrole).

With the aim of replacing the molecular oxygen in the transduction step, ferrocene has been immobilized within the conducting polymer. Once the ferrocenium was insoluble in water, in order to develop a different route, the electropolymerization was carried out in a mixture of water and ethanol (1:1). This procedure leads to a polymer with a poor electroactivity, detected by Raman experiments. The ferrocene addition in the sensor increases the sensitivity to the glucose determination ($4,33 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for the biosensor with ferrocene and $0,23 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ for the sensor without ferrocene). Alternatively, the sensor containing ferrocene allows to operate at less positive potentials than that one without ferrocene (+ 0,40 V and + 0,65 V, respectively). This potential shift was not enough to inhibit the interference caused by ascorbate and ureate ions.

One method to avoid the interference problem was to recover the sensor with a very thin layer of Nafion. Also poly(pyrrole) overoxidation is a very efficient method to eliminate this interference, but this process leads to a sensitivity decrease due to enzyme denaturation.

A better response was observed for sensor assembled using the poly(*N*-methyl-pyrrole) as the support for enzyme immobilization. This behavior was provoked by the thicker of polymer film formed leading to higher amount of immobilized enzyme. Even though, no diminution in the response was caused by diffusion problems.

1 - Introdução

1.1 - Sensores químicos

O uso de sensores químicos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, pois com o aperfeiçoamento dos mesmos, pode-se obter informações em tempo real com respeito à quantidade de certas substâncias presente em um sistema ou ambiente. Sua importância prática aumenta continuamente, sendo que eles não oferecem somente uma alternativa vantajosa para a demanda de preço e tempo de análise em laboratório, mas, principalmente, alimentam informações de entrada necessárias para uma grande variedade de dispositivos automáticos, podendo regular diversos tipos de mecanismos. Assim, grandes esforços são concentrados no planejamento físico e na vasta operação científica e tecnológica desses sistemas.

Uma definição bastante usual de um sensor químico permite descrevê-lo como um dispositivo que provê informação direta acerca da composição química do meio ambiente no qual opera.

Os sensores químicos formam parte de um processo de aquisição de informação com o qual se obtém, em tempo real, conhecimento da composição química do meio que o rodeia e o resultado é um sinal físico. Geralmente esse processo ocorre em duas etapas: reconhecimento e transdução. O reconhecimento está relacionado com uma interação química, enquanto que a transdução é a conversão do sinal químico em um sinal físico que pode ser medido. A etapa de transdução está geralmente ligada à amplificação do sinal. Assim, um sensor químico consiste em uma “camada” quimicamente seletiva imobilizada em um transdutor físico que, de acordo ao método de transdução, podem ser classificados em: térmicos, de massa, ópticos e eletroquímicos [1]. Os sensores térmicos utilizam o

calor como parâmetro físico, embora seja difícil de se controlar o fluxo. Geralmente são utilizadas reações enzimáticas como geradoras de calor.

Entre os sensores baseados em mudanças de massa como método de transdução, podemos considerar dois tipos: os baseados em materiais piezoelétricos e aqueles baseados em ondas acústicas.

No caso dos sensores eletroquímicos a resposta resulta da interação entre química e eletricidade. Estes sensores representam o maior grupo de sensores químicos [2]. O sensor é um condutor elétrico que é introduzido no meio a ser estudado e onde se estabelece uma transferência de carga entre as substâncias presentes no meio e o sensor. Deste modo, a variação de energia livre na interface meio/sensor é recolhida pela camada quimicamente seletiva, com a subsequente transmissão pelo acoplamento físico do sensor sendo mostrada na forma de um sinal elétrico de corrente ou potencial.

De acordo com o modo de operação, os sensores eletroquímicos podem ser classificados em:

- Condutimétricos;
- Potenciométricos; e,
- Amperométricos.

Os sensores condutimétricos se baseiam na medida das mudanças de condutividade da camada quimicamente seletiva. Por outro lado, o princípio de funcionamento dos sensores potenciométricos está baseado na medida do potencial de equilíbrio que se estabelece na interface sensor/meio. O procedimento consiste em medir a diferença de potencial entre dois eletrodos mergulhados numa solução eletrolítica, onde o potencial de um dos eletrodos opera como função da concentração da espécie a determinar. A relação entre potencial e concentração das espécies eletroativas é determinada pela equação de Nernst, ou seja, o potencial é

uma função exponencial da concentração. Exemplos de sensores potenciométricos são os sensores de pH e os eletrodos íon- seletivos (ISE).

Nos sensores amperométricos a informação é obtida da relação corrente-concentração. Quando a diferença de potencial em uma célula eletroquímica é variada de um valor a outro e a corrente resultante é registrada como função do potencial, obtém-se uma curva conhecida como curva de polarização (Fig. 1.1).

Fig. 1.1: Dependência da corrente com o potencial aplicado

A partir de um determinado potencial se obtém uma densidade de corrente limite (I_L), a qual é função da concentração C da espécie eletroativa no seio da solução[3], de acordo com a seguinte equação:

$$I_L = \frac{n \cdot F \cdot D \cdot C}{d} = k C \quad (Eq. 1)$$

onde D é o coeficiente de difusão da espécie eletroativa, n o número de elétrons envolvidos na reação, F a constante de Faraday e d a espessura da camada de difusão. Assim, a corrente limite provê uma medida quantitativa da concentração.

A diferença entre os sensores potenciométricos e amperométricos reside no fato dos primeiros estabelecerem um equilíbrio na interface sensor/meio, resultando na medida do potencial de um eletrodo ou uma membrana, enquanto no segundo caso, o potencial do eletrodo é utilizado para produzir a reação.

Os sensores potenciométricos requerem reações de eletrodo rápidas, enquanto que nos amperométricos a velocidade da reação eletroquímica pode ser controlada pelo potencial aplicado. Por outro lado, uma vez que nos sensores potenciométricos não há consumo de analito o transporte de massa não é importante; isto não ocorre para os sensores amperométricos, onde há consumo de analito e o transporte de massa é importante e deve ser controlado. A Tabela 1 resume as principais características dos sensores amperométricos e potenciométricos.

Tabela 1: Principais características dos sensores potenciométricos e amperométricos.

Tipo de sensor	/	Potenciométrico	Amperométrico
Modo de operação		Medida de potencial a $i=0$	Medida de corrente limite
Cinética do eletrodo		Deve ser rápida	O potencial do eletrodo conduz a reação
Resposta		Potencial função exponencial da concentração	Corrente função linear da concentração
Transporte de massa		Sem importância	Deve ser controlado

1.2 - Biossensores

A simplificação de uma metodologia analítica que permita um teste rápido, barato, e preferivelmente sem nenhum pré-tratamento da amostra a ser analisada, é ainda um grande desafio e continua sendo o foco de atenção de inúmeros trabalhos na área de química analítica. Neste sentido, os sensores químicos têm um papel fundamental, uma vez que possuem elevada sensibilidade e são fáceis de produzir e de utilizar.

A sensibilidade é uma característica que afasta os sensores químicos do conjunto de outros sensores. Neste aspecto, reagentes extraordinariamente seletivos são produzidos na natureza em forma de enzimas, anticorpos, receptores, etc. Estas biomoléculas podem ser integradas com um transdutor físico-químico para formar um dispositivo analítico, de maneira a ser aproveitada a seletividade destes compostos. Esses dispositivos, onde existe um elemento biológico em íntimo contato com um transdutor físico-químico, são denominados “biossensores” (Fig. 1.2) [4].

O primeiro biossensor foi descrito por Clark e Lyons [5] no ano 1962, e consistia na imobilização da enzima Glicose Oxidase (GOx) entre duas membranas dispostas sobre um eletrodo de Clark (Fig. 1.3a). A GOx catalisa a reação de oxidação de glicose, de acordo com a seguinte reação:

Fig. 1.2: Esquema de funcionamento de um biossensor.

O analito (glicose) e o oxigênio podem atravessar a primeira membrana para reagir com a enzima. Depois, o oxigênio remanescente pode penetrar na segunda membrana e difundir até o eletrodo (Fig. 1.3b). Uma diferença de potencial de $-0,7\text{ V}$ é aplicada entre o cátodo de platina e o ânodo de prata, favorecendo a redução do oxigênio sobre o cátodo de platina. A concentração de glicose será proporcional à diminuição da quantidade de oxigênio (uma vez que é consumido pela reação enzimática), monitorada pela diminuição da corrente de redução.

Fig. 1.3: Esquema da montagem (a) e representação esquemática do funcionamento (b) do biossensor de glicose desenvolvido por Clark e Lyons [4,5].

O elemento biológico é o maior responsável pela seletividade de um biossensor. Quatro tipos principais de elementos biológicos utilizados na elaboração de biossensores podem ser enumerados:

- Enzimas;
- Anticorpos;
- Ácidos nucleicos; e,
- Receptores.

Os elementos mais utilizados são as enzimas. Estas podem ser utilizadas na forma pura ou pela imobilização de microorganismos ou tecidos que contenham a enzima requerida. Tecidos vegetais podem ser utilizados com preparação mínima [6-10] e apresentam algumas vantagens sobre as enzimas puras: são mais baratos e, pelo fato da enzima existir em seu meio ambiente natural, é menos propensa à degradação. Por outro lado, na maioria dos casos os tecidos contêm várias enzimas, pelo que os extractos enzimáticos não apresentam o grau de seletividade das enzimas puras.

As reações enzimáticas combinam a elevada seletividade da enzima de se unir a um determinado substrato com as propriedades catalíticas da mesma, apresentando uma amplificação direta na etapa de reconhecimento. Este fato os diferenciam dos sensores químicos, onde a amplificação ocorre invariavelmente durante a etapa de transdução.

Os anticorpos possuem outro modo de ação: se unem especificamente com o correspondente antígeno, mas não apresentam nenhum efeito catalítico. Já os ácidos nucleicos têm sido os menos utilizados. Estes podem operar seletivamente devido às características de pareamento das bases.

Os receptores são proteínas transmembranais, encontradas na membrana plasmática das células que possuem propriedades de reconhecimento molecular. Embora sejam difíceis de serem separadas, apresentam níveis de afinidade e seletividade similares aos anticorpos, os que os torna de utilidade na área de biossensores.

1.3 - Biossensores enzimáticos amperométricos

Entre as variadas combinações de biocomponentes e mecanismos de transdução, a que envolve a utilização de enzimas redox e detecção amperométrica, não só tem sido a mais abordada no âmbito científico como é a base da maioria dos biossensores disponíveis comercialmente [11].

As enzimas redox catalisam a conversão de um substrato entre os estados oxidado e reduzido. Podem ser classificadas em dois grandes grupos, as oxidases e as dehidrogenases. Estas enzimas se caracterizam por possuir um grupo prostético o qual contem um nucleotídeo (por exemplo Flavina Adenina Dinucleotídeo, FAD), um complexo quinônico (por exemplo Pirrolo-Quinolino Quinona, PQQ) e/ou um metal de transição complexado, usualmente ferro (como grupo heme), molibdênio, cobre ou zinco. O grupo prostético se posiciona no interior da matriz polipeptídica da proteína e atua como sítio ativo da enzima.

O esquema de reações para enzimas redox é:

O oxigênio molecular atua como acceptor de elétrons e também opera como co-substrato primário para enzimas redox.

Neste âmbito cabe a pergunta de como é gerado o sinal amperométrico nos biossensores baseados em enzimas redox. Para ilustrar o processo consideremos o caso da oxidação de um substrato, utilizando uma oxido-redutase como elemento de reconhecimento biomolecular, que deve ser reduzida para que ocorra a reação. Para isso durante a reação com

o substrato se reduzirá, dependendo da enzima utilizada, o grupo prostético integrado à enzima (FAD, heme, etc) ou um co-substrato (FMN, NAD^+ , NADP^+). A corrente através do eletrodo será produzida pela reoxidação do grupo prostético ou do co-substrato, regenerando a enzima, de modo que possa seguir atuando no reconhecimento do substrato e reações de conversão.

Normalmente, as enzimas redox não trocam elétrons diretamente com o eletrodo metálico devido ao fato que o sítio ativo da enzima está localizado no interior da estrutura da proteína e, mesmo quando a molécula de enzima estiver na configuração de menor aproximação, a distância entre o centro redox e a superfície do eletrodo ainda é demasiada grande para permitir uma transferência de elétrons eficiente (Fig. 1.4).

Fig. 1.4: *Transferência de elétrons direta desde o sítio ativo da enzima até a superfície do eletrodo.*

Por este motivo, é necessária a utilização de compostos denominados mediadores que se responsabilizem pela troca de elétrons entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo.

Dependendo do mecanismo utilizado na transferência de elétrons, os biossensores podem ser classificados em três grupos: de primeira, de segunda e de terceira geração.

