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

JOÃO VICTOR BUENO KOZAN

Microssensor para Glicose
Integrado a Catéter

São Paulo

17/08/2007

JOÃO VICTOR BUENO KOZAN

Microssensor para Glicose Integrado a Catéter

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química
(Química Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Angnes

São Paulo
2007

***A Deus e a toda minha família, principalmente a minha mãe e a minha avó que
sempre me apoiaram em tudo que eu faço.***

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. Lúcio Angnes pela ORIENTAÇÃO e aprendizagem que me foram proporcionadas.

Ao colega Antonio William Oliveira Lima pela imensa colaboração neste trabalho e grata amizade.

A Dra. Mônica Beatriz Mathor, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Aos colegas do Laboratório de Automação e Instrumentação Analítica (LAIA), que proporcionaram um convívio amigável e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas da Química Analítica: pela amizade.

Aos professores, colegas e funcionários do Instituto de Química (USP), que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na compra de reagentes para este trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

A imaginação é mais importante que o conhecimento.
(Albert Einstein)

RESUMO

Kozan, J. V. B. **Microssensor para Glicose Integrado a Catéter**. 2007. p. 99. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos para glicose integrados a cateteres tem como requisitos básicos a sua miniaturização e funcionamento por períodos relativamente longos no ambiente intravenoso. A função de tais sensores é o acompanhamento de forma continuada e em tempo real, a evolução clínica de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTIs). Dentre os sensores para glicose, os biossensores amperométricos baseados na reação enzimática de glicose oxidase se mostrou o mais promissor. Diferentes procedimentos para a construção de tais microssensores implantáveis foram desenvolvidos. Um conjunto de eletrodos, constituído fios de platina (mais adiante cobre, com diâmetro 0,18 mm) e de prata (diâmetro 0,20 mm) revestidos com poli-vinil-formol foram posicionados no interior de uma agulha de aço inoxidável (30,0 mm de comprimento e 0,80 a 1,2 mm de diâmetro) e fixados com resina epóxi, constituindo um dispositivo único com os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. A otimização do sensor envolveu a platinização eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho, o que aumentou a sua área efetiva e favoreceu a deposição do material enzimático. A presença de um detergente não iônico favoreceu a formação de um filme uniforme de enzimas e a eletropolimerização de 1,2-diaminobenzeno (em presença de albumina de soro bovino) foi utilizada para a formação de um filme com a característica de minimizar a interferência de espécies neutras. A adição de um filme de Náfon[®] à superfície do sensor aumentou a seletividade. O sensor resultante caracterizou-se por possuir um tempo de resposta curto (~6 s), linearidade de 1,0 até 12,5 mmol dm⁻³ com um limite de detecção de 1,0 mmol dm⁻³, diminuição na resposta de espécies eletroativas (ácido ascórbico 2,0% e paracetamol 10,5% em relação à glicose) e uma vida útil superior a sete dias, em tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³. Para possibilitar o implante de tais sensores, foram exploradas diferentes metodologias de esterilização, sendo a mais favorável a irradiação com acelerador de elétrons com doses acumulativas. Sensores revestidos com acetato de celulose e Náfon[®] (a melhor condição) apresentaram perda de atividade da ordem de 15%, após serem irradiados.

Palavras chaves: Glicose, Eletrodeposição e Biossensores eletroquímicos.

ABSTRACT

Kozan, J. V. B. **Glucose Microsensor Integrated into a Catheter**. 2007. p.99. Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Instituto Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The development of electrochemical sensors for glucose integrated into catheters has as basic requisite its miniaturization and the requirement of functioning for relatively long periods in the intravenous environment. The function of such sensors is the continuous monitoring on real time of the clinical evolution of patients hospitalized in intensive therapy units (UTIs). Amongst the sensors for glucose, amperometric biosensors based on the enzymatic reaction of glucose oxidase has been considered as the most promising ones. Different procedures for the construction of such microsensors to be implanted have been developed. A set of electrodes, constituted by a platinum wire (along this work, it was substituted by copper wires) with 0.18 mm diameter and a silver wire with 0.20 mm diameter coated with poly-vinyl-formol were positioned inside a stainless needle (30.0 mm length and 0.80 to 1.2 mm diameter) and fixed with epoxy resin, resulting in a single device containing the working, reference and auxiliary electrodes, respectively. The optimization of the sensor involved the electrochemical platinization of the working electrode surface, increasing its effective area and favoring the deposition of the enzymatic material. The presence of a non-ionic detergent favored the formation of a uniform film of enzyme and the electropolymerization of 1,2-diaminobenzene (in the presence of albumin and bovine serum) was used for the formation of a film able to interference of neutral species. The addition of a Nafion[®] film to the sensor surface increased its selectivity. The resultant sensor was characterized for its short time response (~6 s), linearity between 1.0 and 12.5 mmol dm⁻³ with a detection limit of 1.0 mmol dm⁻³, reduction in the interference of electroactive species (2.0% ascorbic acid and 10.5% paracetamol in relation to glucose) and a useful life larger than seven days, in 0.05 mol dm⁻³ phosphate buffer. To make possible the implantation of such sensors, different methodologies of sterilization were explored, being the most favorable the irradiation with electron accelerator using accumulating doses. Sensors coated with cellulose acetate and Nafion[®] (the best condition) presented loss of activity (around 15%), after the irradiation.

Keywords: *glucose, electrodeposition, electrochemical biosensors*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos (ET, EA e ER).....	20
Figura 2: Representação gráfica de voltamogramas obtidos por voltametria cíclica.....	22
Figura 3: Representação gráfica de voltamogramas obtidos por amperometria; a) em um sistema estacionário e b) em um sistema em fluxo.....	24
Figura 4: Principais áreas de importância no desenvolvimento de biossensores.....	31
Figura 5: Representação dos principais componentes para a construção e a utilização de um biossensor.....	32
Figura 6: Esquemas conceituais de biossensores baseados em oxidoreductase: a) primeira, b) segunda e c) terceira geração.....	35
Figura 7: Representação básica de um biossensor enzimático utilizado em eletroquímica.....	37
Figura 8: Principais moléculas interferentes encontradas em matrizes biológicas ou melhor em sangue quando determina-se glicose usando-se um biossensor: a) paracetamol, b) ácido ascórbico e c) ácido úrico.....	44
Figura 9: Materiais utilizados na construção do biossensor de glicose. a) agulha de aço inox, b) fio de prata, c) fio de cobre e d) fios de cobre para contato elétrico.....	49
Figura 10: Vista lateral (A) e frontal (B) do sistema (ET, EA e ER) sem modificação. Magnitude de 50x.....	50
Figura 11: Aspecto da superfície do microsensor antes (A) e depois (B) da limpeza. Em evidência os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. Magnitude de 40x.....	51

Figura 12: Vista frontal dos microsensores de cobre platinizados em solução contendo hexacloro platinato de potássio, acetato de chumbo e cloreto de potássio durante 600 s. O fio de prata (eletrodo de referência) é o mais claro e o fio mais escuro, o platinizado. Magnitude de $\sim 25\times$56

Figura 13: Respostas potencioestáticas da eletrodeposição de platina em eletrodos de cobre em diferentes potenciais (vermelho: -0,1 V; azul -0,2 V; rosa -0,3 V; verde -0,4 V e preto -0,5 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$). São mostrados apenas os primeiros 100 s.....57

Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo de cobre (a) e eletrodos de cobre platinizados em diferentes potenciais (b, -0,1 V; c, -0,2 V; d, -0,3 V; e, -0,4 V, e f, -0,5 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$) em solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0,0 a 0,7 V.....58

Figura 15: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de cobre com diâmetro de 0,18 mm em solução de $\text{NaOH } 0,15 \text{ mol dm}^{-3}$. $V = 0,1 \text{ V s}^{-1}$60

Figura 16: Voltamogramas de varreduras lineares obtidos para eletrodo de cobre (A) e eletrodo de cobre platinizado em -0,5 V por 600 s (B) em solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ antes (a) e após (b) adição de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de peróxido de hidrogênio. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0,0 a 0,7 V.....61

Figura 17: Amperograma obtido após injeções sucessivas de $150 \mu\text{mol dm}^{-3}$ de uma solução padrão de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, sob agitação, utilizando eletrodo de cobre platinizado em -0,5 V por 600 s. Potencial aplicado = 0,4V.....61

Figura 18: Efeito da concentração de Triton X-100 sobre a eletrodeposição de *glicose oxidase*. Respostas de corrente para 5 mmol dm^{-3} de glicose. Potencial aplicado 0,6 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$63

Figura 19: Curvas tempo vs corrente para eletrodos de cobre platinizados e modificados com *glicose oxidase* em concentrações de: 200; 400; 600; 800; e 1000 UI.mg^{-1} obtidas após adição de $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ de glicose em tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,2. Potencial aplicado 0,6 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$64

Figura 20: Voltamogramas cíclicos de $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ do DAB em TF $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,2 em uma velocidade de varredura de 50 mV / s . Eletrodo utilizado: cobre platinizado (deposição de platina a -0,5 V, durante 600s).....65

Figura 21: Voltamogramas cíclicos de 5,0 mmol L⁻¹ do PPD e 2,5 % de ASB em TF 0,05 mol L⁻¹, pH 7,2 em uma velocidade de varredura de 50 mV / s após 10 (preto), 15 (verde), 20 (azul) e 40 ciclos (vermelho). Eletrodo utilizado: cobre platinizado (deposição de platina em -0,1 e -0,075 V vs Ag/AgCl_(KCl sat) durante 1 e cinco segundos por 20 ciclos.....66

Figura 22: Respostas de eletrodos de cobre platinizados recobertos com membranas poliméricas: Náfion[®] (verde) e poliuretano (azul) após adições de 100 µmol dm⁻³ de peróxido de hidrogênio. Concentrações de Nafion[®] e poliuretano (A: 0,5%, B: 1,0%, C: 1,5% e D: 2,0 %). Em vermelho, resposta do sensor sem membrana.....67

Figura 23. Amperograma obtido após injeções sucessivas de 2,5 mmol dm⁻³ de uma solução glicose 1,0 mol dm⁻³ em TF 0,05 mol dm⁻³, sob agitação, utilizando eletrodo de cobre platinizado. $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$. Curva de calibração inserida: $r = 0,996$, $I = 1,16952 + 3,04674 [\text{glicose}]$68

Figura 24: Amperograma registrado em TF 0,05 mol dm⁻³ seguido da adição de glicose 2,5 mmol dm⁻³, ácido ascórbico 0,1 mmol dm⁻³, paracetamol 0,2 mmol dm⁻³ e glicose 2,5 mmol dm⁻³, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$69

Figura 25: Decaimento da resposta do biossensor com adições de 2,5 mmol dm⁻³ de glicose em tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³ aplicando um $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$. Azul após dois, vermelho após cinco dias, verde após oito dias e azul turquesa após onze dias da construção do biossensor.....70

Figura 26: Resposta do biossensor com adições de 5 mmol dm⁻³ de glicose em tampão fosfato antes de imergir em sangue (preto), imerso em sangue (verde) e em tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³ após a imersão em sangue aplicando um $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(KCl \text{ sat})}$72

Figura 27. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos (1 – Náfion[®]; 2 – acetato de celulose; 3 – Náfion[®] + acetato de celulose) após aplicação de uma dose de 25 KGy. a) controle; b) irradiados com ⁶⁰Co (*radγ*) (GamaCell) e c) biossensores irradiados com acelerador de elétrons. Resposta média de 3 bioeletrodos.....73

Figura 28. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos com: a) controles; b) Nafion[®]; c) acetato de celulose; d) Nafion[®] + acetato de celulose. 1) 24 h e 2) 48 h após aplicação de uma dose de 25 KGy com ⁶⁰Co (*radγ*) (GamaCell). Resposta média de 3 bioeletrodos.....73