1.3.1 - Primeira geração: o eletrodo de oxigênio.

Os biossensores de primeira geração aproveitam o fato que na natureza a maioria das enzimas são “recicladas” por um co-substrato solúvel, tais como oxigênio molecular ou NAD^+ . O sinal amperométrico é produzido pela oxidação ou redução do co-substrato sobre a superfície do eletrodo (Fig. 1.5)

Fig. 1.5: *Transferência de elétrons através de co-substratos solúveis.*

O biossensor de glicose descrito por Clark e Lyons é um sensor de primeira geração, uma vez que o sinal amperométrico é gerado pela redução do oxigênio. Este método apresenta uma série de desvantagens:

primeiro, o nível de oxigênio do meio onde o sensor opera deve ser cuidadosamente controlado, de outro modo a resposta do eletrodo à diminuição de oxigênio não será proporcional à concentração de glicose; por outro lado, é necessário um potencial de aproximadamente $-0,7\text{ V}$ vs ECS para a redução quantitativa do oxigênio e, neste potencial, outros materiais podem se reduzir provocando uma interferência positiva.

Os sensores baseados na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio gerado na reação enzimática também são de primeira geração. Essa detecção pode ser feita ajustando o potencial do eletrodo a $+0,65\text{ V}$ e medindo a corrente de oxidação do H_2O_2 (Fig 1.6).

Fig. 1.6: Esquema para a detecção amperométrica do H_2O_2 .

Este tipo de configuração também apresenta problemas de interferentes, uma vez que devido ao elevado potencial de trabalho podem-se oxidar, diretamente sobre o eletrodo, outras espécies presentes na solução. Além disso, o sinal final também é dependente da concentração de oxigênio no meio de trabalho.

Várias enzimas, tais como glicose oxidase [12], lactato oxidase [13,14], glutamato oxidase [15], galactose oxidase [16] e xantine oxidase

[17], foram utilizadas em biossensores, monitorando-se o consumo de O_2 ou produção de H_2O_2 .

1.3.2 – Segunda geração: mediadores artificiais

Nesta classe de biossensores, mediadores artificiais são utilizados para substituir os co-substratos naturais no processo de transferência de elétrons, com a finalidade de evitar a dependência com o O_2 e diminuir o potencial de detecção, de modo de reduzir a interferência causada por outros compostos que possam oxidar-se diretamente sobre o eletrodo.

Para serem utilizados como mediadores redox, os compostos devem possuir as seguintes características [4]:

- i) reagir rapidamente com a enzima;
- ii) apresentar cinética de transferência de elétrons reversível;
- iii) baixo potencial de regeneração;
- iv) propriedades eletroquímicas independentes do pH;
- v) ser estável tanto na forma oxidada como na reduzida;
- vi) não reagir com oxigênio; e,
- vii) não ser tóxico.

Ótimos candidatos para atuar como mediadores redox são os cátions de metais de transição e seus complexos. O metal mais utilizado têm sido o ferro, formando parte de compostos ou complexos, uma vez que o Fe^{+3} livre não é um bom mediador, já que hidrolisa e precipita como hidróxido, equação 5.

Os compostos de ferro mais utilizados como mediadores têm sido o hexacianoferrato(III) [18,19] e o ferroceno e seus derivados [20-23]. O ferroceno consiste em um “*sandwich*” de um íon ferro entre dois ânions ciclopentadienil.

O anel ciclopentadienil do ferroceno pode ter vários grupos unidos. A presença destes substituintes modifica as propriedades do composto, tais como a solubilidade e o potencial redox; portanto, a escolha do mediador dependerá do método de elaboração do biossensor utilizado. O ferroceno e seus derivados foram os mediadores redox mais utilizados, uma vez que cumprem com a maioria dos requisitos descritos anteriormente.

Na configuração mais simples, mediadores de transferência de elétrons solúveis são adicionados à amostra a ser estudada e utilizados como mediadores de livre difusão. Como exemplos podemos citar derivados solúveis do ferroceno, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, quinonas ou complexos de ósmio [24-29].

Nos últimos anos, o principal objetivo no desenvolvimento de biossensores foi a integração de todos os componentes do sensor, que

resultassem em dispositivos compactos e de fácil manuseio. Por isto, uma nova classe de biossensores de segunda geração foi desenvolvida, onde o mediador redox é imobilizado junto à enzima sobre o eletrodo.

Um método relativamente fácil para a imobilização do mediador é a incorporação da enzima e o mediador em eletrodos de pasta de carbono [30-32]. A principal desvantagem que apresenta este tipo de biossensores é a sua limitada estabilidade devido à perda progressiva do mediador.

Uma outra forma simples de incorporar um mediador redox é a sua co-imobilização com a enzima em uma matriz de um polímero gerado eletroquimicamente. Iwakura e cols. [33] descreveram a eletropolimerização de pirrol, incorporando glicose oxidase e ferroceno carboxilato como mediador. Para a utilização deste procedimento é necessário que o mediador seja solúvel no meio de polimerização, comumente água. Esses biossensores operam, na maioria dos casos, em meio aquoso, o que pode resultar na perda do mediador solúvel, o que provoca uma diminuição do tempo de vida dos sensores e os torna incompatíveis para sua utilização em medidas “in-vivo”..

1.3.3 – Terceira geração: transferência direta de elétrons

Nesta classe de biossensores existe a transferência direta de elétrons entre a enzima e o transdutor, evitando etapas intermediárias.

Para permitir a transferência direta de elétrons entre a proteína e o eletrodo, a distância entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo deve ser a de maior aproximação. A transferência direta só é possível quando as moléculas de enzima formam uma monocamada sobre o eletrodo. O grande inconveniente é que as enzimas tendem a desnaturar quando em contato com o eletrodo, levando ao envenenamento do mesmo. Uma alternativa

para prevenir a desnaturação das enzimas é a modificação da superfície onde se adsorverá a enzima, fato que também pode promover uma imobilização com uma orientação preferencial da enzima [34]. Quando essa orientação ocorre com o grupo prostético dirigido à superfície do eletrodo pode incrementar drasticamente a corrente, uma vez que todas as biomoléculas podem contribuir ao sinal, enquanto que no caso de moléculas adsorvidas de maneira não específica algumas poucas contribuirão (Fig. 1.7).

Fig. 1.7: Enzimas imobilizadas por adsorção não específica (esquerda) e em forma orientada sobre um eletrodo modificado com uma monocamada (direita) [34].

Outra alternativa é conectar a enzima ao eletrodo através de “fios moleculares” que facilitem o intercâmbio de elétrons [35]. Com essa finalidade, polímeros condutores tem sido utilizados para conectar o centro ativo da enzima ao eletrodo (Fig. 1.8). Em geral, este tipo de sensores possui uma sensibilidade elevada, porém com tempos de vida muito curtos, chegando a ser de umas poucas horas com o uso contínuo do sensor. Isto se deve ao fato que a perda de atividade da enzima torna-se muito mais significativa que em outras configurações de biossensores, devido à baixa quantidade de enzima imobilizada.

Outra abordagem para a construção de biossensores de terceira geração é a imobilização de enzimas numa matriz condutora, como por exemplo um polímero condutor [36,37]. Embora a transferência de elétrons direta desde o sítio ativo de uma enzima via poli(pirrol) tenha sido descrita na literatura [38,39] em geral e infelizmente o polímero condutor não participa no processo da transferência de elétrons [40,41]. Isso acontece devido ao fato que o polímero é atacado pelo H_2O_2 gerado na reação enzimática, comprometendo a sua eletroatividade.

Fig.1.8: Enzimas conectadas à superfície do eletrodo utilizando (a) polímeros redox e (b) polímeros conjugados como “fios moleculares”.

A inclusão no polímero de compostos eletroativos como ferroceno [42] ou complexos de ósmio [43] possibilitou a transferência de elétrons, uma vez que os elétrons podem ser transferidos desde o sítio ativo da enzima até o eletrodo através dos grupos redox imobilizados no polímero.

Na Fig. 1.9 é mostrado o esquema de funcionamento dos três tipos de biossensores: primeira, segunda e terceira geração.

Fig.1.9: Esquema de reações envolvendo biossensores de primeira, segunda e terceira geração.

1.4 – Métodos de imobilização:

Para um correto funcionamento do biossensor, o componente biológico deve estar convenientemente unido ao transdutor. Para isso existem vários métodos de imobilização, tais como [4]:

- Adsorção;
- Microencapsulamento;
- Ligação covalente;
- Entrecruzamento; e,
- Oclusão.

1.4.1 – Adsorção

Várias substâncias podem adsorver enzimas sobre suas superfícies, tais como alumina, carvão, celulose, sílica gel, vidro, etc. A adsorção de biomoléculas é o método mais simples de preparação de biossensores, embora a união é muito fraca, o que resulta na perda de material e tempos de vida muito curtos. Geralmente este método é utilizado em trabalhos exploratórios.

No entanto, a adsorção de fosfato sobre ZrO_2 modifica as características da superfície, melhorando a posterior adsorção de biomoléculas sobre a superfície. Este fenômeno foi explorado por Kubota e col. na construção de biossensores [44-46], oferecendo novas perspectivas à imobilização de biomoléculas por adsorção.

1.4.2 – Microencapsulamento

Neste método, o biomaterial é confinado entre membranas. Uma configuração muito utilizada para a construção de biossensores enzimáticos amperométricos é imobilizar a enzima (geralmente uma oxidase) sobre um eletrodo e entre duas membranas [47-50], tal como se mostra na Fig 1.10 .

Fig. 1.10: Representação esquemática de um biossensor amperométrico de duas membranas

Nesta classe de biossensores, o sinal é produzido pela oxidação do H_2O_2 gerado na reação enzimática. A membrana interna está especificamente projetada para permitir o transporte seletivo da espécie geradora do sinal (H_2O_2), evitando a chegada dos interferentes até o eletrodo. A membrana externa, além de confinar a enzima, limita o transporte de substrato até a camada de enzima. Desta maneira, se evita a saturação dos sítios ativos da enzima, ainda para concentrações de substrato onde é observada a saturação da enzima livre. Este efeito é devido a que a membrana produz uma diminuição dos níveis de substrato experimentado pelo micro-ambiente da enzima, o que leva a um aumento no intervalo de comportamento linear do biossensor. Não obstante, este tipo de configuração apresenta o inconveniente de que o complexo padrão de difusão dos reagentes pode resultar num incremento do tempo de resposta do sensor.

A imobilização de enzimas utilizando membranas é muito comum na construção de biossensores potenciométricos [51-54]. Na configuração

mais simples, a enzima é immobilizada em uma membrana sobre um eletrodo de pH (Fig. 1.11)

Fig. 1.11: Representação esquemática da montagem de um biossensor potenciométrico baseado num eletrodo de pH.

Neste caso, a reação enzimática produz uma mudança no pH no microambiente enzimático que é detectado pelo eletrodo de vidro. A vantagem deste tipo de montagem reside na simplicidade da instrumentação associada (só é necessário um pHmetro) e pelo fato da reação enzimática e a detecção ocorrer na mesma interface não apresentando problemas relacionados com os processos de difusão.

1.4.3 – Ligação covalente

Alguns grupos funcionais da enzima, que não sejam essenciais para a atividade catalítica da enzima, podem unir-se a alguma matriz sólida mediante ligações covalentes. As reações tem que ser feitas em condições moderadas de temperatura, baixa força iônica e pH num intervalo fisiológico para evitar a degradação das enzimas a serem immobilizadas. Este

método resulta insuperável em termos do tempo de vida do biossensor devido ao fato que não se produz perda da biomolécula durante a sua utilização; por outro lado, apresenta o inconveniente que a modificação da enzima pode levar a uma queda na atividade catalítica da mesma. A seguir são mostrados alguns métodos utilizados na imobilização de enzimas pelo método de união covalente [4].

a) Método do cianobrometo

b) Método da carboimida

c) Acoplamento de sais de diazônio

d) Pontes dissulfeto

1.4.4 – Entre-cruzamento

Este método utiliza reagentes bifuncionais para unir o biomaterial ao suporte sólido. O glutaraldeído é o agente de entre-cruzamento mais utilizado [55-57] devido ao fato de ser barato e solúvel em água.

Quando preparada uma solução aquosa de glutaraldeído, este polimeriza de acordo ao seguinte mecanismo:

Este polímero de glutaraldeído pode reagir como grupos amino de acordo ao seguinte esquema:

Assim, o glutaraldeído pode-se utilizar para a imobilização de proteínas, onde o polímero de glutaraldeído reagirá com os grupos $-\text{NH}_2$ dos resíduos de aminoácidos da proteína.