Figura 29. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos com Nafion® + acetato de celulose após (1) 24 h e (2) 48 h. a) controles; b) irradiados com ⁶⁰Co (radγ) GamaCell, 25 KGy; c) irradiados com acelerador de elétrons com 24 doses cumulativas de 1,04 KGy e d) irradiados com acelerador de elétrons, 25 KGy. Resposta média de 3 bioeletrodos.....73

Figura 30: Representação esquemática da ação do biossensor.....75

Figura 31: Futuro célula em fluxo com chip de três eletrodos (trabalho, auxiliar, referência) que será utilizada na quantificação da glicose em sangue.....78

Figura 32: Arranjo de eletrodos de cobre com diâmetros de 80 µm e 20 µm junto com um eletrodo de prata 200 µm dentro de uma agulha de aço inox de diâmetro externo de 1,2 mm: a) 26 eletrodo, b) 46 eletros de e c) mais de 30 eletrodos.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica.....	22
Tabela 2: Principais bioreceptores utilizados na construção de biossensores eletroquímicos.....	33
Tabela 3: Principais enzimas utilizadas na construção de biossensores eletroquímicos.....	34
Tabela 4: Principais transdutores utilizados na construção de biossensores eletroquímicos.....	35
Tabela 5: Comparação de duas amostras com o biossensor e um equipamento comercial utilizado na determinação da glicose.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido ascórbico

AU: Ácido úrico

DMF: Dimetilformamida

EA: Eletrodo auxiliar

ER: Eletrodo de referência

ET: Eletrodo de trabalho

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

GOx: Glicose Oxidase

PA: Paracetamol

PPD: 1,2-diaminobenzeno

PU: Poliuretano

TF: Tampão fosfato pH~7,2

THF: Tetrahidrofurano

VC: Voltametria cíclica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1. TEORIA	19
1.1. Técnicas Eletroquímicas	19
1.2. Sensores Eletroquímicos	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
2.1. Biossensores	31
2.2. Eletrodeposição	38
2.3. Membranas seletivas	42
2.4. Interferentes	44
2.5. Esterilização de biossensores	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	48
3.1. Reagentes	48
3.2. Equipamentos	48
3.3. Célula eletroquímica e eletrodos	49
3.4. Procedimento experimental	50
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1. Platinização dos eletrodos de cobre	56
4.2. Comparação entre as áreas os eletrodos de cobre	59
4.3. Comportamento catalítico da superfície do eletrodo platinizado	60
4.4. Imobilização da <i>glicose oxidase</i>	62
4.5. Eletropolimerização do 1,2-diaminobenzeno	64
4.6. Formação de membranas “Nafion® e poliuretano”	66
4.7. Respostas do biossensor para glicose	68
4.8. Teste envolvendo interferentes	68
4.9. Desempenho dos biossensores desenvolvidos	69
4.10. Resultados da irradiação	72
5. CONCLUSÕES	75
6. PERSPECTIVAS	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8. ANEXOS	96

INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de microssensores eletroquímicos (em especial os sensores voltamétricos) tem recebido considerável atenção. Isto pode ser atribuído tanto às novas necessidades que requerem o uso de detectores e dispositivos miniaturizados, como às vantagens inerentes apresentadas pelos microeletrodos, em comparação aos eletrodos convencionais [1-4]. Os biossensores miniaturizados são particularmente importantes por serem aplicáveis tanto “*ex vivo*” como principalmente pela potencialidade de sua aplicação *in vivo*. A busca de sensores miniaturizados, com características que permitam a sua operação por longos períodos no interior do organismo humano se constitui em meta perseguida por muitos grupos de pesquisa.

A incorporação de moléculas biologicamente ativas em dispositivos sensíveis tem promovido considerável desenvolvimento na detecção e quantificação de inúmeros analitos de aplicação clínica, industrial e ambiental [5], em virtude de suas características de sensibilidade, seletividade e as possibilidades de miniaturização e de produção em massa [6]. A determinação de glicose é uma das mais populares e bem conhecidas áreas de aplicação de biossensores. A utilização de eletrodos com enzimas visando a quantificação de glicose teve início em 1962 [7]. A partir de então, têm sido desenvolvidas inúmeras técnicas, com o objetivo de se obter dispositivos cada vez mais confiáveis e refinados para a determinação deste analito.

Dentre os biossensores eletroquímicos, os amperométricos inicialmente utilizavam a quantificação de um dos produtos da reação (H_2O_2 ou H^+) ou no consumo de O_2 (eletrodos de primeira ordem). Mais adiante foram desenvolvidos sensores baseados na transferência de elétrons entre o eletrodo e a enzima imobilizada (*glicose oxidase* - GOx) que catalisa a oxidação da glicose. Este

processo a princípio é simples e conveniente e pode ser realizado de dois modos diferentes. O primeiro é um método indireto usando mediadores como transportadores de elétrons [8] (eletrodos de segunda ordem). O outro modo, fundamenta-se na transferência direta de elétrons entre a GOx e a superfície do eletrodo, produzindo os sensores de glicose não-mediados [9] (eletrodos de terceira ordem).

A transferência eletrônica entre a enzima e o sensor é dependente das características do mesmo. A eletrodeposição de metais pode gerar uma matriz que favoreça a imobilização física da enzima, e um ambiente adequado que diminua o potencial operacional para a oxidação de peróxido de hidrogênio liberado na reação enzimática. Adicionalmente pode proporcionar o aumento da sensibilidade e diminuir o limite de detecção em biossensores [10,11], minimizando a interferência de outras espécies eletroativas.

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos para a deposição eletroquímica de enzimas em superfícies de metais como etapa para a fabricação de biossensores. Assim, têm-se numerosos procedimentos de co-deposição de enzimas [12,13], cabendo destacar: (i) com outras proteínas [14], (ii) com sais de metais nobres [15,16], (iii) com monômeros para formar uma matriz polimérica insolúvel [17], ou a imobilização da enzima por meio de ligações covalentes para formar um filme na superfície do eletrodo por eletropolimerização [18-20]. Todas essas estratégias visam: a) imobilizar a enzima em um estado altamente ativo; b) proporcionar uma estrutura preferencialmente permeável à glicose (e ao peróxido de hidrogênio); e c) obter uma matriz ideal em que a passagem de outras espécies interferentes (ácido úrico, ácido ascórbico e paracetamol) seja reprimida ao mesmo tempo em que se evita também o envenenamento da superfície do eletrodo, advindo da adsorção

de proteínas de alto peso molecular. É ainda desejável que tais filmes retardem a degradação da enzima e sejam biocompatíveis.

Justificativa e objetivo principal

O desenvolvimento de sensores implantáveis se constitui em um desafio que vem sendo perseguido há cerca de duas décadas, não tendo sido ainda alcançados resultados definitivos. A necessidade de tais sensores é facilmente constatada ao discutir o assunto com pessoas ligadas à área médica.

Atualmente, a necessidade de monitoramento contínuo de glicose por longos períodos requer horas de trabalho de enfermeiras e elevado consumo de materiais, além do desconforto adicional para o paciente, que já se encontra em uma situação de significativo mal-estar. Via de regra, em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, o monitoramento de glicose é feito a cada meia hora. Para alguns casos, a condição ideal seria o monitoramento a cada cinco minutos, o que só se torna viável com sensores implantados. Assim, há uma crescente demanda por sensores eletroquímicos integrados a cateteres intravenosos, tendo como requisito a sua miniaturização e seu baixo custo de construção.

A construção de tais sensores apresenta dois grandes desafios a serem suplantados: a) sua implantação requer miniaturização, uma vez que para monitorar glicose de forma contínua e confiável, este sensor deve estar localizado em veias ou artérias com fluxo sanguíneo, de forma que a medição acompanhe rapidamente as alterações que ocorrem no organismo; b) para implantar um sensor na corrente sanguínea de um paciente, este deve apresentar-se asséptico, isto é, a superfície que vai entrar em contato com a corrente sanguínea deverá apresentar-se estéril.

O desenvolvimento de biossensores miniaturizados, que apresentem tempos de operação significativamente longos (vários dias), ainda são escassos. As correntes geradas com eletrodos de áreas $0,025 \text{ mm}^2$ situam-se na faixa de nanoamperes, condição onde os ruídos externos são potenciais interferentes. Além disso, os processos de esterilização devem ser eficientes para eliminar microorganismos presentes na superfície do sensor e ao mesmo tempo devem afetar o mínimo possível o material enzimático presente.

Os estudos realizados durante este período de aproximadamente dois anos, foram direcionados para a fabricação de microssensores para quantificar a glicose e avaliar sua estabilidade e durabilidade. Durante os nossos estudos, foram desenvolvidos biossensores baseados na enzima *glicose oxidase* (adsorvida ou ligada na superfície do eletrodo de platina e mais tarde cobre platinizado). Foram utilizados polímeros, proteína e diferentes membranas poliméricas, visando à obtenção de um sensor com características favoráveis para o monitoramento da glicose em sangue.

A GOx (1.1.3.4) catalisa a oxidação da β -D- Glicose pelo oxigênio formando ácido glicônico e H_2O_2 . Essa enzima contém um grupo prostético, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD), que confere à proteína a capacidade de catalisar reações de oxi-redução. A GOx tem um grande número de aplicações industriais devido a sua habilidade de remover glicose e oxigênio ou produzir ácido glucônico e H_2O_2 . A GOx é usada na remoção de açúcar de ovos, produção de vinhos por álcool reduzidos, remoção de O_2 para controle do escurecimento visando aumentar o tempo de estocagem de sucos de frutas, purês, maioneses e alimentos enlatados. A GOx é também usada como alternativas na produção do H_2O_2 como alvejante têxtil ou na pasteurização de leite. O ácido glucônico e seus derivados têm sido produzidos pelo

uso da GOx em grandes quantidades para aplicações industriais e farmacêuticas. Além disto, a GOx é amplamente usada na construção de biossensores para a quantificação de glicose. A utilização dos filmes de polímero, de proteínas e de membranas teve como finalidade proteger a enzima, aumentar a seletividade do biossensor e torná-lo biocompatível. No caso das membranas seu papel é evitar a influência de interferentes (ácido ascórbico e paracetamol) que são oxidados praticamente no mesmo potencial aplicado para a determinação da glicose. Os sensores obtidos neste trabalho mostraram-se estáveis, precisos e sensíveis *in vitro* para quantificação de glicose por amperometria.

No mesmo período, foram exploradas diferentes formas de esterilização: radiação com ^{60}Co , radiação com feixes de elétrons e por método químico (óxido de etileno). O processo envolvendo irradiação com ^{60}Co levou aos melhores resultados, com baixas perdas de atividade enzimática.

1. TEORIA

1.1. TÉCNICAS ELETROANALÍTICAS

Técnicas eletroanalíticas encontram aplicações nos mais diversos campos desde a pesquisa básica até a análise de rotina. As aplicações em áreas como biotecnologia, na química ambiental, na análise de alimentos, na quantificação de ultratraços em materiais utilizados em eletrônica e em novos materiais. Apresenta com característica alta sensibilidade, excelente reprodutibilidade e razoável seletividade. Por ser possível controlar tanto as características do meio em que a medição é executada, quanto às características do transdutor utilizado, a limitação de seletividade pode ser compensada. Dentre as numerosas técnicas eletroanalíticas, cabe destacar a voltametria cíclica e a amperometria que serão brevemente abordadas a seguir.

1.1.1. Células Eletroquímicas

Aplicações envolvendo processos eletroquímicos tiveram início em 1922 com o advento da polarografia, que utilizava uma célula com dois eletrodos. Nesta célula, o eletrodo de trabalho era mercúrio (gotejante), e o segundo eletrodo fazia simultaneamente o papel de eletrodo de referência e auxiliar. Pelo fato de o eletrodo de trabalho ser bem menor que o eletrodo de referência, as variações de potenciais do mesmo eram pouco significativas.

Com a evolução da instrumentação, foi desenvolvido o potenciostato, que utiliza três eletrodos. Este instrumento é construído de forma a possibilitar a medição do potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência sem, contudo permitir a passagem significativa de corrente entre estes eletrodos, evitando

assim a polarização do eletrodo de referência (e conseqüente alteração do seu potencial). O processo redox vai ocorrer junto aos eletrodos de trabalho e o eletrodo auxiliar. Durante o processo redox, alterações do potencial do eletrodo de trabalho serão compensadas pela alteração do potencial do eletrodo auxiliar, de forma que o mesmo potencial “medido” pelo eletrodo de referência em relação ao eletrodo de trabalho seja mantido. Esta operação é controlada pelo potenciostato.

Células eletroquímicas com as mais diversas geometrias podem ser encontradas na literatura. No presente trabalho, para diversos estudos foi utilizada uma célula eletroquímica desenvolvida no próprio laboratório (Figura 1), que foi concebida para se trabalhar com volumes tipicamente de 5 mL.

Figura 1: Representação de uma célula eletroquímica com três eletrodos (ET, EA e ER).

1.1.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é umas das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos [21-24], pois apesar de nem sempre fornecer resultados com elevada sensibilidade, permite que se obtenha rapidamente informações sobre um sistema eletroquímico. A causa de sua menor sensibilidade (comparada com outras técnicas voltamétricas) é a variação contínua

do potencial aplicado. Ao ser variado o potencial, gera-se corrente capacitiva, que vai se somar á corrente faradaica. Em baixas concentrações de analito, a contribuição da corrente capacitiva se torna significativa e como não pode ser distinguida da faradaica, inviabiliza a análise.

As técnicas voltamétricas geralmente envolvem a aplicação de uma perturbação de potencial a um eletrodo (na forma de uma rampa linear de potencial). Um voltamograma cíclico indica em que região de potencial determinada reação redox (compostos eletroativos) irá ocorrer. A técnica também fornece outras informações a respeito de um sistema, como: se o processo é reversível, o número de elétrons envolvidos no processo, se ocorre à formação de espécies intermediárias, etc.

Para utilização das técnicas voltamétricas necessita-se de um potenciostato ou galvanostato. Além disso, se utiliza uma célula composta por um sistema de três eletrodos: um de trabalho (ET), um de referência (ER) e um auxiliar (EA), mergulhados em uma solução em repouso na presença ou ausência de oxigênio (geralmente eliminado por borbulhamento de N_2 ou Ar). O eletrodo mais importante, onde corre a reação de interesse, é o de trabalho, que pode ser constituído de diferentes materiais, dentre os quais, as várias formas de carbono (carbono vítreo, pirolítico, diamante, nanotubos e pó de grafite) e os metais nobres, que apresentam faixa de trabalho mais ampla. Metais menos nobres (cobre, níquel, cobalto...) e outros podem ser utilizados para determinadas aplicações. O eletrodo auxiliar (construído geralmente por material inerte, na maioria das vezes platina) deve ter área superior à do eletrodo de trabalho e tem a função de fornecer a corrente necessária para sustentar a reação. O eletrodo de referência tem o papel de monitorar o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho. Dessa forma, o ER não

pode sofrer alterações de potencial resultantes do fluxo de corrente. Nos potenciostatos modernos, a elevada resistência do circuito evita um fluxo de corrente significativo através do eletrodo de referência e a conseqüente alteração de seu potencial.

Em um voltamograma típico, o potencial é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até atingir um potencial final. Neste ponto a varredura é invertida até atingir o seu ponto de partida novamente. Com resultado obtém-se um registro de corrente em função da variação do potencial, usualmente denominando voltametria cíclica. Os processos redox que acontecem no ET são representados tanto por correntes de picos anódicos ($i_{p,a}$) e catódicos ($i_{p,c}$) quanto por potenciais de picos anódicos ($E_{p,a}$) e catódicos ($E_{p,c}$). A tabela 1 mostra a definição desses parâmetros. A Figura 2, o esquema representativo de um experimento de voltametria cíclica.

Tabela 1. Parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica.

Termo definição	
$E_{p,a}$	Potencial de pico anódico. Potencial no qual a corrente anódica apresenta seu valor mais alto.
$i_{p,a}$	Corrente de pico anódica. O valor mais alto de corrente anódica.
$E_{p,c}$	Potencial de pico catódico. Potencial no qual a corrente catódica apresenta seu valor mais alto.
$i_{p,c}$	Corrente de pico catódico. O valor mais alto da corrente catódica.

Figura 2: Representação gráfica de voltamogramas obtidos por voltametria cíclica

1.1.3. Amperometria

A amperometria se constitui em técnica vastamente utilizada em eletroanálise, principalmente em aplicações típicas envolvendo titulações amperométricas, sensores amperométricos e células em fluxo. É utilizada com grande vantagem, comparada com a voltametria cíclica para a quantificação de baixas concentrações de analitos pelo fato de se utilizar um valor fixo de potencial, minimizando assim as variações de carga da dupla camada elétrica e em consequência da corrente capacitiva (que virtualmente deve ser igual a zero). Medidas amperométricas são muito úteis para avaliar biossensores e dentre as formas mais utilizadas para tais experimentos é a realização de medidas amperométricas em células convencionais, (sob agitação – Figura 3a) e em fluxo (Figura 3b).

Nas medidas utilizando células eletroquímicas convencionais, inicia-se com o biossensor imerso em eletrólito e, sob agitação, são feitas adições do analito. A corrente inicial, medida no eletrólito é muito baixa e resulta apenas de pequenas quantidades de impureza do eletrólito e de eventuais espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. Estudos prévios envolvendo técnicas de varredura de potencial são fundamentais para selecionar o potencial de oxidação (ou redução) adequado à análise (bem como para minimizar o efeito dos interferentes).

A cada adição, corresponde um aumento de corrente, que é proporcional ao analito adicionado. O registro resultante indica o tempo de resposta do sensor (indicado pelo tempo necessário para que um novo patamar de corrente seja atingido) e a faixa de resposta que pode ser atingido, até a saturação do mesmo. Medidas envolvendo análise em fluxo geram sinais transientes, que são proporcionais a diversos parâmetros, dentre os quais o volume de amostra injetado e o fluxo da solução.

Figura 3: Representação gráfica dos voltamogramas obtidos por amperometria: a) em um sistema sobre agitação; e b) em um sistema em fluxo.

A técnica amperométrica quando associada a métodos de análise em fluxo, torna-se bastante atraente para aplicações práticas, em especial quando envolve um significativo número de análises.

Uma das limitações desta técnica consiste na sua baixa seletividade. Se a análise é realizada em potenciais extremos (positivos ou negativos), promove-se a oxidação ou a redução de todas as espécies que são eletroativas em potenciais abaixo do valor estabelecido. Portanto, é aconselhável empregar valores mínimos de potencial.

1.2. SENSORES ELETROQUÍMICOS

Os sensores voltamétricos se baseiam em reações de oxidação e redução, que envolvem um determinado analito para medição de suas concentrações. Estas reações geram um fluxo de corrente entre os eletrodos, a qual, dentro de certas condições, é proporcional à concentração do analito que se deseja mensurar. O controle deliberado da reatividade eletrodo/solução é um dos objetivos básicos do eletroquímico, e tais conhecimentos também são muito relevantes nas áreas de

eletrocatalise, eletroanálise e corrosão, entre outras. Para propostas analíticas, sensores obtidos a partir de diversos substratos metálicos são aplicados na determinação de várias substâncias de interesse. Materiais utilizados na confecção de eletrodos, tais como platina [25-27], ouro [28-29], níquel [30-31], cobre [32-37], prata [38] e cobalto [39] podem ser utilizados para a detecção de diversos analitos.

Os eletrodos baseados em metais nobres, como platina e ouro, têm sido amplamente utilizados na detecção de substâncias orgânicas. Esses compostos tendem a adsorver-se sobre a superfície dos dispositivos, sofrendo conseqüentes reações anódicas. Esse fenômeno de adsorção pode representar um dos maiores problemas associados ao uso de eletrodos de platina e ouro: o acúmulo do produto de oxidação, que levará à passivação do eletrodo e, conseqüentemente, ao decréscimo na resposta analítica. Para evitar este tipo de problema, muitos pesquisadores sugerem a aplicação de pulso de potenciais (positivos ou negativos), de maneira a eliminar o material indesejável da superfície do eletrodo.

Umas das variáveis utilizadas para controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução é o potencial aplicado. No entanto, tal operação permite somente variações modestas, (via de regra imposta pelas características do solvente, do eletrólito suporte ou ainda do eletrodo) e geralmente, apresenta baixa seletividade. Desta forma, muitos pesquisadores dedicam-se a estudos envolvendo a modificação deliberada da superfície de eletrodos, como um meio de impor e controlar suas propriedades químicas e físico-químicas do agente modificador para a superfície do substrato, de tal modo que seja possível obter um comportamento previamente planejado do conjunto eletrodo-reagente. A construção de interfaces eletroquímicas com sistemas organizados de forma racional pode levar a obtenção

de reatividade e seletividade desejadas para aplicações de interesse como no caso dos biossensores.

1.2.1. Eletrodos Modificados

Uma variedade de métodos vem sendo empregada na modificação de eletrodos [40-42]. A modificação da superfície de um sensor pode ser realizada de diversas maneiras, dentre as quais:

- (i) Aplicação de filmes poliméricos na superfície do eletrodo, alterando as propriedades de transporte (podendo atuar como barreira para excluir interferentes)
- (ii) Utilização de materiais biológicos junto à superfície do eletrodo (reações enzimáticas, propriedades ligantes e reações de pré-concentração)
- (iii) Mediadores que melhoraram a transferência de elétrons na superfície do eletrodo

Uma rápida abordagem sobre os métodos mais comuns de modificação de eletrodos será descrita a seguir:

Adsorção

Adsorção representa umas das técnicas mais usadas para a modificação de eletrodos devido a sua simplicidade e eficiência em muitos casos. O método se baseia na imersão do eletrodo ou na transferência de um volume conhecido de uma solução que contenha o agente modificador para a superfície do eletrodo. O agente modificador adsorve sobre o substrato após a evaporação do solvente. Apesar dos primeiros trabalhos envolverem eletrodos de platina [43,44], os eletrodos de carbono vítreo e grafite, bem como os de ouro [41] são preferidos pela maioria dos pesquisadores [2,40]. O carbono tem a capacidade de quimissorver reagentes que

possuem sistemas de elétrons π estendidos, ao passo que sobre ouro, tio-compostos tem sido muito utilizados [41]. No entanto, esta técnica apresenta alguns problemas, dentre os quais destaca-se a dessorção do modificador para o meio durante a utilização do sensor e em consequência gerando o comprometimento de sua durabilidade e reprodutibilidade, ou no outro extremo, a dificuldade de sua remoção, quando se deseja utilizar o sensor para outras aplicações.

Ligação Covalente

Uma ligação covalente entre o agente modificador e grupos funcionais presentes na superfície de um substrato metálico representa uma forma de obter eletrodos quimicamente modificados. Por exemplo, reações de silanização, envolvendo organossilanos e óxidos presentes na superfície do eletrodo. Os eletrodos de óxidos como SnO_2 , RuO_2 e TiO_2 apresentam hidroxilas superficiais que podem ser utilizadas para ancorar substâncias por esta rota sintética. Porém, quando oxidadas em meio ácido, muitas superfícies metálicas (como platina e ouro) podem ser recobertas por uma fina camada de óxidos, bastante reativa a silanos. Desta forma, após silanização, o eletrodo metálico pode sofrer reação posterior com outras moléculas, levando a fixação do grupo funcional desejado, por ligação covalente.