O glutaraldeído pode ser utilizado como único agente de imobilização ou pode complementar um outro método. Por exemplo, tem sido demonstrado que a imobilização de enzimas com glutaraldeído numa matriz de poli(pirrol) gerado eletroquimicamente incrementa a vida útil do sensor, uma vez que se produz o entre-cruzamento entre o agente bifuncional e a enzima, no interior da matriz de poli(pirrol) [58].

1.4.5 – Oclusão

Neste método a biomolécula é ocluída num polímero gerado a partir de uma solução que contenha o monômero precursor e a biomolécula a

imobilizar. Os filmes poliméricos podem ser elaborados de diferentes maneiras, tais como “*casting*”, eletropolimerização, “*screen printing*”, etc.

O procedimento de “*casting*” consiste em colocar sobre a superfície em que se deseja depositar o polímero, umas gotas de solução do polímero e deixar evaporar o solvente [59]. A biomolécula pode estar formando parte da solução e, desta maneira, ficaria ocluída dentro do polímero formado durante a evaporação do solvente. Como principal desvantagem do método pode-se citar a dificuldade de se formar filmes homogêneos e reproduíveis.

A oclusão de biomoléculas em polímeros gerados eletroquimicamente envolve a oxidação eletroquímica de um monômero a partir de uma solução que também contenha a biomolécula. Alguns detalhes sobre o mecanismo de eletropolimerização são apresentados mais adiante para o caso específico do poli(pirrol). A imobilização eletroquímica apresenta várias vantagens sobre outros métodos para a construção de biossensores:

- i) O biossensor pode ser elaborado de forma simples, rápida e envolvendo apenas uma etapa;
- ii) O processo permite o controle da quantidade de biomolécula imobilizada, uma vez que pode-se controlar a espessura do filme manipulando a quantidade de carga utilizada durante a polimerização. Em filmes mais grossos ocorre a incorporação de maior quantidade de biomolécula;
- iii) O método outorga resolução espacial, já que o polímero se formará só na superfície eletroativa, o que resulta no confinamento preciso da enzima. Esta propriedade permite a utilização deste método na fabricação de arranjos de microeletrodos enzimáticos;
- iv) Pode-se formar filmes homogêneos e finos, melhorando o tempo de resposta do sensor;

- v) Permite a construção de estruturas tipo multicamadas. Este fato outorga uma grande versatilidade ao método, por exemplo, em cada camada pode-se imobilizar uma enzima diferente levando a um aumento da sensibilidade devido à amplificação do sinal produzido pelo acoplamento de reações enzimáticas. Alternativamente pode-se imobilizar só um tipo de biomolécula numa matriz formada por camadas de diferentes polímeros com o objetivo de modificar a permeabilidade desta matriz e, desta maneira, evitar a entrada de interferentes; e,
- vi) O processo de imobilização perde suas características empíricas e adquire-se maior controle sob a reprodutibilidade do mesmo.

Como consequência de todas estas características, a fabricação de biossensores utilizando polímeros gerados eletroquimicamente tornou-se a técnica mais utilizada [60-61]. A eletropolimerização pode resultar em dois tipos de polímeros: condutores ou não condutores:

A) Polímeros condutores: os polímeros condutores são capazes de conduzir a eletricidade. A condutividade elétrica destes materiais origina-se a partir do sistema de elétrons π conjugados, distribuídos ao longo da cadeia. A interpenetração dos orbitais- π ressonantes de cada resíduo de monômero com seus vizinhos origina bandas de condução. Estes orbitais estendidos são os responsáveis pela mobilidade dos elétrons dentro da cadeia. Devido a sua condutividade, este tipo de polímero pode facilitar a transferência de elétrons entre o biocomponente e a superfície do eletrodo.

Tem se utilizado vários polímeros condutores na construção de biossensores, tais como poli(anilina) [62-63], poli(pirrol) [64-68], pol(N-metilpirrol) [69-70], poli(tiofeno) [71] e poli(indol) [61]. Entre todos estes

polímeros, o poli(pirrol) é o mais utilizado, devido a várias razões, tais como:

- ✓ A oxidação do pirrol ocorre a potenciais relativamente baixos. A utilização de potenciais elevados pode causar a desnaturação das enzimas.
- ✓ O poli(pirrol) pode ser gerado em meio aquoso e pH 7, pelo que resulta compatível com a maioria dos sistemas biológicos.
- ✓ O poli(pirrol) é o polímero condutor mais fácil de se preparar e podem gerar-se filmes autosuportáveis utilizando variadas condições eletroquímicas, tais como a natureza do eletrólito suporte [72].

O pirrol pode ser eletropolimerizado para dar filmes de PPy condutores a potenciais acima de 600 mV vs SCE, dependendo das condições de reação e da superfície do eletrodo. Os métodos mais empregados para formar os filmes são voltametria cíclica e cronoamperometria [73]. A grande vantagem do método potencioestático uma reside no fato da espessura do polímero ser mais facilmente controlada.

Na Fig. 1.12 é mostrado o esquema para o mecanismo de polimerização do pirrol. A primeira etapa envolve a oxidação do monômero I para dar o cátion radical II. Esse cátion radical pode reagir com um segundo cátion radical e dar o dímero III, ou pode reagir com um monômero neutro para, depois de sofrer oxidação, dar também o dímero III. A perda de dois prótons produz então o dímero IV. A posterior oxidação deste dímero, e a repetição das reações de acoplamento resulta na deposição do polímero sobre o eletrodo [73].

Fig 1.12 : Esquema do mecanismo de polimerização do pirrol

Como o poli(pirrol) é depositado na forma oxidada, apresentará uma carga líquida positiva. Este fato exerce um papel fundamental na imobilização das enzimas. Aquelas enzimas que apresentem um ponto isoelétrico (valor de pH ao qual a enzima não apresenta carga líquida) menor que sete, apresentarão carga negativa ao pH em que é realizada a polimerização. Por tanto haverá interações eletrostáticas entre as moléculas de enzima carregadas negativamente e o polímero carregado positivamente. Essas interações exercem um papel fundamental na incorporação das enzimas à matriz polimérica, pois aquelas enzimas que apresentam carga positiva, são incorporadas com maior dificuldade em poli(pirrol).

B) Polímeros não condutores: Refere-se a aqueles polímeros incapazes de conduzir a eletricidade. Quando formados eletroquimicamente, formam filmes muito finos que cobrem a superfície do eletrodo, uma vez que seu crescimento é autolimitante; a polimerização continua até que o eletrodo

fique completamente coberto. Neste ponto a corrente diminui ao mínimo devido à formação de um filme isolante. Espessuras típicas para filmes não condutores crescidos eletroquimicamente são de aproximadamente 10 nm [74]. Entre os polímeros não condutores utilizados na construção de biossensores podemos citar o poli(fenol) [75-76], poli(etacridina) [77], poli(o-fenilendiamina) [78-80], poli(p-fenilendiamina) [81], etc..

Os polímeros não condutores apresentam algumas características interessantes, visando a construção de biossensores. A mais importante é a permselectividade desses polímeros, prevenindo que espécies interferentes cheguem até o eletrodo. Outra característica reside no fato de formar filmes muito finos que melhoram o tempo de resposta do sensor, uma vez que a difusão dos reagentes até alcançar o eletrodo será menos tortuosa. Paradoxalmente, esta característica também se constitui na principal desvantagem da imobilização de enzimas em polímeros não condutores, uma vez que limita a quantidade de proteína que pode ser incluída no filme, reduzindo a sensibilidade e o tempo de vida do sensor. Outra dificuldade encontrada na utilização de polímeros não condutores reside na incompatibilidade de algumas enzimas, tanto com a matriz polimérica como com o micro-ambiente gerado durante a formação do mesmo [82,83].

Outro polímero não condutor utilizado na construção de biossensores é o poli(pirrol) sobreoxidado [84-86]. A sobreoxidação do poli(pirrol) é um processo destrutivo onde o polímero é oxidado até um estado de oxidação maior, no qual é susceptível a ataque nucleofílico [87] e grupos carbonila são introduzidos no esqueleto do polímero [88]. No processo, o polímero sofre a perda da condutividade e apresenta propriedades de permselectividade, uma vez que a alta densidade eletrônica do grupo carbonila atua como uma barreira à entrada de ânions no interior do polímero.

Fig. 1.13: Esquema do mecanismo de sobreoxidação do pol(pirrol)

A utilização do poli(pirrol) sobreoxidado pode solucionar o problema da pouca quantidade de enzima imobilizada em polímeros não condutores, uma vez que pode-se formar o filme até a espessura desejada e depois sobreoxidá-lo, aplicando um potencial elevado.

1.5 – Biossensores para determinação de glicose.

A Diabetes mellitus é um distúrbio metabólico complexo que resulta na incapacidade do organismo em sintetizar a insulina. A primeira manifestação da doença é a perda do controle sobre o nível de glicose no sangue.

A necessidade de controlar o nível normal de glicose em sangue levou ao desenvolvimento de técnicas capazes de medir a concentração de glicose em fluídos biológicos. Estas técnicas devem cumprir uma série de requisitos: devem apresentar resposta rápida; possuir relação sinal-ruído grande; operar no intervalo de concentrações de glicose compreendido no intervalo fisiológico (1-10 mmol L⁻¹) e fundamentalmente devem ser de fácil utilização, de maneira que permitam o controle rotineiro da glicemia

por parte de pessoas não especializadas. Todos estes aspectos transformaram o desenvolvimento de sensores enzimáticos amperométricos para a determinação de glicose num objetivo comercial primário [89]. Isto fez com que os biossensores para glicose tenham sido os mais pesquisados, chegando até à comercialização.

Nesta classe de biossensores o elemento de reconhecimento molecular mais utilizado é a enzima Glicose Oxidase (GOx). Esta enzima cataliza a oxidação de β -D-glicose pelo oxigênio molecular, produzindo gluconolactona e peróxido de hidrogênio. Durante o processo de oxidação da glicose, o co-factor Flavina Adenina Dinucleotido (FAD) é reduzido a FADH₂, seguida pela oxidação do co-factor enzimático pelo oxigênio molecular, com a formação de H₂O₂.

A gluconolactona é hidrolizada em meio aquoso a ácido glucolactônico, sendo que a reação global usualmente é expressa como:

Devido à grande quantidade de trabalhos sobre biossensores de glicose, pode-se encontrar combinações de todos os métodos de imobilização, mecanismos de transferência de elétrons e de transdutores citados nesta introdução. Entre os transdutores eletroquímicos, os amperométricos são mais utilizados que os potenciométricos. Como foi dito anteriormente, o sinal dos sensores potenciométricos é descrito pela equação de Nernst, a qual provê uma relação exponencial entre o sinal

(diferença de potencial) e a concentração do analito. Esse fato pode ser de muita utilidade quando a amplitude das variações de concentração muda em várias ordens de magnitude, tal como acontece nas medidas de pH. Como em fluídos fisiológicos a concentração de glicose varia no máximo em uma ordem de magnitude, pelo que sensores amperométricos, onde o sinal é diretamente proporcional à concentração, apresentam maior sensibilidade.

1.6 – Objetivo do trabalho

Na presente dissertação será apresentado um método alternativo de eletropolimerização, utilizando uma mistura água/etanol como meio, o que permite a incorporação, numa etapa só, de enzima e ferroceno (insolúvel em água) como mediador.

2 – Parte Experimental

2.1 – Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram Glicose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) de *Apergillum niger* 162.000 U/g (Sigma). O pirrol (Aldrich) e o N-metilpirrol (Sigma) foram destilados antes da sua utilização e armazenados em atmosfera de N₂ a -4°C. Glicose (Synth) e KCl (CIRQ) foram de grau analítico e utilizados sem nenhum tratamento prévio.

O Iodeto de trimetil(metilferroceno)amônio (Fc₁I) (Fig 2.1) foi sintetizado pelo grupo do Prof. Dr. Daniel A. Buttry, da Universidade de Wyoming, que gentilmente cedeu-o para nossos estudos [103].

As soluções de glicose permaneceram em repouso por uma noite antes da sua utilização, para se alcançar o equilíbrio mutorrrotacional. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultra-pura (Elga System UHQ, 18 MΩ cm⁻¹).

As soluções comerciais de Nafion (Aldrich) foram diluídas com solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7) até resultar soluções neutras com uma concentração de 0,5 % de Nafion.

2.2 – Modificação dos eletrodos

Utilizaram-se dois tipos de polímeros para a imobilização da enzima Glicose Oxidase, poli(pirrol) e poli(N-metilpirrol). O procedimento consistiu em formar o polímero a partir de uma solução de monômero e enzima.

As deposições eletroquímicas dos monômeros foram feitas numa microcélula (0,2 ml) que consiste num cilindro de Teflon, onde o eletrodo

de trabalho é embutido. Como contraeletrodo utilizou-se um fio de platina e como referência um fio de prata com um depósito de AgCl. Para obter este depósito o fio de prata foi mergulhado numa solução de HCl 0,1 M e polarizado à 1 V durante 10 minutos.

Fig 2.2: Representação esquemática da microcélula utilizada.

2.2.1 – Poli(pirrol)

2.2.1.1 – Biossensor de controle: foi utilizado um eletrodo de platina (1,5 mm de diâmetro, BAS) como substrato. O meio de polimerização foi uma solução aquosa de pirrol 0,05 M, KCl 0,05 M e GOx em diferentes proporções. A polimerização foi feita na microcélula eletroquímica (200 μ l) a potencial constante (0,85 V vs Ag/AgCl).

2.2.1.2 – Biossensor incluindo ferroceno: foi utilizado um eletrodo de platina (1,5 mm diâmetro, BAS) como substrato. O meio de polimerização foi uma suspensão de GOx em H₂O/etanol (1:1) contendo também o monômero e o ferroceno.

Para a preparação da suspensão utilizou-se o seguinte procedimento: por um lado, preparou-se uma solução aquosa de GOx, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e monômero $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e por outro lado, prepararam-se soluções alcoólicas de ferroceno. A seguir misturaram-se partes iguais de ambas soluções, resultando em suspensões de GOx em $\text{H}_2\text{O}/\text{etanol}$ (1:1) contendo KCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ferroceno $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de monômero.

A polimerização foi feita na microcélula eletroquímica a potencial constante ($0,85 \text{ V}$ vs Ag/AgCl).

2.2.1.3 – Biossensor incluindo ferroceno derivatizado solúvel em água: o derivado de ferroceno escolhido foi o Iodeto de (ferrocenmetil)trimetilammonio (Fig 2.1)

Foi utilizado um eletrodo de platina ($1,5 \text{ mm}$ de diâmetro, BAS) como substrato. O meio de polimerização foi uma solução aquosa de pirrol ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$), KCl ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e Fc_1I ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

A polimerização foi feita na microcélula eletroquímica ($0,2 \text{ mL}$) a $0,85 \text{ V}$ vs Ag/AgCl.

2.2.2 – Poli(N-metilpirrol)

2.2.2.1 – Biossensor de controle: foi utilizado um eletrodo de platina (1,5 mm de diâmetro, BAS) como substrato. O meio de polimerização foi uma solução aquosa de N-metilpirrol 0,05 M, KCl 0,05 M e GOx em diferentes proporções. A polimerização foi feita numa microcélula eletroquímica (200 μ l) à potencial constante (0,785 V vs Ag/AgCl).

2.2.2.2 – Biossensor incluindo ferroceno: foi utilizado um eletrodo de platina (1,5 mm diâmetro, BAS) como substrato. O meio de polimerização foi uma suspensão de GOx em H₂O/etanol (1:1) contendo também o monômero e o ferroceno.

Para a preparação da suspensão utilizou-se o seguinte procedimento: por um lado, preparou-se uma solução aquosa de GOx, KCl 0,1 mol L⁻¹ e monômero 0,1 mol L⁻¹, e por outro lado, prepararam-se soluções alcoólicas de ferroceno; a seguir misturaram-se partes iguais de ambas soluções, resultando em suspensões de GOx em H₂O/etanol (1:1) contendo KCl 0,05 mol L⁻¹ ferroceno e N-metilpirrol.

A polimerização foi feita numa microcélula eletroquímica a potencial constante (0,785 V vs Ag/AgCl).

2.3 – Medidas amperométricas

Para estudar a resposta amperométrica dos sensores frente à glicose foi utilizada uma célula eletroquímica convencional de 3 eletrodos e 1 compartimento (5 ml). Como referência utilizou-se um eletrodo Ag/AgCl e como contraeletrodo um fio de platina.

As medidas foram feitas em solução de tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7) agitada e saturado com ar. Para as medições em ausência de

oxigênio, borbulhou-se nitrogênio na solução 15 minutos antes e durante a medição.

Antes das sucessivas adições de glicose, cada sensor foi polarizado ao potencial de trabalho até a corrente de fundo alcançar valores estacionários.

2.4 – Instrumentação

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas num potenciostato AUTOLAB Mod. PGSTAT 30 (Eco Chemie).

Os espectros Raman foram feitos num espectrômetro Renishaw Raman Imaging Microscope System 3000, contendo um microscópio Olympus e um detector CCD (Wright 600×400 píxels) resfriado por Peltier. A radiação excitante foi na região do visível em 632,8 nm com um laser de He-Ne (Spectra Physics Mod. 127).

3 – Resultados e discussões

3.1 - Polimerização do pirrol

O primeiro passo foi construir um biossensor amperométrico de segunda geração para a determinação de glicose, co-imobilizando Glicose Oxidase e ferroceno numa matriz de poli(pirrol) gerado eletroquimicamente. Devido ao ferroceno ser insolúvel em água, o meio de polimerização escolhido foi uma mistura água-etanol. A escolha do meio está fundamentada no fato de ter sido reportada a preparação de suspensões da enzima Glicose Oxidase em misturas água-etanol sem observar-se diminuição nas propriedades catalíticas da enzima [90].

O processo de imobilização consistiu em eletropolimerizar potenciostaticamente o pirrol em uma mistura água-etanol (1:1) contendo a enzima, ferroceno e KCl como eletrólito suporte, polarizando o eletrodo de trabalho a 0,85 V vs Ag/AgCl.

O processo de polimerização mostrou-se menos eficiente que em meio aquoso. A Fig 3.1a mostra o cronoamperograma para a formação de poli(pirrol) em meio aquoso onde pode ser observado o comportamento típico para um processo autocatalítico, no intervalo de tempo estudado. Entretanto, na tentativa de formar o polímero a partir da mistura água-etanol observou-se um comportamento totalmente diferente, havendo um decréscimo da corrente até um valor mínimo (Fig.3.1b), evidenciando uma perda da eletroatividade do polímero formado. Como consequência, foram necessários tempos maiores para a formação do polímero na mistura de água-etanol que para o formado em meio aquoso. Um tempo de aproximadamente 120 s era requerido para se

obter um depósito em água-etanol com uma densidade de carga de 28 mC cm^{-2} , enquanto que para o polímero formado em meio aquoso foram necessários apenas 10 s para a obtenção de um depósito com a mesma densidade de carga (Fig 3.1b).

Fig 3.1: Cronoamperogramas para a polimerização do pirrol a 0,85 V vs Ag/AgCl e utilizando KCl como eletrólito suporte: (a) meio aquoso e (b) mistura de água-etanol 1:1 (v/v).

Com o objetivo de encontrar algum fato relacionado à diminuição da eficiência de polimerização a espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar o polímero formado em misturas água-etanol. Cabe destacar que a formação de poli(pirrol) em soluções alcoólicas não é um fato muito comum, sendo necessária a obtenção de informações acerca das características físicas dos filmes preparados por este método.

Na Fig 3.2 são mostrados os espectros Raman de diferentes eletrodos modificados. Foram feitos espectros do eletrodo recoberto com poli(pirrol) gerado em meio aquoso contendo 0,5 M pirrol e 0,5 M KCl (Fig 3.2a), do eletrodo recoberto com polipirrol gerado em uma solução 0,5 M pirrol e 0,5 M KCl em H₂O/etanol (Fig 3.2b) e do eletrodo recoberto com polipirrol gerado a partir da suspensão de GOx em H₂O/etanol contendo 10 mg GOx/ml, 0,5M pirrol, 0,5 M KCl e 10⁻³ M ferroceno (Fig 3.2c).

Como descrito na literatura [91] filmes de poli(pirrol) preparados a partir de soluções aquosas são menos condutores do que aqueles formados em meio anidro. Numerosos esforços foram realizados na tentativa de relacionar as mudanças produzidas nos espectros Raman com esta perda da condutividade. Liu et al. [91] atribuíram a banda no intervalo de frequências de 1000-1100 cm⁻¹, a deformação no plano da ligação C-H, apresentando um duplete bem definido em 1045 e 1081 cm⁻¹ nos filmes de poli(pirrols) condutores [92] (Fig.3.3). Para filmes menos condutores, a intensidade relativa da banda em 1081 cm⁻¹ diminui e este fato está acompanhado pela também diminuição de intensidade da banda correspondente ao estiramento do esqueleto C=C em 1586 cm⁻¹. Desta maneira, foi concluído que a perda de condutividade poderia ser caracterizada através destas mudanças nos espectros Raman.

Nos resultados obtidos com filmes de poli(pirrol) gerado em meio aquoso (Fig.3.2a), observa-se o duplete em 1045 e 1081 cm^{-1} , porém a última banda com menor intensidade relativa. Este resultado coincide com um da literatura

[93] e é um comportamento típico do poli(pirrol) gerado em meio aquoso.

Um fato interessante é que esta banda em 1081 cm^{-1} quase desaparece para o poli(pirrol) preparado a partir da mistura água/etanol (Fig. 3.2b). Por outro lado, a banda localizada em 1586 cm^{-1} (Fig. 3.2a), torna-se apenas um ombro no espectro da Fig 3.2b. Estes fatos demonstram que a condutividade eletrônica do polímero gerado em água/etanol é menor do que aquela observada para o polímero gerado em meio aquoso, provavelmente como consequência da presença de álcool no meio de polimerização, o que pode provocar ataque nucleofílico nas cadeias poliméricas levando à perda de condutividade do filme. Desta maneira, pode-se explicar a baixa eficiência de polimerização para o poli(pirrol) gerado em água/etanol como consequência da baixa condutividade do polímero formado.

A baixa condutividade do filme polimérico formado não é um fato negativo, considerando que a camada polimérica é formada, e que, como será demonstrado a seguir, o desempenho deste sensor é melhor que o sensor elaborado em meio aquoso. Aparentemente, não é a condutividade do polímero o que vai determinar o desempenho final do biossensor.

Fig. 3.2: Espectros Raman com radiação excitante de 632,8 nm, do eletrodo recoberto com (a) poli(pirrol) gerado em meio aquoso, (b) poli(pirrol) gerado em mistura água/etanol (1:1) e (c) polipirrol gerado em suspensão de GOx em água/etanol contendo pirrol e ferroceno.

Fig. 3.3: Espectro Raman de filme de poli(pirrol) gerado em meio orgânico. Figura tomada da referência [91].

Na Fig 3.2c é mostrado o espectro Raman do biossensor (PPy/GOx/ferroceno). Deve destacar-se a similaridade com o espectro do poli(pirrol) puro, gerado a partir de misturas água-etanol. Este comportamento é devido ao fato de que a radiação excitante utilizada foi $\lambda_o = 632,8$ nm e, as bandas correspondentes ao polímero estão intensificadas pelo efeito Raman ressonante; quanto à GOx e o ferroceno, não se encontram em condição de ressonância. Porém, alguns pontos interessantes deste espectro podem ser destacados, como a definição da banda a 1081 cm^{-1} , embora com uma intensidade relativa menor que observado na Fig 3.2a, e o fato que a banda correspondente a C=C desaparece, mostrando só um ombro estendido na região de 1500 cm^{-1} . Aparentemente, este filme é menos resistivo que o poli(pirrol) formado em água/etanol, provavelmente, devido à presença do ferroceno; porém, este filme continua sendo menos condutor que o poli(pirrol) formado em meio aquoso.

3.2 Resposta do biossensor

Foi elaborado um biossensor co-imobilizando Glicose Oxidase e ferroceno numa matriz de poli(pirrol) gerada eletroquimicamente em uma mistura água-etanol, o qual foi estudado pela resposta amperométrica para glicose. Na Fig 3.4 é mostrada a curva de resposta típica desse biossensor para adições sucessivas de glicose, em tampão fosfato (pH 7; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Cada degrau na corrente é produzido pela adição de glicose e corresponde a um incremento de concentração de 2 mmol L^{-1} . Pode-se observar que, depois de cada agregado de glicose a corrente aumenta rapidamente e se estabiliza após transcorridos aproximadamente 5 segundos.

Com o objetivo de avaliar o desempenho do sensor elaborado por este método, foi construído um segundo sensor, onde o pirrol foi polimerizado em meio aquoso (futuramente nos referimos a ele como “biossensor de controle”) nas mesmas condições de eletropolimerização, tais como potencial, concentração dos reagentes (monômero, enzima e eletrólito suporte) e espessura do polímero obtido, como também as condições utilizadas na detecção amperométrica da glicose. Na Fig 3.5 são mostradas as curvas de calibração para os dois biossensores, obtidas a $0,65 \text{ V}$ vs Ag/AgCl em solução tampão fosfato (pH 7; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$).