Eletrodos de carbono também podem ser ligados covalentemente a reagentes uma vez que apresentam grupos funcionais contendo oxigênio (alcoóis, ácidos carboxílicos, cetonas e anidridos) resultantes de reação de oxigenação de átomos de carbono, contendo ligações incompletas. A modificação de eletrodos a base de carbono é fundamentada na manipulação da reatividade desses grupos funcionais oxigenados frente a reagentes como organossilanos, cloreto de tionila e aminas, entre outros. Outro modo de se ligar moléculas a superfície de carbono consiste em

retirar os grupos funcionais oxigenados por meio de “decapagem” por plasma de argônio (*argon plasma etching*), abrasão mecânica ou clivagem. A superfície do carbono exposta é extremamente reativa e pode se ligar covalentemente a várias moléculas.

Os eletrodos modificados via ligação covalente são bastante estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos. Porém, este método consome tempos longos para sua realização e é mais difícil de executar. É amplamente empregado na área de biossensores.

Filmes Poliméricos

A imobilização de espécies moleculares sobre o eletrodo através da adsorção ou da ligação covalente pode levar ao recobrimento por até uma monocamada ou, no máximo, poucas monocamadas. Dessa forma, o recobrimento com filmes poliméricos é mais atraente por permitir a imobilização de muitas camadas da espécie ativa, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica. Dependendo da aplicação desejada, polímeros eletroativos (se o objetivo é uma eletrocatalise), quimicamente ativos (propriedades ligantes ou de troca-iônica para pré-concentração) ou inertes (apenas exclusão de interferentes) podem ser explorados.

Os filmes poliméricos eletroativos se subdividem em duas categorias principais, dependendo de como o centro redox é imobilizado: polímero redox e polímeros de troca-iônica. No primeiro caso, o centro redox é parte do esqueleto polimérico. Esse tipo de polímero possui sítios ativos que podem ser oxidados e reduzidos por uma sucessão de transferências eletrônicas de auto-troca entre sítios vizinhos. Já os polímeros de troca-iônica são assim chamados porque o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poliônico. Por exemplo, filmes de

polivinilpiridina protonados podem ser utilizados para incorporar espécies aniônicas. Um material trocador de íons amplamente utilizado é o Nafion[®] (marca registrada da DuPont) cujos prótons sulfônicos podem ser facilmente trocados por cátions eletroativos. Os polímeros podem ser aplicados sobre a superfície de eletrodos por adsorção ou por evaporação de uma solução preparada com um solvente volátil. Pode-se promover a polimerização por meio de métodos não eletroquímicos, como por exemplo: polimerização ativada por plasma, foto-induzida por radiação ultravioleta ou, ainda, polimerização de organossilanos. Um método bastante empregado é o da eletropolimerização que, através da oxidação ou redução do monômero promove a polimerização direta sobre o eletrodo. Filmes bastante reprodutíveis são facilmente obtidos por eletropolimerização, uma vez que este método permite o controle e o monitoramento das variáveis eletroquímicas como: potencial, corrente e carga. Sendo assim, a polimerização eletroquímica, constitui-se em um dos melhores métodos para síntese de eletrodos quimicamente modificados.

Outros métodos

Um dos métodos ainda pouco utilizados se baseia na modificação de eletrodos à base de carbono em pó mediante mistura do agente modificador com o substrato de eletrodo (grafite, negro de carbono, etc). Quando possível, a mistura do carbono em pó com a solução do modificador é feita para obter uma distribuição mais homogênea, após a evaporação do solvente. Em ambos os casos, também pode ocorrer perda gradual do modificador para o meio, prejudicando a reprodutibilidade.

As argilas, as zeólitas e os óxidos e hidróxidos metálicos também servem para imobilizar espécies eletroativas em eletrodos, em virtude de suas estruturas

tridimensionais definidas, que podem conter poros, canais e lamelas. Eletrodos de partículas metálicas dispersas em filme polimérico são estudados por apresentar atividade catalítica muito promissora.

Estudos envolvendo modificações de eletrodos ainda se encontram em “sua infância” e muito ainda há para fazer. As formas de modificação descritas aqui, bem como outras, se constituem em metodologias a serem melhores exploradas e conhecidas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BIOSSENSORES

No mundo biomédico há uma grande necessidade de desenvolvimento de sensores seguros para a quantificação rápida, sensível e seletiva de inúmeros analitos. Entre esses sensores, os mais importantes são aqueles destinados ao controle de funções vitais, como o sensor de glicose para pacientes diabéticos e o de oxigênio utilizado em terapia intensiva e durante o processo de anestesia. Associações de conhecimentos das mais diversas áreas são requeridas para a construção de biossensores, com destaque às representadas abaixo:

Figura 4: Principais áreas de importância no desenvolvimento de biossensores

Os relatos pioneiros surgiram em meados dos anos 50, quando professor Leland C. Clark Jr publicou um artigo sobre um eletrodo de oxigênio [45]. Suas idéias tiveram maior impulso quando apresentou trabalho em um Simpósio Acadêmico de Ciência em Nova York, em 1962 [7], descrevendo como “fazer sensores eletroquímicos (pH, polarográfico, potenciométrico ou condutométrico) mais inteligentes” adicionando transdutores enzimáticos à superfície do sensor com o auxílio de uma membrana. O conceito foi ilustrado por uma experiência em que a *glucose oxidase* (GOx) foi colocada sobre a superfície de um sensor de oxigênio com ajuda de uma membrana de diálise [7,46]. Alguns anos mais tarde, Guilbault

apresentou um eletrodo enzimático potenciométrico para uréia, baseado na imobilização de urease em uma membrana, posicionada junto à superfície de um eletrodo seletivo para NH_4^+ [47]. Estas idéias se transformaram rapidamente em realidade comercial a partir de 1975, com a apresentação (pela Yellow Springs Instrument Company - Ohio) de sensor para glicose baseado na detecção amperométrica do peróxido de hidrogênio.

Um biossensor é constituído basicamente por dois componentes: um bioreceptor e um transdutor. O bioreceptor é uma biomolécula que reconhece o analito alvo, sendo o transdutor responsável em converter o produto em uma medida de sinal. Um biossensor integra esses dois componentes em um único sensor (Figura 5). Esta combinação permite medir o analito alvo sem a necessidade de nenhum reagente adicional. Por exemplo, a concentração de glicose em uma amostra do sangue pode ser medida diretamente por um biossensor (que é feito especificamente para a medida de glicose) simplesmente mergulhando (ou recobrindo com pequeno volume de sangue) o sensor na amostra. No caso de análises convencionais é usado para cada etapa um reagente diferente para tratar a amostra. A simplicidade, a velocidade da medida e a necessidade de volume muito menor de sangue são as vantagens principais de um biossensor eletroquímico.

Figura 5: Representação dos principais componentes para a construção e a utilização de um biossensor.

As enzimas são as moléculas mais utilizadas como bioreceptor em aplicações do biossensor. No entanto, existem diferentes tipos bioreceptores que podem ser utilizados na construção de um biossensor, como se pode ver na tabela 2.

Tabela 2: Principais bioreceptores utilizados na construção de biossensores eletroquímicos.

Bioreceptores	Descrição
Anticorpos	Possuem estrutura tridimensional que pode se ligar com antígeno de maneira específica
Ácidos nucléicos	Possuem alta especificidade dos pares de bases distribuídos ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de DNA
Enzimas	São proteínas capazes de catalisar reações químicas de maneira bastante seletiva
Microrganismo (bactérias, fungos, micróbios, etc)	Possuem a capacidade de assimilar compostos orgânicos e produzir enzimas que podem ser detectados por um transdutor
Tecidos orgânicos (de plantas ou animais)	Possuem uma grande variedade de enzimas imobilizadas, não apresentam uma alta seletividade, porém possuem uma vida útil elevada

A especificidade de um biossensor está intimamente ligada à seleção da molécula do bioreceptor usada. Apesar de anticorpos e ácidos nucléicos geralmente apresentarem maior especificidade, as enzimas são muito mais utilizadas, principalmente devido à facilidade de obtenção, em condições de elevada pureza. Na década de 80, eram conhecidas mais de 2000 enzimas, das quais mais de 400 podiam ser adquiridas comercialmente. Em 1992, o número de enzimas relacionadas pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology

alcançou 3196 e atualmente este número deve superar 4000 enzimas. A tabela 3 classifica as enzimas de acordo com o tipo de reação catalisada.

Tabela 3: Classificação das enzimas, de acordo com a sua função

Enzimas	Descrição	Atuação
Óxido-redutases	Reações de redox e transferência de elétrons	Em alcoóis, cetonas, aldeídos, aminas, amidas e (NADH, NADPH)
Transferases	Transferem grupos funcionais entre moléculas	Em grupos com: um carbono, aldeído ou cetona, acil, glicosil, fosfatos e enxofre
Hidrolases	Reações de hidrólise	Em ésteres, ligações glicosídicas, ligações peptídicas, outras ligações C-N e anidridos ácidos
Liases	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico	Em $=C=C=$, $=C=O$ e $=C=N-$
Isomerases	Transferência de grupos dentro da mesma molécula para formar isômeros	Em racemases
Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia	Em C-O, C-S, C-N e C-C

O transdutor tem a função de reconhecer um sinal primário que ocorre no bioreceptor e transformá-lo em um sinal secundário (elétrico ou óptico).

Destaca-se a utilização dos seguintes transdutores: eletroquímicos, ópticos, térmicos e de massa, (tabela 4). A detecção eletroquímica se destaca na construção

de biossensores, principalmente devido à sua simplicidade, ao seu amplo intervalo de linearidade e sua rápida resposta.

Tabela 4: Principais métodos de detecção e respectivas técnicas utilizadas na construção de biossensores eletroquímicos.

Métodos de detecção	Técnicas
Eletroanalíticos	Amperométricos Potenciométricos Condutométricos FETs
Óticos	Espectrofotométricos Fluorimétricos Lasers
Térmicos	Termômetros de precisão Termístores Dispositivos Peltier
Massa	Microbalanças de quartzo

Ao longo de mais de 40 anos, foram desenvolvidos diferentes métodos de transferência de elétrons entre a enzima e o transdutor eletroquímico (Figura 6) que permitem diferenciar as seguintes gerações dos biossensores:

Figura 6: Esquema da três gerações de biossensores baseados em oxidoreductase. a) primeira, b) segunda e c) terceira geração.

- **Primeira geração:** mede um dos produtos (H_2O_2) da reação enzimática.
- **Segunda geração:** incorpora um mediador que facilita a transferência eletrônica entre o sítio ativo da enzima e da superfície do eletrodo.
- **Terceira geração:** realiza a transferência direta entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo.

Atualmente, estudos visando o desenvolvimento de biossensores de terceira geração têm recebido maior destaque na literatura.

O desenvolvimento de biossensores miniaturizados tem recebido crescente atenção, visto que possibilitam a realização de medições com baixo consumo de amostra e de reagentes. Apesar de ser possível utilizar apenas dois eletrodos, muitos estudos utilizam sistemas com três eletrodos para realização de medida voltamétricas *in vivo* [48,49]. A preferência pela utilização de microeletrodos em métodos eletroquímicos apresenta as vantagens de sensibilidade elevada, baixo custo e minimização dos interferentes [50-52]. Tais sensores enzimáticos possibilitam uma ampla gama de aplicações, com relativa simplicidade.

O processo pode ser monitorado diretamente se o reagente ou o produto da reação enzimática for eletroativo, sendo neste caso o sinal dependente da difusão deste produto da solução até o eletrodo (Figura 7). No caso das oxidases, o consumo de oxigênio, a variação de pH ou a formação de peróxido de hidrogênio pode ser quantificado. Alternativamente, o processo redox correspondente à oxidação de um dos analitos pode ser feito por mediadores (biossensores de segunda geração) ou por “fios” de material orgânico, com capacidade de transferir elétrons (eletrodos de terceira geração). Dentre os métodos eletroquímicos, o amperométrico é o mais usado e quando a glicose é o analito alvo, a maioria dos biossensores utiliza a flavoenzima *glucose oxidase* (GOx) [6, 53, 54] para bio-

transformar o analito. Esta preferência se deve a diversos fatores, dentre os quais a elevada estabilidade desta enzima, a sua elevada cinética de reação, seu baixo custo e à facilidade de detecção do produto da reação (H_2O_2).