Fig. 3.4: Resposta típica do sensor preparado com pirrol, GOx e Ferroceno para adições sucessivas de glicose. Potencial de operação: +0,65 V vs Ag/AgCl. Meio: tampão fosfato (pH 7, 0,1 M) agitado e saturado com ar. Cada patamar corresponde a um incremento de 2 mmol L⁻¹ de glicose.

Fig. 3.5: Curvas de calibração obtidas a 0,65 V, em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7) agitado para o sensor de controle sem ferroceno (a) e para o biossensor com ferroceno (b).

Em ambos casos pôde-se observar um aumento na corrente conforme a concentração de glicose na solução é aumentada, comportando-se linearmente até concentrações de 10 mmol L^{-1} de glicose e tendendo a um valor estacionário para concentrações maiores. Este fato evidencia a participação da enzima na detecção da glicose, uma vez que trata-se de um comportamento típico para reações enzimáticas.

Comparando ambas curvas no intervalo linear num mesmo gráfico pode-se observar claramente que o sensor elaborado a partir da mistura água-etanol apresenta uma maior sensibilidade frente à glicose (Fig.3.6).

Fig 3.6: Curvas analíticas para glicose obtidas com (○) PPy/GOx e com (■) PPy/GOx/Ferroceno, ambos medidos a 0,65 V vs Ag/AgCl.

As sensibilidades obtidas foram de $4,33 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o biossensor preparado a partir da mistura água-etanol contendo o ferroceno e de $0,23 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o sensor de controle.

Este aumento da sensibilidade poderia ser causado por dois fatores: (i) as propriedades do polímero gerado em água-etanol poderiam favorecer o transporte de massa e portanto aumentar a sensibilidade; ou, (ii) o aumento seria causado pela mediação do ferroceno na etapa de transferência de elétrons. Para descobrir o fator preponderante, foi construído um biossensor em água-etanol, mas sem ferroceno. O resultado foi um comportamento similar ao apresentado pelo sensor preparado em água sem ferroceno, uma vez que obtiveram-se sensibilidades em torno de $0,3 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, portanto o incremento na sensibilidade obtida é causado pela presença do ferroceno.

Resta associar o aumento da sensibilidade com a mediação do ferroceno. Para tanto, considera-se primeiro o sensor de controle. Neste caso o sinal amperométrico é produzido pela oxidação sobre o eletrodo do H_2O_2 gerado na reação enzimática (Eq. 1). Essa reação enzimática ocorre preferencialmente na interface polímero-solução, conseqüentemente o H_2O_2 deverá difundir através do polímero até alcançar o eletrodo. Porém, o processo de difusão apresenta comportamento bidirecional, uma vez que o H_2O_2 pode difundir para fora do polímero até o seio da solução, com a conseqüente diminuição do sinal final. Já no caso do sensor com ferroceno, este encontra-se imobilizado na matriz do polímero, e devido à sua baixa solubilidade em água, não poderá difundir para fora da matriz polimérica. Como conseqüência, não haverá nenhuma queda na resposta associada à perda do mediador.

3.3 - Efeito da concentração da enzima

Com o objetivo de otimizar o funcionamento do sensor investigou-se o efeito da concentração de GOx utilizada no meio de polimerização sobre a resposta do biossensor à glicose. Para tal, elaboraram-se filmes a partir de misturas água-etanol contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno e diferentes concentrações da enzima, variando desde 1 até 10 mg mL^{-1} . Todos os filmes foram crescidos até atingirem uma densidade de carga de 26 mC cm^{-2} e as medidas amperométricas obtidas em solução tampão fosfato (pH 7; $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) agitada e saturada em ar, polarizando o eletrodo a $0,65 \text{ mV}$.

A Fig 3.7 mostra as curvas de calibração para glicose obtidas com as diferentes concentrações de enzima utilizadas. Pode-se observar um aumento

progressivo na sensibilidade conforme aumenta-se a concentração de biomolécula presente em solução. Isto indica que o incremento na concentração da enzima no meio de polimerização resulta na imobilização de maior quantidade de biomolécula na matriz do polímero.

Não foi possível experimentar concentrações maiores que 10 mg/ml devido ao modo de preparação da suspensão, pois, num primeiro passo, foi feita uma solução aquosa da enzima cuja concentração é o dobro da concentração final requerida. Esta solução é misturada com a solução alcoólica de ferroceno para dar a suspensão com a proporção de enzima desejada. Não foi possível obter soluções com concentrações maiores que 20 mg/ml, uma vez que não conseguiu-se dissolver completamente a enzima, observando-se a coagulação da proteína. Também não foi possível dissolver a enzima diretamente na mistura H₂O/etanol. Portanto, a concentração ideal é de 10 mg de GOx por mL de suspensão.

A presença da enzima não afetou a formação do polímero, já que não foram observadas mudanças no processo de polimerização na suspensão de enzima em H₂O/etanol em relação ao filme crescido em uma solução de pirrol em H₂O/etanol.

Fig 3.7a: Curvas analíticas para glicose obtidas com sensores preparados com (∇) 1,0 mg mL⁻¹, ($\blacktriangle$) 2,5 mg mL⁻¹, ($\bullet$) 7,5 mg mL⁻¹ e ($\blacksquare$) 10 mg mL⁻¹ de GOx. Todas as curvas foram obtidas a 0,65 mV vs Ag/AgCl em tampão fosfato (pH 7, 0,1 mol L⁻¹).

Fig. 3.7b: Dependência da sensibilidade do sensor com a concentração de enzima

3.4 - Efeito da espessura do filme polimérico na resposta do biossensor.

Prosseguindo com a procura das condições ótimas de preparação do biossensor investigou-se o efeito da espessura do filme polimérico na resposta amperométrica do sensor. Elaboraram-se filmes a partir de misturas água-etanol contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de ferroceno, 10 mg mL^{-1} de GOx e variando a quantidade de carga utilizada na polimerização. As correntes no estado estacionário foram medidas para $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose.

Pode-se observar na Fig 3.8 que a resposta aumenta com o incremento da espessura do filme até alcançar um valor máximo para uma carga de 28 mC cm^{-2} e após isto diminuindo conforme a carga aumenta.

Fig. 3.8: Efeito da espessura do polímero na resposta do biossensor. Todas as medidas foram feitas para $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose em tampão fosfato agitado ($\text{pH } 7$, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) polarizando o eletrodo a $0,65 \text{ mV}$ vs Ag/AgCl.

A resposta amperométrica do biossensor depende de vários fatores, como a quantidade de enzima imobilizada no polímero e do processo de transporte de massa (analito e produtos) através do filme polimérico. O comportamento observado pode ser explicado pelo fato da espessura do polímero afetar estes dois fatores. Por um lado, o aumento da carga permite a incorporação de maior quantidade de enzima, o que se traduz num aumento na resposta; por outro lado, dificulta o transporte de massa, levando a uma queda na resposta. Portanto, chega-se a uma situação de compromisso, onde haverá uma espessura ótima abaixo da qual os fracos sinais são provocados pela escassa quantidade de enzima imobilizada e acima desta, a queda no sinal é provocada pela dificuldade no transporte de massa.

Para o sistema proposto encontrou-se uma espessura do polímero ótima correspondente à passagem de uma densidade de carga de 28 mC cm^{-2} .

3.5 - Efeito do potencial aplicado

Com o objetivo de corroborar o fato do ferroceno estar realmente atuando como mediador na etapa de transdução, foi estudado o efeito do potencial utilizado durante a detecção da glicose. Para isso, foram comparadas as respostas para $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose, do biossensor preparado a partir de água-etanol com ferroceno e do biossensor de controle.

Na Fig. 3.9 é mostrada a dependência da resposta em função do potencial aplicado para o caso do biossensor de controle. Como pode ser observado, a resposta apresenta um máximo a $0,5 \text{ V}$ e diminui tanto para potenciais menos ou mais positivos que este valor.

Fig. 3.9: Efeito do potencial aplicado na resposta do sensor de controle para 5,6 mM de glicose em solução tampão fosfato agitada (pH 7, 0,1 mol L⁻¹).

Fig. 3.10: Efeito do potencial aplicado na resposta do sensor com ferroceno para 5,6 mM de glicose em solução tampão fosfato agitada (0,1 mol L⁻¹, pH 7).

Quando foi estudado o sensor com ferroceno, o comportamento observado foi completamente diferente, uma vez que o sinal aumenta com o incremento do potencial de trabalho e atinge um patamar a partir dos 0,40 V (Fig 3.10). É conhecido na literatura que a inclusão de ferroceno na etapa de transferência de elétrons vê se refletido na diminuição do potencial de detecção [42,101], pelo que o comportamento apresentado torna-se uma clara evidência da participação do ferroceno na etapa de transdução do sinal.

A partir dos resultados obtidos, avaliou-se também o desempenho analítico do biossensor abaixando o potencial de detecção a 0,40 V vs Ag/AgCl. A Fig 3.11 mostra as respostas amperométricas obtidas a 0,40 e 0,65 mV. Para uma melhor visualização, na Fig 3.12a são mostradas as curvas analíticas para o sensor operando em dois potenciais. Pode-se observar uma leve diminuição da sensibilidade ($1,5 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$) com respeito à obtida a 0,65 V, embora sendo muito melhor que para o sensor sem ferroceno, operando a 0,65 V ($0,23 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{L cm}^{-2}$) tal como podem ser observados na Fig. 3.12b.

A possibilidade de trabalhar a potenciais menos positivos implica uma série de vantagens, tais como a diminuição do sinal de fundo e a possibilidade de minimizar a interferência causada pela oxidação direta de substâncias que possam estar presentes em amostras fisiológicas.

Fig. 3.11: Respostas amperométricas frente a glicose para o sensor com ferroceno obtidas a (---) +400 mV e (—) +650 mV. As medidas foram feitas em solução tampão fosfato (pH 7). Cada salto de corrente corresponde a um aumento de 2 mmol L⁻¹ na concentração de glicose.

Fig 3.12a: Sensibilidades do sensor com ferroceno a (●) 0,40 V e (▲) 0,65 V.

Fig 3.12b: Sensibilidades do sensor com ferroceno a (○) 0,40 V e (●) do sensor sem ferroceno a 0,65 V.

Deve-se ressaltar o valor da sensibilidade obtida para o sensor com ferroceno preparado por este método. Se comparamos com sensibilidades obtidas com biossensores que utilizam ferroceno como mediador, obtidas na literatura [42, 101], podemos concluir que nosso método apresenta resultados satisfatórios, especialmente considerando a simplicidade do método proposto.

Katz e col. [101] relataram sensibilidades de aproximadamente $0,75 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ trabalhando a $0,35 \text{ V vs SCE}$; valores similares foram reportados por Foulds e Lowe [42] ($0,625 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$) medindo a $0,3 \text{ V}$. Todos estes biossensores apresentam melhores rendimentos que nosso sensor preparado sem ferroceno mas piores que aquele preparado desde misturas água-etanol. Sensibilidades muito maiores foram obtidas com biossensores preparados imobilizando copolímeros de siloxano modificados com ferroceno e GOx em eletrodos de pasta de carbono [102], mas deve-se considerar que neste caso a quantidade de enzima imobilizada chega até 5 mg .

3.6 - Efeito do oxigênio:

Como já foi discutido na introdução, uma das principais vantagens da utilização de mediadores artificiais reside no fato do biossensor poder trabalhar em meios anaeróbicos, portanto uma prova definitiva e irrefutável da mediação do ferroceno no sensor elaborado com o método aqui apresentado seria justamente a possibilidade de operar na ausência de oxigênio. Para isso estudou-se o efeito do oxigênio na resposta do sensor frente à glicose. Para isto a solução de trabalho foi desaerada borbulhando N_2 por 10 minutos antes

e durante as determinações. Na Fig. 3.13 são mostradas respostas obtidas em meio saturado com ar e em meio desaerado.

Figure 3.13: Respostas amperométricas obtidas a 0,65 V com o sensor com ferroceno em soluções saturadas em N_2 e em ar, em solução tampão fosfato. Cada salto na corrente corresponde a um salto de 2 mmol L^{-1} na concentração de glicose.

Pode observar-se que o sensor operando em meio saturado em ar apresenta uma resposta menor que quando o faz em meio desaerado. Este comportamento pode ser explicado considerando a competição que existe entre o oxigênio e o íon ferrocínio (Fc^+). Quando se produz a oxidação enzimática da glicose à gluconolactona, a enzima se reduz a $\text{GOx}(\text{FADH}_2)$. Na presença de oxigênio, haverá uma competição entre este e o íon ferrocínio pela reoxidação da enzima (Fig. 3.14), com a concomitante diminuição da concentração de ferroceno. Como o ferroceno é oxidado amperometricamente,

uma diminuição na concentração do mediador provocará a queda na resposta final.