Figura 7: Representação básica de um biossensor enzimático com detecção eletroquímica.

Neste trabalho, os sensores para detecção de glicose foram concebidos através da eletrodeposição de um metal (no caso a platina) sobre a superfície de platina ou de cobre e, em seguida, a GOx, visando produzir um sistema em que houvesse contato íntimo entre a enzima e o eletrodo de trabalho, possibilitando assim uma transferência de elétrons direta advindos da redução do co-fator da GOx, $\text{FAD}(\text{H}_2)$, de acordo com a reação:

A escolha desses procedimentos envolvendo somente a deposição de GOx visava alcançar uma condição que pudesse levar a formação de um filme de enzimas uniformemente distribuído e com uma concentração elevada de GOx para assegurar alta atividade enzimática e grande estabilidade [55-57].

2.2. ELETRODEPOSIÇÃO

Eletrodeposição é um processo eletroquímico onde material eletroativo (geralmente metais) são depositados sobre uma superfície condutora. A camada formada pode ter propriedades diversas, desde a proteção à corrosão, a catálise de reações, o aumento da área reacional ou até mesmo a proteção da superfície do sensor com relação a interferentes. A seguir serão abordados alguns aspectos relativos às eletrodeposições de metais, de enzimas e de polímeros, que foram realizadas neste trabalho.

2.2.1. Eletrodeposição de Metais

A eletrodeposição de metais tem grande importância tecnológica em todo processo de galvanização, pois é bastante utilizada na indústria, visando a proteção de metais menos nobres. O melhoramento da superfície do metal está relacionado com a formação de camadas mais estáveis sobre a sua superfície

A utilização de metais nobres na deposição eletroquímica visa além da proteção da superfície do sensor, explorar as suas propriedades catalíticas, tendo ainda a vantagem de proporcionar um significativo aumento de área. A eletrodeposição de um material catalítico é um método simples e de baixo custo, visto que uma (ou algumas) camada(s) já é suficiente para catalisar as reações.

Para a deposição de metais nobres e também de filmes poliméricos, a literatura descreve numerosos processos, utilizando diferentes soluções de eletrólitos. Para obter depósitos de platina (e também de outros metais) com características favoráveis sobre diferentes substratos, por exemplo, metais [58-62], semi-condutores [63-65] e polímeros condutores [66-72], diferentes procedimentos experimentais levam à formação de filmes ou estruturas com características

diferenciadas. Em diversos casos, os estudos experimentais são dirigidos ao esclarecimento das propriedades específicas das soluções do eletrólito e de seu papel na morfologia da eletrodeposição [9,58-62], à busca de condições apropriadas para produzir polímeros modificados nos eletrodos de trabalho [66], ao exame da dispersão das micropartículas do metal na superfície ou dentro da matriz do polímero para avaliar a atividade catalítica das reações eletroquímicas sobre o eletrodo de trabalho [73,74].

Os metais do grupo da platina na presença de cloreto formam complexos que proporcionam a deposição de cristais de tamanho nanométricos, mostrado em estudos de microscopia [75]. Em outro estudo [76] foi demonstrado que a deposição de platina a partir de hexacloroplatinato de amônio em presença de tampão fosfato é muito dependente do potencial de deposição. Depósitos realizados a $-0,5$ e $-0,6$ V apresentam superfícies com morfologias nanocristalinas muito diferentes das geradas por deposições realizadas a $-0,4$ ou ainda a $-0,7$ ou $-0,8$ V. Estudo voltamétrico destes eletrodos mostraram que a variação de corrente para tais eletrodos é concordante com as características visualizadas em estudos por microscopia. Eletrodos com platina depositada a $-0,5$ V apresentaram um aumento superior a 10 vezes em suas correntes, comparado a eletrodos sem nenhuma deposição. Para os eletrodos com depósitos realizados a $-0,7$ e $-0,8$ V, um acréscimo da ordem de (apenas) duas vezes foi verificado.

Uma distinção importante na formação de nanocristais utilizando-se a eletrodeposição é a sua elevada área superficial [77]. A formação de uma película platina após a eletrodeposição é responsável pelo aumento da área superficial do eletrodo, tornando o transporte de materiais mais eficiente [78]. Os elétrodos platinizados apresentam excelentes sensores amperométricos para a detecção de

diversas espécies analíticas, dentre as quais destaca-se o peróxido hidrogênio, espécie para a qual responde em uma larga faixa de concentração com excelente reprodutibilidade e elevada precisão [79].

Desta forma, a platinização do eletrodo é uma estratégia adequada para aumentar a sensibilidade do biossensor [80]. A literatura mostra um significativo número de estudos sobre a platinização de eletrodos, onde são utilizadas diferentes soluções de platina e as mais variadas metodologias para a deposição do metal, havendo ainda muitas controvérsias sobre o assunto [81]. Kim e Oh [10] verificaram o efeito do potencial de platinização na rugosidade do eletrodo, bem como na resposta amperométrica para glicose após a imobilização da GOx, albumina de soro bovino e glutaraldeído. Estes autores constataram que os eletrodos platinizados apresentaram respostas amperométricas 30-40 vezes maiores que os eletrodos que foram apenas polidos. Adicionalmente, verificaram que quando a superfície foi platinizada e condicionada, ocorreu uma diminuição das respostas eletroquímicas aos sacarídeos e outras espécies eletroativas como o ascorbato, que interfere com a detecção amperométrica da glicose. Entre as estratégias usadas para diminuir o sinal dos interferentes pode-se citar a utilização de membranas e de mediadores para revestir a superfície do sensor a ser utilizado em medidas amperométricas.

2.2.2. Eletrodeposição de Polímeros

Matrizes poliméricas preparadas eletroquimicamente com pirrol [82-85], 1,2-diaminobenzene [86-88], anilina [50] e fenol [89] são usadas com sucesso para minimizar o efeito de espécies eletroativas interferentes tais como, ácido ascórbico, ácido úrico e paracetamol sobre a superfície de biossensores amperométricos [90-92]. Algumas características fundamentais que o filme polimérico deve apresentar

após estar formado na superfície do eletrodo são uma boa estabilidade, e uma boa compatibilidade com o material biológico do próprio biossensor. É ainda desejável que apresente características estruturais que favoreçam a difusão do analito para o interior do sensor, que minimize o contato do eletrodo com espécies interferentes e que não sofra deposição de material (como proteínas e lipídeos) em sua superfície, o que afetaria a resposta do sensor.

A eletropolimerização torna possível o revestimento da superfície do eletrodo pela formação de um filme polimérico oriundo de monômeros como 1,2-diaminobenzeno [10,93], que permite a permeação do analito, reagente ou produto alvo e confere certa seletividade ao transdutor. Na literatura, duas estratégias diferentes predominam: (i) a enzima pode ser colocada sobre a superfície do eletrodo antes ou após a formação do polímero, e (ii) a imobilização da enzima no filme polimérico pode ser feita em uma única etapa de eletropolimerização não importando a forma geométrica do eletrodo. Esta é uma característica favorável, de importância para a construção de eletrodos miniaturizados. Vantagens adicionais desse sistema são: a) o ajuste e controle da espessura do filme com base na carga utilizada durante a sua formação; e b) a capacidade dos filmes formados de excluir os interferentes com base no tamanho molecular.

Os filmes de poli(1,2-diaminobenzeno), ao contrário dos filmes de polipirrol, possuem seletividade excepcional, geralmente são menos espessos (o que facilita a difusão de substratos e produtos), são uniformes, homogêneos e reprodutíveis [92].

As membranas eletropolimerizadas de poli(1,2-diaminobenzeno) (=PPD) começaram ser utilizadas em 1958 quando o mecanismo da reação de eletropolimerização começou a ser bem estudado [94-97]. As membranas de PPD

são usadas extensamente nos eletrodos amperométricos devido a sua alta capacidade seletiva [98]. Os biossensores que imobilizam PPD apresentam uma variedade de propriedades sendo uma delas a sustentabilidade para o monitoramento da glicose *in vivo* [88,98]. Estes atributos incluem tempo de respostas rápidas e lineares sobre a escala de concentração de interesse, eliminando além dos interferentes, outras espécies que aderem à superfície do biossensor como proteínas e lipídios. A incorporação da enzima em solução de monômeros é uma estratégia freqüentemente usada em biossensor de PPD [98-104]. As duas principais vantagens do PPD são sua seletividade para o transporte da enzima GOx e do peróxido de hidrogênio [88, 104, 105] e espessura ultrafina dos filmes formados (0-100 nm), permitindo a imobilização eficiente de enzimas muito próximas ao eletrodo [86, 98, 100, 106].

2.3. MEMBRANAS SELETIVAS

Diversos países têm promovido programas especiais direcionados à criação e ao estudo de novos biomateriais para serem aplicados na área médica. Tais materiais devem ter como característica: biocompatibilidade, resistência, baixa elasticidade, propriedades de adsorção seletiva, porosidade e insolubilidade em água. As três membranas mais utilizadas na construção de biossensores são: acetato de celulose, Nafion[®] e poliuretano. Estas membranas não são somente utilizadas para excluir proteínas, como também para retardar o transporte das espécies aniônicas que atuam como interferentes na determinação de glicose por biossensores eletroquímicos.

A preparação de filmes com estes materiais pode ser feita pela simples transferência de alguns microlitros para a superfície do eletrodo estático (=drop casting), para a superfície de um eletrodo sob rotação de velocidade conhecida

(=spin coating) ou ainda pela imersão do eletrodo na solução do material a ser depositado (=deep coating). Em todos os casos, busca-se a deposição de tais membranas da maneira mais uniforme possível, para evitar diferenças em sua espessura. Na composição do solvente onde se encontra dissolvida a membrana, é necessário levar em consideração aspectos como: quantidade de água presente, taxa de evaporação, umidade e temperatura ambiente do depósito [107] para obtenção de uma superfície altamente reprodutível.

O acetato de celulose é um polímero essencialmente rígido com alguma flexibilidade devido às pontes de hidrogênio originadas pelos grupos de hidroxilas existentes na estrutura. A membrana de acetato de celulose tem um importante emprego na área clínica, nos processos de diálise onde é escolhida devido a ser possível alcançar um elevado grau de controle de seus poros durante o processo de construção. No caso dos biossensores, a permeabilidade desta membrana tem como objetivo a minimização de interferentes.

Nafion[®] é um ionômero de ácido perfluorosulfônico fabricado com exclusividade pela DuPont, estando disponível em forma de baixo peso equivalente, o qual é solúvel em alcoóis de baixo peso molecular. Pode também ser obtido como uma solução etanólica a 5% (m/m - Aldrich). Por possuir carga negativa devido à presença de grupos sulfonatos, uma membrana formada deste material é capaz de concentrar as espécies catiônicas e de excluir as aniônicas como ascorbato e urato. Estas membranas são depositadas em superfície de sensores com espessuras em torno de 1000 Å [108], sendo estudada extensivamente em uma variedade de aplicações eletroquímicas [109-112].

Membranas poliméricas inertes geralmente são utilizadas na parte externa do biossensor. A literatura traz um grande número de estudos [113] envolvendo o uso

de poliuretano como um material biocompatível podendo ser incluído como uma membrana protetora nos sensores implantáveis de glicose. Infelizmente, o poliuretano disponível comercialmente tem uma variação média do peso molecular, possuindo diferença entre os grupos funcionais. Portanto, as propriedades de transporte deste material como filme diferem consideravelmente de acordo com a sua fonte.

2.4. INTERFERENTES

A utilização de biossensores amperométricos para a quantificação de diferentes analitos em meios complexos como o que constitui os fluidos biológicos, visando o diagnóstico clínico, é afetada por diversos fatores, dentre os quais a presença de espécies eletroativas interferentes [114, 115]. Tais interferentes são espécies que respondem eletroquimicamente no mesmo potencial escolhido para o analito, alterando a resposta obtida.

No caso de um biossensor de glicose as espécies (Figura 8) interferentes mais comuns encontradas no sangue e em função do pH estão o ácido ascórbico e o ácido úrico (ambos com cargas negativas) [116] e o paracetamol (sem carga) [117].

Figura 8: Principais moléculas interferentes encontradas em matrizes biológicas, ou melhor, sangue quando determina-se glicose usando se biossensor enzimático. a) paracetamol, b) ácido ascórbico e c) ácido úrico.

Para a grande maioria dos biossensores amperométricos descritos na literatura, a quantificação da glicose requer a aplicação de um potencial positivo para a determinação deste analito. Infelizmente nesta condição, consegue-se também detectar os interferentes citados acima.

Existem diferentes maneiras de se minimizar o efeito destas espécies eletroativas: Uma forma utiliza a imobilização de um mediador junto com a enzima, que tem a função de alterar (abaixar) o potencial de detecção da glicose. Outra forma para contornar o problema é a formação de membranas poliméricas com capacidade de excluir os interferentes por tamanho ou por carga. Um procedimento alternativo é a utilização de outra(s) enzima(s) imobilizada(s) junto ao sensor, de forma a consumir a espécie interferente antes de sua detecção.

Até o momento não se tem uma condição satisfatória, que elimine completamente o sinal gerado por estas espécies. Felizmente, no caso da glicose em sangue, a concentração do analito de interesse é sempre muito superior ao dos interferentes, de forma que os sinais destes interferentes minimizados pela utilização dos filmes poliméricos se tornam pouco significativos.

Mais grave que a contribuição dos interferentes é o bloqueio superficial de sensores eletroquímicos causado por proteínas, lipídeos e outras espécies presentes no sangue, fator que ainda se constitui no principal limitante para o monitoramento contínuo de glicose por médios e longos períodos.

2.5. ESTERILIZAÇÃO DE SENSORES

Esterilidade é uma das pré-condições essenciais para a aplicação prática de materiais e dispositivos implantáveis. Esterilização é um processo que promove completa eliminação ou destruição de (quase) a totalidade das formas de

microorganismos presentes: vírus, bactérias, etc, para garantir um nível aceitável de segurança ao usuário. Para alcançar um grau de esterilidade adequado, existem diversos processos disponíveis, destacando-se os que envolvem radiação, aumento de temperatura (ex: autoclavagem) e processos químicos (ex: óxido de etileno) [118].

No caso dos biossensores, a esterilização por radiação permite o controle da temperatura e pode ser aplicada sem significativa degradação das enzimas. A aplicação de métodos térmicos ou químicos é muito mais prejudicial ao material enzimático.

A ação esterilizante se processa através da alteração da composição molecular das células, as quais sofrem perda ou adição de carga elétrica (ionização), ficando carregadas negativa ou positivamente. A esterilização por radiação se divide em duas categorias: radiação ionizante e não ionizante. A radiação ionizante é obtida através dos Raios Gama (^{60}Co) ou via acelerador de elétrons. A ação antimicrobiana da radiação ionizante se dá através de alteração da composição molecular das células, modificando seu DNA. A radiação não ionizante é gerada na maioria das vezes por luz ultravioleta (λ típicos: 240 a 320 nm), possui um baixo poder de penetração e requer períodos muito mais longos para alcançar resultados satisfatórios [119,120].

Nesta dissertação serão apresentados os resultados com os biossensores amperométricos desenvolvidos para a detecção de glicose. A seguinte sequência foi necessária para a construção dos biossensores miniaturizados, utilizando como base fios de cobre com 180 μm de diâmetro: *a*) platinização; *b*) a imobilização da GOx; *c*) formação do poli(1,2-diaminobenzeno) e agentes de estabilização; *d*) adição de membranas (deep coating) objetivando impedir a passagem de

interferentes (em especial o ácido ascórbico, ácido úrico e paracetamol) e minimizar os efeitos de passivação da superfície do biossensor quando utilizado em uma matriz complexa como o sangue. Assim, o enfoque principal deste trabalho foi de desenvolver um dispositivo eletroquímico miniaturizado, com uma superfície externa biocompatível, permeável e seletiva para ser utilizado na detecção da glicose, de maneira sensível e reprodutível.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Glicose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4, tipo VII de *Aspergillus niger*, 196 UI/mg), 1,2 diaminobenzeno (PPD), Triton X-100, albumina de soro bovino 96%, β -D-glicose, hexacloroplatinato (IV) de potássio, peróxido de hidrogênio 30%, ácido úrico, ácido ascórbico, 4-acetamidofenol e ácido clorídrico foram adquiridos de Sigma-Aldrich e usados como recebidos. Poli vinil-formol da Polysciences foi preparado em clorofórmio (concentração = 1%). Cloreto de potássio, acetato de chumbo, di-hidrogeno fosfato de sódio e mono-hidrogeno fosfato de potássio tiveram procedência Merck. Nafion[®] 117 e o poliuretano foram fornecidos da Fluka. Solução tampão fosfato (TF) foi preparada por mistura de quantidades adequadas de sais de fosfato 0,05 mol dm⁻³ (pH = 7,2). Todas as soluções empregadas nos experimentos voltamétricos e amperométricos foram convenientemente diluídas com o eletrólito suporte. As soluções foram preparadas com água de elevada pureza, que passou por processo de dupla filtração, seguida de osmose reversa e finalmente foi deionizada (resistividade ≥ 18 M Ω cm) em um sistema Milli-Q Millipore. A solução de glicose (preparada em meio tamponado) foi utilizada após 24 h de repouso a temperatura de 22 ± 3 °C para permitir a mutarrotação da glicose de procedência Merck. O nitrogênio usado para experimentos na ausência de oxigênio foi de alto grau de pureza (99,99% em N₂). Todos os experimentos foram conduzidos a temperatura ambiente.

3.2. EQUIPAMENTOS

Para realizar as medidas voltamétricas e amperométricas foram empregados os sistemas Potenciostato/Galvanostato μ AUTOLAB Type III da Eco-Chemie

acoplado ao software GPES versão 4.9005 β . As medidas de pH foram efetuadas utilizando-se pH-metro modelo 654 acoplado a um eletrodo de vidro modelo 6.0203.100 (OE), ambos da Metrohm.

3.3. CÉLULA ELETROQUÍMICA E ELETRODOS (sistema sobre agitação)

Foi utilizada uma célula eletroquímica convencional com três eletrodos (5 mL de capacidade), confeccionada em nosso laboratório, em acrílico. Na tampa foram feitos orifícios para adaptação dos componentes da célula e de tubulação para entrada e saída de nitrogênio.

Os eletrodos utilizados foram:

- i) eletrodo de trabalho: fios de platina ($d = 0,2$ mm) ou cobre ($d = 0,18$ mm) modificados por deposição de platina ou não modificados. O processo para a deposição de platina, bem como outras modificações do eletrodo serão descritas mais adiante.
- ii) eletrodo auxiliar: agulha em aço inoxidável (d.i. 0,5 mm e d.e. 0,8 mm).
- iii) eletrodo de referência: fio de Ag (d.i. 0,2 mm) em cuja extremidade foi formado um depósito de AgCl. Alternativamente, um eletrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{KCl sat}}$ foi utilizado.

Figura 9: Materiais utilizados na construção do biossensor de glicose. a) agulha de aço inox, b) fio de prata, c) fio de cobre e d) fios de cobre para contato elétrico.

3.3.1. Construção dos Eletrodos (trabalho, referência e auxiliar)

Os fios utilizados para a construção dos eletrodos de referência foram isolados eletricamente com o poli-vinil formol (~1%), para evitar o contato elétrico entre a parede da agulha de aço inoxidável. Após a secagem do poli-vinil formol, o eletrodo de referência e o de trabalho (previamente isolados) foram posicionados no interior da agulha de aço inoxidável (30 mm de comprimento x 0,8 mm de diâmetro) sendo então a agulha preenchida com resina epóxi (araldite®). Nesta etapa foi utilizado epóxi que requer aproximadamente 24 h para curar, o que favorece a etapa de montagem dos sensores. O contato elétrico de cada eletrodo foi feito por soldagem de um fio de cobre (diâmetro = 0,4 mm) na extremidade oposta. Na Figura 10 é apresentada a vista lateral e frontal do conjunto obtido.

Figura 10: Vista lateral (A) e frontal (B) do sistema (ET, EA e ER) sem modificação. Magnitude de 50x.

3.4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.4.1. Pré-tratamento da Superfície dos Eletrodos

Antes de iniciar os experimentos eletroquímicos, as superfícies dos eletrodos foram submetidas a polimento com lixas (d'água) de diferentes granulometrias (600, 1200 e 2000), cada etapa seguida da lavagem com jatos de água e submissão a ultra-som por 5 min. Quando reusados, os eletrodos eram lavados, polidos e

sonicados como descrito anteriormente. Na Figura 11, são apresentados os aspectos da superfície do arranjo miniaturizado de três eletrodos antes e depois da limpeza mecânica.

Figura 11: Aspecto da superfície do microsensor antes (A) e depois (B) da limpeza. Em evidência os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar. Magnitude de 40x.

3.4.2. Preparação dos Eletrodos de Referência

Para a preparação dos eletrodos de referência, foi aplicado um potencial de 0,3 V sobre um fio de prata durante 900 s imerso em uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol dm⁻³. Este procedimento permitiu a deposição de um filme espesso de AgCl sobre a superfície do fio de prata.

3.4.3. Modificação da Superfície do Eletrodo de Cobre

Duas formas de eletrodeposição da platina foram testadas, sendo a primeira com um potencial fixo e a segunda com variação do potencial.

- *Eletrodeposição da platina sobre o eletrodo de cobre aplicando um potencial constante*

A platinização potencioestática dos eletrodos de cobre foi conduzida em potenciais de -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 V vs Ag/AgCl_{KCl sat} em uma solução contendo 2 mmol dm⁻³ de H₂PtCl₆ + 2.10⁻⁵ mmol dm⁻³ de Pb(C₂H₃O₂), em meio de

0,1 mol dm⁻³ de KCl durante um tempo de 600 s, na ausência de agitação [99]. Os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos a temperatura ambiente.

- *Eletrodeposição da platina sobre o eletrodo de cobre aplicado potencial variado*

A platinização dos eletrodos de cobre passou a ser feita com a aplicação de degraus de potencial, permitindo assim a reposição de material junto à superfície do eletrodo. Foram testados potenciais alternados e tempos distintos em cada etapa, visando melhorar o depósito da platina sobre o eletrodo. Degraus utilizando 1 segundo de deposição, seguido de 5 segundos para a reposição do material eletroativo foi a condição mais satisfatória. Os potenciais aplicados por 1 s foram de -0,100, -0,200, -0,300, -0,400 e -0,500 V Ag/AgCl_{KCl sat}, e os potenciais de repouso (5 s) testados foram 0,000, -0,025, -0,050, -0,075 e -0,100 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, em uma solução contendo 1,0 % de H₂PtCl₆ + 0,008% de Pb(C₂H₃O₂) sem agitação [10]. Os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos a temperatura ambiente.