Fig 3.14: Representação esquemática da seqüência das reações para a detecção amperométrica de glicose com o ferroceno atuando como mediador. Efeito de competição entre o oxigênio dissolvido e o ferroceno.

Quando foram testados os sensores sem ferroceno em meio desaerado não observou-se nenhuma resposta. Desta forma podemos dizer que outra vantagem do sensor elaborado com ferroceno é a possibilidade de operar em meios anaeróbicos.

3.7 - Influência do eletrólito suporte utilizado na polimerização sobre a resposta do sensor

As propriedades elétricas, mecânicas e morfológicas de polímeros condutores são afetadas pelas condições utilizadas na eletrodeposição, entre elas, a natureza do eletrólito suporte. Estas condições influenciam marcadamente o desempenho analítico do sensor.

Para estudar a influência do eletrólito suporte foram elaborados dois tipos de biossensores imobilizando GOx e ferroceno em poli(pirrol); num caso, o eletrólito suporte foi KCl, e no outro caso, ácido dodecilbenzenossulfônico (DBSA). Este último eletrólito foi escolhido com base a trabalhos da literatura [94] onde é descrita a preparação de filmes de poli(pirrol), utilizando DBSA como eletrólito suporte, com excelente estabilidade e boa resposta eletroquímica. Por outro lado, sendo o DBSA um ânion grande, a morfologia dos filmes será altamente modificada, pelo que é de se esperar alguma mudança no desempenho analítico do biossensor.

Em ambos os casos utilizaram-se eletrodos de platina, de 1,5 mm de diâmetro. Os filmes foram elaborados potenciostaticamente, polarizando os eletrodos a 0,85 V, numa microcélula eletroquímica (200 μL) contendo 0,05 mol L^{-1} de pirrol, 3×10^{-3} mol L^{-1} de ferroceno e 0,05 mol L^{-1} de KCl ou $1,25 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de DBSA, como eletrólito suporte. Todos os filmes foram crescidos até alcançar uma densidade de carga de 28 mC cm^{-2} . As respostas amperométricas foram obtidas em tampão fosfato (pH 7) agitado, polarizando a 0,65 V vs Ag/AgCl.

As respostas frente à glicose foram medidas no intervalo de 2-10 mmol L^{-1} . Para o sensor elaborado com DBSA (Fig 3.15) e para baixas

concentrações de glicose, são observadas correntes maiores que no caso do sensor preparado na presença de KCl (Fig.3.16); porém, atingindo-se rapidamente o valor de velocidade máxima, associada à saturação dos sítios ativos da enzima.

Esta diminuição no intervalo de comportamento linear com a mudança do eletrólito suporte pode estar relacionada a dois fatores:

- (i) Imobilização de menor quantidade de enzima, induzida pela presença do DBSA, devido à competição entre os ânions DBS^- e a enzima negativamente carregada. É conhecido que uma vez dentro da matriz polimérica, os ânions DBS^- não difundem para fora do polímero[94], o que dificultaria a entrada de moléculas de enzima.
- (ii) Aumento da porosidade do filme polimérico, que pode levar ao aumento da concentração de substrato no micro-ambiente da enzima e à saturação dos sítios ativos da mesma.

O fato de se obter sinais maiores para baixas concentrações indicaria que o fator (ii) poderia ser o responsável pelo comportamento observado.

Apesar do sensor preparado na presença de DBSA apresentar uma maior sensibilidade a baixas concentrações, o fato do comportamento linear se estender apenas até 4 mmol L^{-1} é uma severa limitação, uma vez que este tipo de sensores são utilizados no controle da glicemia e que, o nível normal de glicose no sangue é de 4 a 6 mmol L^{-1} .

Considerando estes resultados, a utilização do DBSA não implica nenhuma melhora no desempenho do biossensor o que determinou a continuação dos trabalhos utilizando KCl como eletrólito suporte na etapa de polimerização.

Fig. 3.15: Resposta do sensor elaborado utilizando DBSA como eletrólito suporte para adições sucessivas de glicose. Potencial de trabalho: 0,65 V. Meio: solução tampão fosfato (pH 7) agitado. Cada patamar corresponde ao aumento de 2 mmol L^{-1} na concentração de glicose.

Fig. 3.16: Resposta do sensor elaborado utilizando KCl como eletrólito suporte para adições sucessivas de glicose. Potencial de trabalho: 0,65 V. Meio: solução tampão fosfato (pH 7) agitado. Cada patamar corresponde ao aumento de 2 mmol L^{-1} na concentração de glicose.

3.8 - Construção de um biossensor contendo ferroceno modificado solúvel em água.

A possibilidade de incorporar um mediador artificial sem a necessidade de utilizar álcool na etapa de polimerização apresenta uma alternativa atraente, fundamentalmente devido à simplicidade da construção do sensor nestas condições. Como esse objetivo foi preparado um biossensor imobilizando GOx numa matriz de poli(pirrol) gerado eletroquimicamente a partir de meio aquoso, utilizando como mediador um derivado de ferroceno solúvel em água.

O composto utilizado foi o seguinte :

Iodeto de trimetil(metilferroceno)amônio (Fc₁I)

Este reagente foi sintetizado pelo grupo do Dr. Daniel A. Buttry, da Universidade de Wyoming, que gentilmente cedeu os reagentes para os estudos descritos nesta dissertação.

Para sua modificação, o eletrodo foi colocado numa microcélula eletroquímica contendo 200 μ L de solução aquosa de pirrol (0,05 mol L⁻¹), KCl (0,05 mol L⁻¹) e Fc₁I (1 $\times$ 10⁻³ mol L⁻¹). O eletrodo de trabalho foi

polarizado a 0,85 V até se obter filmes com uma carga depositada de 28 mC cm⁻².

Fig. 3.17: Resposta do sensor elaborado utilizando Fc_1I , para adições sucessivas de glicose. Potencial de trabalho : 0,65 V. Meio: solução tampão fosfato (pH 7) agitado.

O desempenho do sensor frente à glicose (Fig.3.17) foi inferior ao apresentado pelo sensor com Fc preparado a partir de misturas água/etanol. A sensibilidade obtida para o biossensor com Fc_1I foi 0,54 mA mmol⁻¹ L cm⁻², da mesma ordem que o biossensor sem ferroceno (0,23 mA mmol⁻¹ L cm⁻², seção 3.2, pag. 46) e inferior a sensibilidade do sensor com Fc elaborado em mistura água/etanol (4,33 mA mmol⁻¹ L cm⁻²), demonstrando a vantagem da co-imobilização de GOx e Fc a partir de misturas de água/etanol. Faz-se necessário destacar que as correntes absolutas obtidas com o sensor com Fc_1I são maiores que para o sensor com Fc; porém, a sensibilidade (dada pelo

coeficiente angular da curva analítica) é menor. Este comportamento é devido ao fato do sensor com Fc_1I apresentar correntes de fundo maiores. Este fato reforça as conclusões anteriores de que a condutividade do polímero utilizado na construção do biossensor não é um parâmetro determinante da sensibilidade do mesmo e que o ferroceno é o real responsável pelas elevadas sensibilidades obtidas para os sensores elaborados com poli(pirrol) gerado em misturas água-etanol.

3.9 - Efeito do interferentes. O Nafion[®] como membrana permseletiva.

A principal desvantagem dos sensores amperométricos de glicose é a possibilidade de que espécies presentes nas amostras a analisar, tais como ascorbato e ureato, se oxidem diretamente sobre o eletrodo, acabando com a especificidade própria do método de reconhecimento biomolecular.

Como foi mostrado anteriormente, a inclusão do ferroceno possibilita a utilização do biossensor a 0,40 V em lugar de 0,65 V, como é no caso dos sensores que utilizam a oxidação do H_2O_2 como gerador do sinal amperométrico. Infelizmente, essa diminuição no potencial de detecção não foi suficiente para impedir as interferências causadas pelos íons ascorbato e ureato. Com a finalidade de evitar estas interferências pensou-se na utilização do Nafion[®], uma vez que vários trabalhos publicados mostraram a efetividade deste material para a eliminação da interferência causada pelos ânions já mencionados [95-98]. O Nafion é um polímero polianiónico (Fig.3.18) comercialmente disponível que apresenta propriedades de troca iônica, sendo

capaz de trocar cátions com a solução impedindo o transporte de ânions, sendo esta última propriedade o que o torna útil na construção de biossensores.

Fig 3.18: Estrutura do Nafion.

O procedimento consistiu em preparar o biossensor imobilizando GOx e ferroceno em poli(pirrol) gerado em água-etanol com o procedimento apresentado, sobre o qual foi depositado uma camada de Nafion[®]. Para isso foi colocado sobre o eletrodo uma gota de solução de Nafion[®] (0,5 %, pH 7) deixando evaporar o solvente. Depois foi estudada a resposta do sensor frente a 1 mmol L⁻¹ de glicose em presença dos interferentes em seus máximos fisiológicos. Na Fig 3.19 são mostradas as respostas do sensor sem Nafion. Pode-se ver o aumento no valor da corrente estacionária quando são adicionados os interferentes. Para o caso do sensor recoberto com Nafion[®], não foi observada nenhuma modificação no sinal depois da adição dos interferentes, tal como mostra a Fig. 3.20.

Fig. 3.19: Resposta do biosensor sem Nafion para (—) 1 mmol L^{-1} de glicose, (—) $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose + $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ascorbato e (—) $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose + $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ascorbato + $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureato.

Fig 3.20: Resposta do biossensor com Nafion para (—) 1 mmol L^{-1} de glicose, (—) $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose + $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ascorbato e (—) $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ glicose + $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ascorbato + $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de ureato.

Na tabela 1 são mostrados os níveis de interferência para ambos sensores. Embora o Nafion[®] tenha-se mostrado totalmente efetivo para a eliminação dos interferentes, apresentou uma severa limitação, uma vez que provoca uma marcada queda na sensibilidade do sensor frente à glicose, provavelmente devido ao fato de dificultar o transporte da glicose até os sítios ativos da enzima.

Tabela 1: Influência dos interferentes na resposta à glicose em tampão fosfato pH=7

Interferente	Conc. Fisiológica (mmol L ⁻¹)	$i_{G+I} / i_G^{(1)}$	
		PPy-GOD	PPy-GOD/Nafion [®]
Ac. ascórbico	1	2.25	1.00
Ac. úrico	.5	6.64	1.07

⁽¹⁾ i_G : resposta de glicose (1mmol L⁻¹), i_{G+I} : resposta de glicose (1mmol L⁻¹) em presença de interferentes no máximo fisiológico.

3.10 - Sobreoxidação do poli(pirrol). Efeito sobre o desempenho do biossensor.

Como descrito na introdução, o poli(pirrol) sobreoxidado apresenta a característica de ser impermeável a ânions. Considerando este fato, foi examinado o comportamento dos sensores elaborados, depois de produzida a sobreoxidação da matriz polimérica de poli(pirrol).

O primeiro passo foi corroborar as propriedades de exclusão de ânions do poli(pirrol) sobreoxidado (PPyO). Para isto, foram registrados voltamogramas cíclicos com o eletrodo não modificado e do eletrodo recoberto com poli(pirrol) sobreoxidado em soluções de ascorbato e ureato. A sobreoxidação dos filmes de poli(pirrol) foi feita potenciostaticamente, em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7), polarizando a 1,4 V durante 20 minutos.

As figuras 3.21 e 3.22 mostram os voltamogramas de ascorbato e ureato sobre o eletrodo nu e sobre o eletrodo recoberto com PPyO, onde pode-se observar o desaparecimento dos picos correspondentes a oxidação dos analitos quando utilizado o eletrodo recoberto com PPyO.

Fig. 3.21: Voltamogramas cíclicos registrados em solução de ureato, com o eletrodo de platina (—), e sobre o eletrodo de platina recoberto com poli(pirrol) sobreoxidado (—).

Fig. 3.22: Voltamogramas cíclicos registrados em solução de ascorbato, com o eletrodo de platina (—), e sobre o eletrodo de platina recoberto com poli(pirrol) sobreoxidado (—).

O mesmo procedimento de sobreoxidação do pirrol foi aplicado aos três tipos de sensores: (a) PPy/GOx, (b) PPy/GOx/Fc e (c) PPy/GOx/Fc₁I.