3.4.4. Imobilização da *Glicose Oxidase (GOx)*

A imobilização da GOx sobre eletrodos de cobre platinizado foi feita variando a concentração da enzima de 200 a 1000 unidades internacionais (UI) / mL. A melhor concentração para a eletrodeposição da enzima 600 unidades / mL. O processo de imobilização consistiu em, inicialmente, imergir cada eletrodo na solução enzimática por 5 min (permitindo assim a difusão das enzimas na matriz platinizada) seguida da aplicação de um potencial de 1,3 V vs Ag/AgCl_{KCl sat} durante 900 s, em solução TF 0,05 mol dm⁻³ (pH 7,2) na presença de 0,02 % de Triton X-100 [121], sob agitação e a temperatura ambiente. De acordo com a literatura, a força motriz para a imobilização é a precipitação da enzima na superfície do eletrodo como consequência de uma diminuição local de pH originada pela produção de

oxigênio devido à oxidação da água [122]. Para cada nível de concentração de GOx, foram preparados cinco eletrodos.

3.4.5. Polimerização do 1,2 diaminobenzeno (PPD)

Duas formas foram utilizadas para a eletropolimerização do PPD, a primeira com um potencial fixo e a segunda variando o potencial.

- *Eletropolimerização do PPD com um potencial fixo*

A eletropolimerização de PPD foi realizada em TF 0,05 mol dm⁻³ (pH 7,2) contendo PPD 5 mmol dm⁻³ e 5% de albumina de soro bovino (ABS) por aplicação de um potencial de 0,65 V vs Ag/AgCl_{KCl sat} durante 150, 300, 450 e 900 s. Em seguida, cada eletrodo foi lavado e acondicionado em TF a uma temperatura de 4°C, em geladeira.

- *Eletropolimerização do PPD com variação de potencial*

A eletropolimerização de PPD foi realizada em TF 0,05 mol dm⁻³ (pH 7,2) contendo PPD 5 mmol dm⁻³ e 2,5% ABS por voltametria cíclica (VC) em uma janela de potencial de 0 a 0,55 V vs Ag/AgCl_{KCl sat} variando o número de ciclos voltamétricos (10, 15, 20 e 40). As alterações ocorridas nesta etapa tinham como objetivo uniformizar o filme formado na superfície do eletrodo, visando minimizar os efeitos de alguns interferentes como o paracetamol e ácido ascórbico. Em seguida, cada eletrodo foi lavado e acondicionado em TF a uma temperatura de 4 °C, em geladeira.

3.4.6. Formação de Filmes

As membranas usadas com intuito de minimizar espécies interferentes eletroativas foram o Nafion[®] e poliuretano.

- *Formação do filme de Nafion[®]*

Para a formação do filme de (NA) utilizaram-se soluções de Nafion[®] 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%, preparadas a partir da solução estoque comercial a 5% utilizando como solvente álcool etílico. Em seguida, o biossensor era imerso nestas soluções durante 10 segundos e deixado para secar a temperatura ambiente por uma hora. Após isso os eram condicionados em tampão fosfato e mantidos em geladeira a uma temperatura de 4 °C.

- *Formação do filme de poliuretano*

A formação do filme de poliuretano (PU, adquirido na forma de pequenas esferas) foi realizada a partir de sua pesagem e solubilização em solução de DMF e THF (4,0% DMF e 96% THF) sob agitação. As soluções obtidas (m/v) foram diluídas nas mesmas concentrações utilizadas para as soluções de Nafion[®]. Os demais procedimentos foram similares aos descritos no item anterior.

3.4.7. **Determinação de Glicose em Amostras Reais**

Medidas amperométricas foram realizadas com cada eletrodo modificado, antes e após exposição a sangue, sendo aplicado potencial de detecção de 0,4 V. A solução era agitada durante as medições. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura de 22° C $\pm$ 3° C. A exposição do eletrodo modificado às amostras de sangue foi feita por imersão em frasco de polietileno (V = 2,0 mL) contendo 1,0 mL de sangue humano.

Para possibilitar a comparação entre métodos, medidas amperométricas e determinações espectrofotométricas foram realizadas simultaneamente utilizando soluções injetáveis de glicose 50%, estéreis.

3.4.8. Desenvolvimento de Processo de Esterilização

Os biossensores de glicose foram preparados e após avaliar suas respostas à glicose (tomando-se cuidados para minimizar a contaminação) foram acondicionados em sacos de polietileno próprios e submetidos a dois processos de esterilização: (i) irradiação em acelerador de eletrons; e (ii) irradiação utilizando uma fonte de ^{60}Co (GamaCell) no Centro de Tecnologia das Radiações - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Comissão Nacional de Energia Nuclear, São Paulo - SP - Brasil. No primeiro processo, utilizando o acelerador de elétrons, os sensores foram submetidos a duas doses cumulativas de 12,5 KGy por tempo de um segundo. No segundo processo, utilizando irradiação com ^{60}Co , dois procedimentos foram testados: foram feitas aplicações de 24 doses cumulativas de 1,04 KGy em intervalos de seis minutos (duração total: 2 h, 24 min). O segundo procedimento envolveu a aplicação de 25 KGy, num período de sete horas. Para minimizar os efeitos deletérios devido ao aumento da temperatura durante os tratamentos, os biossensores foram acondicionados em recipientes de isopor contendo gelo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. PLATINIZAÇÃO DOS ELETRODOS DE COBRE

4.1.1. Platinização dos Eletrodos de Trabalho Aplicando Potencial Constante

No início dos trabalhos, foram construídos sensores utilizando fios de platina finos (diâmetro 0,2 mm). Com o andamento dos trabalhos, optou-se por buscar formas alternativas, de menor custo, que permitisse o descarte do sensor após a sua utilização. Fios de cobre finos, utilizados para a construção de bobinas de motores elétricos, cuja superfície externa já se encontra isolada, foram utilizados para substituir a platina.

A platinização potencioestática dos eletrodos de cobre em potenciais fixos entre $-0,1\text{V}$ e $-0,5\text{V}$ vs $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{KCl sat.}}$ durante 600 s resultou na formação de depósitos uniformes de platina negra, que aumentou com a diminuição do potencial em regiões mais catódicas como se pode verificar na Figura 12. Esses depósitos de platina mostraram-se mecanicamente estáveis e muito bem aderidos à superfície do cobre.

a) $-0,1\text{ V}$ b) $-0,2\text{ V}$ c) $-0,3\text{ V}$ d) $-0,4\text{ V}$ e) $-0,5\text{ V}$

Figura 12: Vista frontal dos microsensores de cobre platinizados em solução contendo hexacloro platinato de potássio, acetato de chumbo e cloreto de potássio durante 600 s. O fio de prata (eletrodo de referência) é o mais claro e o fio mais escuro, o platinizado. Magnitude de $\sim 25\times$.

Analisando as respostas potencioestáticas deste grupo de eletrodos (ver Figura 13), fica evidente que, geralmente, no início do processo de platinização há um gradual aumento de corrente, provavelmente devido à imediata formação de

depósitos de platina negra, que provoca um significativo aumento da área superficial do eletrodo. Para o experimento realizado a $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$, este comportamento não foi observado. Possivelmente, neste potencial, a deposição não é completa, visto que a carga total foi bem inferior à registrada nos outros experimentos. Experimentos realizados utilizando nitrato em lugar de cloreto como eletrólito suporte, mostraram que para os depósitos realizados a $-0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}_{\text{KCl sat}}$, o sinal registrado é similar aos obtidos nos demais potenciais. Não se encontrou uma explicação definitiva para este fato. Talvez as estabilidades dos complexos de cobre e especialmente de platina, somadas às variações de área, são potenciais causas destas diferenças.

Figura 13: Respostas potencioestáticas da eletrodeposição de platina em eletrodos de cobre em diferentes potenciais (vermelho: $-0,1 \text{ V}$; azul $-0,2 \text{ V}$; rosa $-0,3 \text{ V}$; verde $-0,4 \text{ V}$ e preto $-0,5 \text{ V vs Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$). São mostrados apenas os primeiros 100 s.

O estudo do comportamento voltamétrico destes eletrodos demonstrou que, apesar de ter sido depositada uma quantidade equivalente de platina sobre os eletrodos de cobre, a morfologia dos mesmos não é igual, uma vez que as correntes registradas se tornam muito diferentes. Essa variação pode ser evidenciada pelo comportamento voltamétrico do eletrodo de cobre platinizado e não platinizado em

TF apresentado na Figura 14. O perfil corrente-potencial observado nessa figura corresponde à primeira varredura registrada para o eletrodo de cobre recém-polido e eletrodo de cobre platinizado. Com o deslocamento do potencial de deposição para regiões mais negativas, há um aumento gradual do perfil voltamétrico dos eletrodos modificados quando comparado com o eletrodo não modificado, comprovando o aumento da área superficial destes eletrodos [10].

Figura 14: Voltamogramas cíclicos obtidos para eletrodo de cobre (a) e eletrodos de cobre platinizados em diferentes potenciais (b, -0,1 V; c, -0,2 V; d, -0,3 V; e, -0,4 V, e f, -0,5 V vs Ag/AgCl_{KCl sat.}) em solução tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0,0 a 0,7 V.

4.1.2. Platinização dos Eletrodos de Trabalho Aplicando um Potencial Variado

A metodologia de deposição inicialmente adotada (potencial constante) gerou sensores com baixa reprodutibilidade, o que se constituía em um problema a ser solucionado. Mudanças no processo de platinização foram introduzidas objetivando sobrepujar esta barreira. A técnica de deposição agora utilizada consistiu na aplicação de dois degraus de potencial durante 1 e 5 segundos alternadamente.

Testes realizados com potenciais de -0,1, -0,2, -0,3, -0,4 e -0,5 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, durante um segundo e 0,0 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, durante cinco segundos com 20 ciclos comprovaram que o melhor potencial para se trabalhar com esta técnica é de -0,10 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}. A platina aderida na superfície se mostrou menos porosa do que em potenciais mais negativos, aumentando a reprodutibilidade como evidenciado nos experimentos relatados mais adiante.

Outro estudo que foi realizado para a platinização foi variar o potencial de 0,0 V para -0,025, -0,050, ou -0,075 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}. Eletrodos de cobre platinizados nas condições -0,10 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, por 1 segundo e -0,075 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, por 5 s em 20 ciclos apresentaram uma reprodutibilidade bem maior, se comparados ao processo anterior (o desvio estimado foi de 15,0%). Com a platinização sendo realizada por este novo procedimento, em um potencial mais baixo, obteve-se um potencial de detecção da glicose de 0,40 V vs Ag/AgCl_{KCl sat}, minimizando os efeitos dos interferentes.

4.2. COMPARAÇÃO ENTRE AS ÁREAS DOS ELETRODOS DE COBRE

Uma das questões levantadas durante o desenvolvimento do presente trabalho foi com relação à reprodutibilidade da área dos eletrodos assim construídos. Voltamogramas cíclicos de tais eletrodos de cobre (sem platinização) com diâmetro de 0,18 mm apresentaram uma variação de área relativamente pequena (da ordem de 5,0% para mais ou para menos) como é mostrado na Figura 15.

Figura 15: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de cobre com diâmetro de 0,18 mm em solução de NaOH 0,15 mol dm⁻³. $V = 0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Fica evidenciado que não há uma variação significativa nas dimensões do fio de cobre utilizados na construção dos biossensores, uma vez que variações de 5% na área do eletrodo, correspondem a alterações no diâmetro entre 0,176 e 0,184 mm, o que é aceitável para a aplicação desejada.

4.3. COMPORTAMENTO ELETROCATALÍTICO DA SUPERFÍCIE DO ELETRODO PLATINIZADO

Para verificar a atividade eletrocatalítica dessa nova superfície para a oxidação de peróxido de hidrogênio, foram construídas curvas voltamétricas. Voltamogramas de varredura lineares obtidos para peróxido de hidrogênio em microeletrodos de cobre revestidos com platina são mostrados na Figura 16. No eletrodo de cobre (sem revestimento de platina) a atividade redox não é evidenciada no intervalo de potencial aplicado. Ao contrário, o eletrodo modificado (platinizado) exibiu resposta anódica a partir de 0,25 V. Assim, a deposição de platina resultou em

diminuição significativa no sobrepotencial, podendo a princípio minimizar os efeitos dos interferentes sobre a superfície do biossensor.