Depois do tratamento, o eletrodo PPy/GOx não mostrou atividade alguma frente à glicose, contrariamente aos resultados encontrados na literatura, onde os sensores de poli(pirrol) apresentam atividade logo após a sobreoxidação [99]. A diferença encontra-se no fato que os autores do trabalho anteriormente citado, realizaram a sobreoxidação a 0,7 V vs SCE, empregando não menos de 6 horas até o processo ser considerado completo; enquanto que, no presente trabalho, polarizou-se a 1,4 V durante 20 minutos. A ausência de atividade após o tratamento pode ser atribuída ao fato que neste potencial esteja ocorrendo a desnaturação da enzima. Esta desnaturação pode ser

provocada por vários fatores, tais como: descarga do eletrólito; mudança do pH no microambiente da enzima, ou talvez, reações químicas entre a enzima e os grupos carbonila que aparecem durante a sobreoxidação do polímero.

Foi observado um resultado surpreendente com os sensores contendo os mediadores artificiais. Tanto o sensor com Fc, como assim também o sensor com Fc_1I , apresentaram atividade após da sobreoxidação do polímero a 1,4 V (Fig.3.23).

Fig. 3.23: Resposta amperométrica frente à glicose do sensor com Fc_1I como mediador, depois da sobreoxidação do poli(pirrol).

Considerando a hipótese apresentada para a sobreoxidação do polímero no caso do sensor sem mediadores artificiais, de que a exposição a potenciais elevados pode levar à perda da atividade catalítica da enzima, uma possível

explicação para a atividade mostrada pelos sensores com Fc e Fc₁I poderia ser a oxidação direta da glicose e mediada pelo ferroceno. Desta forma, foi elaborado um eletrodo modificado, polimerizando pirrol nas mesmas condições que as utilizadas para a preparação do biossensor, mas na ausência da enzima. Não se observou resposta amperométrica frente à glicose, concluindo-se que a resposta amperométrica registrada com os eletrodos PPyO/GOx/Fc e PPyO/GOx/Fc₁I são provenientes da oxidação enzimática da glicose. Aparentemente, a presença do ferroceno, evitaria a perda total de atividade enzimática.

3.11 - Estabilidade dos sensores: Fc vs Fc₁I.

A estabilidade dos sensores enzimáticos usualmente é limitada pela desnaturação e perda da enzima. No caso de biossensores que incluem mediadores artificiais solúveis em água, a perda do mesmo pode ser outra causa da diminuição da resposta do sensor após medidas sucessivas. Por esta razão foi estudada a estabilidade dos biossensores contendo Fc e Fc₁I com a intenção de observar se apresentam comportamentos diferentes. Os eletrodos foram armazenados em tampão fosfato a 4°C e a resposta medida frente à 5,6 mmol L⁻¹ de glicose. Os resultados estão mostrados na Fig 3.24.

Estudos prévios da estabilidade de sensores enzimáticos baseados em GOx imobilizada em poli(pirrol) tem demonstrado que a resposta do sensor se estabiliza após a perda de sinal durante os primeiros dias de funcionamento [100]. Esta queda na resposta é atribuída à perda de parte da enzima imobilizada. Pode-se observar que o biossensor com Fc apresenta este comportamento, enquanto que o sensor com Fc₁I apresenta uma perda

progressiva da resposta, não atingindo a estabilidade. Uma possível explicação destes resultados poderia ser que, devido à solubilidade em água do Fc_1I , ocorre uma perda progressiva do mediador. Este fato apresenta outra vantagem da imobilização de GOx numa matriz de poli(pirrol), gerado desde uma mistura água/etanol contendo também Fc, sobre a formação do sensor desde meio aquoso.

Fig. 3.24: Estabilidade dos sensores. Respostas medidas para $5,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose (●) Sensor com Fc; (■) Sensor com Fc_1I

Não foi possível estender o estudo por mais dias, pois a partir do décimo dia, observou-se um abrupto incremento do ruído do sinal (Fig.3.25), tanto para o sensor com Fc como para o sensor com Fc_1I . Este comportamento pode ser provocado pelo encharcamento do polímero pelo eletrólito, o que leva à perda de contato elétrico produzido pelo descolamento do polímero.

Os estudos de estabilidade foram repetidos armazenando os sensores a 4°C ao ar, evitando o contato com a solução tampão. Infelizmente, esses

sensores não mostraram nenhuma atividade após o segundo dia, demonstrando que apesar do encharcamento causado pelo contato com a solução tampão, o armazenamento dos eletrodos submergindo-os em solução tampão se apresenta como a melhor escolha.

Fig. 3.25: Evolução do ruído no sinal amperométrico do sensor. (—) Primeiro dia; (—) Decimo dia

3.12 - Polimerização do N-metilpirrol

Os resultados obtidos com a polimerização de pirrol em água-etanol demonstraram que pode ser elaborado um sensor que apresente boa sensibilidade e tempos de resposta baixos, produto da imobilização de ferroceno e da possibilidade de elaborar o sensor utilizando filmes muito finos. Com a intenção de avaliar se o método apresenta alguma utilidade com outro tipo de polímero foi estudada a elaboração de um biossensor trocando o poli(pirrol) por poli(N-metilpirrol).

A princípio, tentou-se elaborar um sensor imobilizando GOx numa matriz de poli(N-metilpirrol), com o mesmo método utilizado com o pirrol. Um eletrodo de platina de 1,5 mm de diâmetro foi mergulhado numa mistura água/etanol (1:1) contendo N-metilpirrol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, Fc $3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 10 mg de GOx por mL de suspensão, e polarizado a 0,85 V vs Ag/AgCl. Ao estudar o comportamento do sensor frente a glicose (a 0,65 V vs Ag/AgCl), não foi observada resposta alguma. Repetiu-se a operação, desta vez polarizando a 0,785 V vs Ag/Ag/Cl para a eletrodeposição do poli(N-metilpirrol), e o sensor mostrou a resposta típica frente à glicose (Fig. 3.26). Este comportamento é devido ao fato de que a um potencial de 0,85 V, se produz a sobreoxidação do N-metilpirrol, resultando num polímero isolante, autolimitando seu crescimento e sendo incapaz de imobilizar suficiente quantidade de enzima para que o sensor funcione.

Fig 3.26: Resposta amperométrica do sensor preparado com N-metilpirrol a 650 mV (—) e a 500 mV (—). Meio: tampão fosfato (pH 7) agitado e saturado em ar.

Uma investigação quanto ao efeito da espessura do filme de poli(N-metilpirrol) sobre a resposta do sensor, foi realizada. Os sensores foram feitos a 0,785 V vs Ag/AgCl, no mesmo intervalo de densidades de carga que as utilizadas para o caso do poli(pirrol), de 11 até 56 mC cm⁻². Cabe ressaltar que no caso do sensor elaborado com poli(pirrol) observou-se um valor de espessura ótima, correspondente a uma densidade de carga de 17 mC cm⁻², sendo este o comportamento típico, como já foi oportunamente explicado. A Fig.3.27 mostra a dependência da resposta do sensor elaborado com poli(N-metilpirrol) com a espessura do filme, medida para 5,6 mmol L⁻¹ de glicose. Pode-se observar que não existe decaimento na resposta para filmes crescidos até 56 mC cm⁻². Os estudos não puderam estender-se além deste valor, devido à baixa eficiência de polimerização exibida pelo N-metilpirrol. Para a passagem de 56 mC cm⁻², precisaram-se de tempos de aproximadamente duas horas, após o qual a corrente sofre uma queda a valores muito pequenos, impedindo a formação de filmes mais espessos.

Foi medida a resposta amperométrica do sensor preparado em solução tampão fosfato (pH 7) a 0,65 e 0,50 V vs Ag/AgCl. Como é mostrado na Fig.3.26, as respostas obtidas em ambos casos foram as mesmas, fato que confirma a presença do Fc na etapa de mediação. Com objetivo de comparação, foi feito um biossensor nas mesmas condições, água/etanol (1:1), 0,05 mol L⁻¹ de N-metilpirrol de 0,05 mol L⁻¹ de KCl, mas sem o ferroceno. A Fig.3.28 mostra as curvas de calibração para ambos sensores, com e sem ferroceno. Da mesma forma que no caso do sensor elaborado com pirrol, o aumento da sensibilidade do sensor com ferroceno com relação ao sem mediador, evidencia a participação do ferroceno na etapa de transdução do sinal.

Fig. 3.27: Efeito da quantidade de poli(*N*-metilpirrol) depositado de na resposta do sensor para 5,6 mM de glicose em solução fosfato (pH 7).

Fig. 3.28: Comparação das sensibilidades obtidas para o sensor elaborado com poli(*N*-metilpirrol), (●) sensor incluindo ferroceno; e, (○) sensor sem ferroceno. Potencial de operação: 0,65 V. Quantidade de carga depositada: 57 mC cm⁻².

O sensor elaborado com N-metilpirrol apresenta maior sensibilidade que o sensor com pirrol ($9,03 \text{ mA mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o sensor com N-metilpirrol e $4,33 \text{ mA mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-2}$ para o sensor com pirrol). A explicação para este fenômeno está relacionada com o fato de, no caso da utilização do N-metilpirrol, ser possível a elaboração de um filme polimérico mais espesso, porém sem observar nenhuma diminuição na resposta causada pelo transporte de massa.

Estudou-se também, o efeito no sinal amperométrico final da concentração de enzima utilizada na suspensão de polimerização. Todos os filmes foram feitos até uma espessura de 57 mC cm^{-2} . A Fig.3.29. mostra as curvas de calibração frente à glicose para sensores elaborados com distintas quantidades de enzima. Pode-se observar um aumento progressivo na sensibilidade conforme aumenta a concentração de enzima utilizada. Da mesma maneira, e como foi mostrado oportunamente para o caso do sensor elaborado com pirrol, não foi possível experimentar concentrações maiores que 10 mg mL^{-1} ,. Por este motivo, todos os biossensores foram feitos utilizando 10 mg L^{-1} de GOx.

Fig. 3.29: Curvas analíticas para o sensor com poli(*N*-metilpirrol), preparados com: (■) 2,5 mg mL⁻¹, (●) 5,0 mg mL⁻¹, (▲) 7,5 mg mL⁻¹ e, (◆) 10,0 mg mL⁻¹ de GOx.

4 - Conclusões.

Na presente dissertação, foi apresentado um método simples que permite a elaboração de um biossensor amperométrico para a determinação de glicose, imobilizando a enzima Glicose Oxidase em matrizes de poli(pirrol) e poli(N-metilpirrol), incluindo ferroceno como mediador no processo de transferência de elétrons desde a enzima até o eletrodo, sem a necessidade de modificar quimicamente o monômero ou a enzima para tal finalidade.

A inclusão do ferroceno se traduz em um incremento da sensibilidade à glicose com respeito ao sensor elaborado sem ferroceno. Foram obtidas sensibilidades de $4,33 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o biossensor preparado a partir da mistura água-etanol contendo o ferroceno e de $0,23 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ para o sensor de controle. A inclusão do ferroceno no biossensor permitiu também a diminuição do potencial de detecção em 250 mV, sem perda significativa da sensibilidade. Estes sensores mostraram faixa linear de resposta entre 0 e 10 mmol L^{-1} de glicose.

A eletropolimerização do pirrol em misturas água-etanol mostrou-se menos eficiente que quando o processo é realizado em meio aquoso. Os estudos de espectroscopia Raman permitiram estabelecer que a causa desta baixa eficiência do processo de polimerização é a perda de eletroatividade do polímero. Por outro lado, essa diminuição de eletroatividade da matriz polimérica não é um fator determinante na sensibilidade exibida pelo biossensor, uma vez que o sensor elaborado em água-etanol apresenta maiores sensibilidades que aqueles elaborados em meio aquoso e também que aqueles que incluem ferroceno solúveis em água como mediador.

A utilização de DBSA como eletrólito suporte para a eletropolimerização do pirrol introduz uma severa limitação no desempenho final do biossensor, uma vez que produz uma diminuição em seu intervalo de resposta linear.

Os estudos da estabilidade dos sensores elaborados com Fc e Fc₁I mostraram outra vantagem da construção do sensor a partir de misturas água-etanol, já que o sensor que utiliza Fc₁I como mediador sofre uma queda na resposta, após sucessivas medidas, mais acentuada que para o sensor elaborado com Fc, provocada pela perda do Fc₁I solúvel em água.

A diminuição em 250 mV no potencial de operação do sensor não foi suficiente para a eliminação de interferências causadas pelos íons ascorbato e ureato. O recobrimento do sensor com uma membrana de Nafion[®] mostrou-se 100% efetiva na eliminação dessas interferências, no entanto, provocou uma considerável perda de sensibilidade provavelmente causada pelo transporte de massa ser dificultado pela membrana adicional.

O método pode ser utilizado com N-metilpirrol. Neste caso, é possível a formação de filmes mais espessos que no caso do pirrol sem queda na resposta do sensor à glicose, o que permite a incorporação de maior quantidade de enzima, resultando numa maior sensibilidade que os sensores formados com pirrol.

5 – Referências.

1. Janata, J.; Bezegh, A. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 62R.
2. Ricco, A. J.; Crooks, R.M.; Janata J. *Interface* **1998**, 18.
3. Brett, A.M.O.; Brett C.M.A. in *Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Oxford Univerity Press, Oxford, 1993.
4. Eggins, B. in *Biosensors "An Introduction"*; Ed. Wiley , 1996.
5. Clark, L.C.; Lyons, C. *Am. N Y Acad. Sci.* **1962**, 102, 29.
6. Da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho, O. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 366, 111.
7. Da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho O. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 398, 145.
8. Da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho O. *Talanta* **1998**, 46, 559.
9. Da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho O. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 399, 287.
10. Da Cruz Vieira, I.; Fatibello-Filho O. *Talanta* **2000**, 52, 681.
11. Sethi, R.S. *Biosens. Bioelec.* **1994**, 9, 243.
12. Umaña, M.; Waller, J. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2979.
13. Hajizadeh, K.; Halsall, H.B.; Heineman, W. R. *Talanta* **1991**, 38, 37.
14. Ito, N; Matsumoto, T.; Fujiwara, H; Matsumoto, Y, Kayashima, S.; Arai, T.; Kikuchi, M.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta* **1995**, 312, 323.
15. Cosnier, S.; Innocent, C.; Allien, S.; Poitry, S.; Tsacopoulos, M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 968.
16. Cosnier, S.; Innocent, C. *Anal. Lett.* **1994**, 27, 1429.
17. Haemmerli, S.D.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G. *Anal. Lett.* **1990**, 23, 577.
18. Dzyadevich, S.V.; Sergei, V.; Arkhipova, V.N.; Soldatkin, A.P.; El'skaya, A.V.; Shul'ga, A.A. *Anal. Chim. Acta.* **1998**, 374, 11.
19. Jaffari, S.A.; Pickup, J.C. *Biosens. Bioelec.* **1996**, 11, 1167

-
20. Cass, A.E.G.; Davis, G.; Francis, G.D.; Hill, A. O.; Aston, W.J.; Higgins, I.; Plotkin, E.V.; Scott, L.D.L.; Turner, A.P.F. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 667.
 21. Lange, M.A.; Chambers, J.Q. *J. Anal. Chim. Acta* **1985**, *175*, 89.
 22. Iwakura, C.; Kajiva, Y.; Yoneyama, H.J. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *261*, 351.
 23. Schläpfer, P.; Mindt, W.; Racine, Ph. *Clin. Chim. Acta.* **1974**, *57*, 283.
 24. Cass, A.E.G.; Davis, G.; Green, M.J.; Hill, H.A.O. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *190*, 117.
 25. Yokoyama, K.; Tamiya, E.; Karube, I. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *273*, 107.
 26. Kulys, J.; Cenas, N.K. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *744*, 57.
 27. Koudelka, M.; Germet, S.; De Rooij, N.F. *Sens. Actuators B* **1989**, *18*, 157.
 28. Thornton, A.J.; Brown, D.E. *Biotechnol. Tech.* **1991**, *5*, 363.
 29. Battaglini, F.; Calvo, E.J. *J. Chem. Faraday Trans* **1994**, *90*, 987.
 30. Kulys, J.; Schummann, W.; Schmidt, H.L. *Anal. Lett.* **1992**, *25*, 1011.
 31. Kacanivic, V.; Johanson, K.; Marko-Varga, G.; Gorton, L.; Jönsson-Petterson, G.; Csöregi, E. *Electroanalysis* **1994**, *6*, 381.
 32. Hedenmo, M.; Narvaez, A.; Dominguez, E.; Katakis, I. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *425*, 1.
 33. Iwakura, C.; Kajiva, Y.; Yoneyama, H.J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1988**, 1019.
 34. Eddowes, M.S.; Hill, H.A.O.; Vosaki, K. *J. Electroanal. Chem.* **1980**, *116*, 527.
 35. Ye, L.; Hämmerle, M.; Olsthoorn, J.J.; Schummann, W.; Schmidt, H.-L., Duine, J.A.; Heller, A. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 238.

-
36. Bartlett, P.N.; Birkin, P.R.; Palmisano, F.; De Benedetto, G. *J. Chem. Faraday Trans.* **1996**, *92*, 3123.
 37. Vanos, P.J.H.J.; Bult, A.; Coopal, C.G.J.; Vanbennekem, W.P. *Anal. Chim. Acta* **1996**, *335*, 209.
 38. Koopal, C.G.J.; Feiters, M.C.; Nolte, R.J.M.; Derutier, B.; Schasfoort, R.B.M.; Czajka, R.; Vankampen, H. *Synth. Met.* **1992**, *51*, 397.
 39. Koopal, C.G.J.; Feiters, M.C.; Nolte, R.J.M.; Derutier, B.; Schasfoort, R.B.M. *Biosens. Bioel.* **1992**, *7*, 461.
 40. Belanger, D.; Nadreau, J.; Fortier, G. *J. Electroanal. Chem.* **1989**, *274*, 143.
 41. Fortier, G.; Brassard, E.; Belanger, D. *Biosens. Bioelec.* **1990**, *5*, 473.
 42. Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2473.
 43. Schumann, W.; Kranz, C.; Huber, J.; Wohlschäguier, H. *Synth. Met.* **1993**, *61*, 31.
 44. Pessoa, C.A.; Gushikem, Y.; Kubota, L.T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *431*, 23.
 45. Munteanu, F. D.; Kubota, L.T.; Gorton, L. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *509*, 2.
 46. Kubota, L.T.; Gorton, L.; Roddick-Lanzilotta, A.; McQuillan, A.J. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, *47*, 39.
 47. Higson, S.P.J.; Vadgama, P.M. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *271*, 125.
 48. Tang, L.X.; Koochaki, Z.B.; Vadgama, P.M. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *132*, 357.
 49. Reddy, S.M., Vadgama, P.M. *Anal. Chim. Acta.* **1997**, *343*, 59.
 50. Reddy, S.M., Vadgama, P.M. *Biosens. Bioelec.* **1997**, *12*, 1003.
 51. Al-Hitti I.K.; Moody, G.J.; Thomas, J.D.R. *Analyst* **1984**, *109*, 1205.

-
52. Alva, Sh.; Gupta, S.S.; Phadke, R.S.; Govil, G. *Biosens. Bioelec.* **1991**, *6*, 663.
 53. Napy, G.; Storp, L.H.V.; Guilbault, G.G. *Anal. Chim. Acta* **1973**, *66*, 443.
 54. Merkoçi, A.; Fàbregas, E.; Alegret, G.G. *Sens. Actuators B* **1999**, *60*, 97.
 55. Jayakrisham, A.; Jameela, S.R. *Biomaterials* **1996**, *17*, 471.
 56. Kubawata, S.; Okamoto, T.; Kajiya, Y.; Yoneyama, H. *Anal. Chem.* **67**, 1995, 1684.
 57. Khan, G.F.; Wernet, W. *J. Electrochem. Soc.* **1996**, *143*, 3336.
 58. Júnior, L.R.; Oliveira Neto, G.; Fernandes, J.R.; Kubota, L.T. *Talanta* **2000**, *51*, 547.
 59. Wang, J.; Leech, D.; Ozsoz, M.; Martinez, S.; Smyth, M.R. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *245*, 139.
 60. Bartlett, P.N.; Birkin, P.R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 118.
 61. Bartlett, P.N.; Cooper, J.M. *J. Electroanal. Chem.* **1993**, *362*, 1.
 62. Shaolin, M.; Huaiguo, X.; Jianbing, Z. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *304*, 7.
 63. Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *Biosensors*, **1987/88**, *3*, 359.
 64. Kajiya, Y.; Sugai, H.; Iwakura, C. Yoneyama, H. *Anal. Chem.* **1992**, *63*, 49.
 65. Belánger, D.; Nadreu, J.; Fortier, G. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 933.
 66. Schumann, W. *Sens. Actuators B* **1991**, *4*, 41.
 67. Trojanowicz, M.; Matuszewsky, W.; Podsiddla, M. *Biosens. Bioelectron.* **1990**, *5*, 149.
 68. Cosnier, S.; Stoytcheva, M. Senillou, A.; Perrot, H.; Furriel, R.P.M.; Leone, F.A. *Anal. Chem.* **1999**, *5*, 3692.
 69. Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *224*, 37.

-
70. Taxis du Poet, P.D.; Miyamoto, S.; Murukami, T.; Kinura, J.; Karube, I. *Anal. Chim. Acta.* **1990**, *235*, 255.
 71. Genier, E.M.; Marchesiello, M. *Synth. Met.* **1993**, *57*, 3677.
 72. Walton, D.; Lorimer, P. **Polymers**, *Oxford University Press*, Oxford 2000.
 73. Chandler, G.K.; Pletcher, D. *Electrochemistry* **1985**, *10*, 117.
 74. Emr, S.A.; Yacynych, A.M. *Electroanalysis* **1995**, *7*, 913.
 75. Bartlett, P.N.; Caruana, D.J. *Analyst* **1992**, *117*, 1287.
 76. Bartlett, P.N.; Tebutt, P. Tyrell, C.H. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 138.
 77. Xu, J/J.; Chen, X.Y. *Anal. Chim. Acta.* **2000**, *423*, 101.
 78. Sasso, S.V.; Pierce, R.J.; Walla, R.; Yacynych, A.M. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1111.
 79. Malitesta, C.; Palmisano, F.; Torsi, L.; Zambonin, P.G. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2735.
 80. Wang, J.; Chen, L.; Liu, J.; Lu, F. *Electroanalysis* **1996**, *8*, 1127.
 81. Xu, J.J.; Chen, H.Y. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 221.
 82. Pantano, P.; Kuhr, W.G. *Electroanalysis* **1995**, *7*, 405.
 83. Palmisano, F.; Guerrieri, A.; Quinto, M.; Zambonin, P.G. *Anal. Chem.* **1995**, *34*, 1005.
 84. Centonze, D.; Guerrieri, A.; Malitetsta, C. Palmisano, F.; Zambonin, P.G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, *342*, 729.
 85. Palmisano, F.; Centonze, D.; Guerrieri, A.; Zambonin, P.G. *Biosens. Bioelec.* **1993**, *8*, 393.
 86. Guerrieri, A.; De Benedetto, G.E.; Palmisano, F.; Zambonin, P.G. *Biosens. Bioelec.* **1998**, *13*, 103.
 87. Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* **1986**, *82*, 1259

-
88. Palmisano, F.; Centonze, P.; Guerrieri, A. *Biosens. Bioelec.* **1993**, 8, 393.
 89. Wilkins, E.; Antanasov, P. *Med. Eng. Phys* **1996**, 18, 273.
 90. Lukachova, L.V.; Karyakin, A.A.; Karyakina, E.E.; Gorton, L. *Sens. Actuators B* **1997**, 44, 356.
 91. Liu, Y-C.; Hwuang, B-J. *Synth. Met.* **2000**, 133, 205
 92. Liu, Y-C.; Hwuang, B-J. *Thin Solid Films.* **1999**, 339, 233.
 93. Song, Y.; Rajeshwar, K. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1992**, 88, 605
 94. De Paoli, M.A.; Peres, R.C.D.; Panero, S.; Scrosati, B. *Electrochimica Acta* **1992**, 37, 1173.
 95. Harrison, S; Turner, R.F.B.; Balter, H.P. *Anal. Chem.* **1988**, 60 2002.
 96. Bindra, P.S.; Wilson, G.S. *Anal. Chem.* **1989** , 61, 2566.
 97. Moussy, F.; Jakeway, S.; Harrison, J.; Rajotte, R.V. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1183.
 98. Zhang, Y.H.; Wilson, G.S.; Moatti-Sirat, A.; Poitout, V.; Reach, G. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1183.
 99. Centonze, O.; Guerrieri, A.; Malitesta, C.; Palmisano, F.; Zambonin, P.G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 342, 729.
 100. Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans* **1986**, 82, 1259.
 101. Katz, K.; Riklin, A. Heleg-Shabati, V.; Bückmann, A.F. *Anal. Chim. Acta* **1999**, 385, 45.
 102. Hale, P.D.; Bogulavsky, L.I.; Inagaki, Y.; Karan, H.I.; Lee, H.S.; Skotheim, T.A.; Okamoto, Y. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 677.
 103. Delong, H.C.; Donohue, J.J.; Buttry, D.A. *Lagmuir* **1991**, 7, 2196.