Figura 16: Voltamogramas de varreduras lineares obtidos para eletrodo de cobre (A) e eletrodo de cobre platinizado em $-0,5$ V por 600 s (B) em solução tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ antes (a) e após (b) adição de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ de peróxido de hidrogênio. $v = 0,1 \text{ V s}^{-1}$; intervalo de potencial de 0,0 a 0,7 V.

A Figura 17 mostra as respostas amperométricas obtidas a 0,4 V utilizando o eletrodo de cobre platinizado para injeções sucessivas de peróxido de hidrogênio no intervalo de $(0 - 2,1) \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

Figura 17: Sinais amperométricos registrados para injeções sucessivas de 150 µmol dm^{-3} de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, sob agitação, utilizando eletrodo de cobre platinizado. Potencial aplicado = 0,4 V.

O eletrodo modificado responde rapidamente a incrementos na concentração de peróxido, atingindo estados estacionários dentro de poucos segundos (3-4 s). A

causa da instabilidade observada nas injeções finais não está muito clara. Uma das possibilidades levantadas foi à geração de O_2 na superfície do eletrodo, que talvez tenha causado esta instabilidade.

4.4. IMOBILIZAÇÃO DA *GLICOSE OXIDASE* (GOx)

Inúmeros métodos têm sido desenvolvidos para a deposição eletroquímica de enzimas em eletrodos sólidos como parte da fabricação de biossensores. Na literatura é descrito um procedimento envolvendo a eletrodeposição direta de GOx em eletrodos de platina na presença de um detergente não-iônico, que propiciou a formação de multicamadas de enzimas bem uniformes [121]. Segundo os autores, não há efeito migratório das moléculas de enzimas (pois estão carregadas negativamente quando em TF, pH 7,2) em direção ao eletrodo anodizado, devido a menor mobilidade destas moléculas quando comparada com as das espécies aniônicas presentes na solução eletrolítica. Outros autores sugerem que imobilização da enzima na superfície do eletrodo é consequência de uma diminuição local de pH originada pela produção de oxigênio devido a oxidação da água [10,121-124], o que favoreceria a sua precipitação. O uso de um detergente não iônico como o Triton X-100 auxilia na deposição de enzima pelo fato de que suas micelas apresentarem tamanho semelhante ao das moléculas de GOx, o que minimizaria o processo de agregação das moléculas enzimáticas e permitiria a formação de camadas uniformes de enzimas sobre o eletrodo. Uma relação entre a quantidade de enzima eletrodepositada e concentração de detergente foi evidenciada nos experimentos. A Figura 18 mostra a dependência da resposta de corrente à glicose 10 mmol dm^{-3} em eletrodo de cobre platinizado no qual GOx foi (eletro)depositada na presença de quantidades variáveis de Triton X-100. Observou-se que na ausência

ou na presença de altas concentrações de detergente a resposta é, praticamente, “zero”; a melhor resposta ocorreu quando GOx foi eletrodepositada na presença de 0,02% de detergente, comprovando resultado obtido por Matsumoto et al. [121].

Figura 18: Efeito da concentração de Triton X-100 sobre a eletrodeposição de *glicose oxidase*. Respostas de corrente para 5 mmol dm⁻³ de glicose. Potencial aplicado 0,6 V vs Ag/AgCl_{KCl sat.}

Por outro lado, ao avaliar a quantidade ideal de enzimas, as melhores respostas foram obtidas com sensores preparados em soluções com concentrações de até 400 UI/mg de GOx (ver a Figura 19). Testes subseqüentes, mostraram que os sensores com 600 UI/mg apesar de apresentarem menor sinal, tinham maior reprodutibilidade (comparação entre diferentes sensores) e maior durabilidade, o que levou à escolha desta condição para os estudos subseqüentes. Em concentrações mais elevadas de GOx, possivelmente ocorra formação de uma camada muito compacta de material enzimático, o que diminuiria significativamente a permeabilidade, dificultando tanto a chegada do substrato (glicose) e/ou do peróxido gerado até a superfície do sensor. Neste experimento, Trítion X-100 ficou constante e a concentração de enzima foi alterada.

Figura 19: Curvas tempo vs corrente para eletrodos de cobre platinizados e modificados com *glicose oxidase* em concentrações de: 200; 400; 600; 800; e 1000 UI/mg obtidas após adição de $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ de glicose em tampão fosfato $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,2. Potencial aplicado 0,6 V vs $\text{Ag/AgCl}_{\text{KCl sat.}}$.

4.5. ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO 1,2-DIAMINOBENZENO (PPD)

Em biossensores enzimáticos amperométricos as membranas são empregadas tanto para solucionar problemas relacionados com a imobilização da enzima, para minimizar a interferência de outras espécies eletroativas, como também para evitar problemas de passivação da superfície do eletrodo. Sasso et al. [98] demonstraram as vantagens da utilização de filmes de PPD eletropolimerizados para prevenir interferentes e também o envenenamento em biossensores baseados em GOx imobilizada com glutaraldeído em eletrodos de carbono vítreo reticulado revestido com platina.

A Figura 20 mostra os voltamogramas típicos da oxidação de PPD em TF (pH 7,2). A onda de oxidação parece ser completamente irreversível e em varreduras sucessivas, o pico de corrente diminuiu significativamente a cada varredura até a passivação da superfície do eletrodo. Este comportamento é indicativo da formação

de um filme polimérico na superfície do eletrodo que impede o acesso do monômero a esta superfície. Assim, indiretamente, pode-se afirmar que há evidências da formação de um filme muito compacto, isolante e evidentemente sem defeitos (buracos) [125,126].

Figura 20: Voltamogramas cíclicos de 5,0 mmol dm⁻³ do PPD em TF 0,05 mol dm⁻³, pH 7,2 em uma velocidade de varredura de 50 mV / s. Eletrodo utilizado: cobre platinizado (deposição de platina a -0,5 V vs Ag/AgCl_{KCl sat} durante 600s).

A Figura 21 mostra voltamogramas típicos da oxidação de PPD com albumina de soro bovino em TF 0,05 mol dm⁻³ (pH 7,2). A onda de oxidação parece ser completamente irreversível e em varreduras sucessivas, o pico de corrente diminuiu significativamente a cada varredura até a passivação da superfície do eletrodo. De acordo com a literatura, este comportamento é indicativo da formação de um filme polimérico na superfície do eletrodo que impede o acesso do monômero a esta superfície [127]. Estes resultados sugerem que ocorre a formação de um filme muito compacto, isolante e sem defeitos (buracos). De acordo com a figura 21, conforme se aumenta o número de ciclos inicialmente ocorre uma diminuição de corrente, para mais adiante se observar um aumento, possivelmente devido à fragmentação do filme, facilitando o acesso de analito ao eletrodo [128]. No caso de um biossensor,

este processo favoreceria por um lado o aumento de sinal, mas por outro tornaria o sensor mais suscetível à perda de enzimas por lixiviação e também deixaria o sensor mais exposto aos interferentes. Estes resultados indicaram que a formação de filmes utilizando 20 ciclos se constitui na condição mais adequada.

Figura 21: Voltamogramas cíclicos de $5,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ do PPD e 2,5 % de ASB em TF $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,2 em uma velocidade de varredura de 50 mV / s após 10 (preto), 15 (verde), 20 (azul) e 40 ciclos (vermelho). Eletrodo utilizado: cobre platinizado (deposição de platina em $-0,1$ e $-0,075 \text{ V}$ vs $\text{Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$ durante 1 e cinco segundos por 20 ciclos).

4.6. FORMAÇÃO DE MEMBRANAS DE “NAFION® E POLIURETANO”

Para a utilização de sensores em meio sangüíneo para monitoramento por longos períodos, um requisito básico é que este seja biocompatível, o que evitará o bloqueio de sua superfície, via mecanismos de defesa do organismo.

De acordo com a literatura, o poliuretano apresenta elevado grau de compatibilidade, devido às suas características físicas. Ao longo deste trabalho, teve-se dificuldades para a aquisição do produto, que foi obtido na etapa final deste mestrado.

A presença de filmes poliméricos na superfície de um biossensor por si só já altera a sensibilidade e seu intervalo dinâmico. Na ausência dos mesmos a

sensibilidade do biossensor (relativamente alta nos primeiros testes com glicose) diminui rapidamente, indicando o lixiviamento da enzima imobilizada na superfície do eletrodo.

Na presença dos filmes poliméricos as respostas dos biossensores se tornam estáveis, porém muito menor se comparadas com a sensibilidade na ausência dos filmes. Isto, obviamente, deve estar relacionado com a restrição da passagem dos reagentes (glicose e/ou O_2) e/ou do produto (H_2O_2) do que com a velocidade de transferência de elétrons.

Para avaliar o seu comportamento, foi realizado um estudo utilizando Nafion[®] (cujo comportamento é amplamente conhecido na literatura) como material de comparação. Eletrodos platinizados com filmes de poliuretano e Nafion[®] (contendo 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0% em massa) foram avaliados com a adição de peróxido de hidrogênio (Figura 22).

Figura 22: Respostas de eletrodos de cobre platinizados recobertos com membranas poliméricas: Nafion[®] (verde) e poliuretano (azul) após adições de $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$ de peróxido de hidrogênio. Concentrações de Nafion[®] e poliuretano (A: 0,5%, B: 1,0%, C: 1,5% e D: 2,0 %). Em vermelho, resposta do sensor sem membrana.

Como pode ser visto na Figura 22, poliuretano causou um elevado decaimento no sinal medido e seu desempenho foi considerado pouco promissor para a aplicação que se propõe o presente trabalho. Com base nestes resultados, optou-se por utilizar Nafion[®] nos estudos subseqüentes.

4.7. RESPOSTA DO BIOSENSOR PARA GLICOSE

Para testar a sensibilidade do sensor proposto para glicose, amperogramas de 2,5 a 32,5 mmol dm⁻³ foram construídos por adições sucessivas de 2,5 mmol dm⁻³ de glicose em uma solução de TF (Figura 23). Duas características são prontamente vistas: i) tempo de resposta do eletrodo ($t_{90\%}$) bastante rápido (6 s); ii) limite de detecção de 1,0 mmol dm⁻³ e iii) pronto estabelecimento de um novo estado estacionário indicando que a difusão de glicose para o eletrodo não é um fator limitante.

Figura 23. Amperograma obtido após injeções sucessivas de 2,5 mmol dm⁻³ de uma solução glicose 1,0 mol dm⁻³ em TF 0,05 mol dm⁻³, sob agitação, utilizando eletrodo de cobre platinizado. $E = 0,4$ V vs Ag/AgCl_(KCl sat). Curva de calibração inserida: $r = 0,996$, $I = 1,16952 + 3,04674$ [glicose].

4.8. TESTES ENVOLVENDO INTERFERENTES

Biossensores revestidos com Nafion[®] foram mais sensíveis a glicose que os revestidos com poliuretano (Figura 22). Apesar de o Nafion diminuir significativamente o sinal medido (em comparação com eletrodos contendo apenas enzimas, sem nenhuma barreira protetora) a estabilidade do sensor com tais filmes é muito maior. Na figura 24 verifica-se que após todas as etapas de construção do sensor, consegue-se minimizar significativamente em relação ao sinal da glicose o efeito dos interferentes mais comuns, o ácido ascórbico (10,5%) e paracetamol

(2,0%). No caso do ácido ascórbico, a sua interferência é minimizada devido à presença do Nafion[®], que possui a mesma carga negativa e dificulta a aproximação do ânion. Já no caso do paracetamol, provavelmente o PPD é a principal membrana responsável para o decaimento de sua resposta na determinação da glicose, devido a sua alta seletividade.

Figura 24: Amperograma registrado em TF 0,05 mol dm⁻³ seguido da adição de glicose 2,5 mmol dm⁻³, de ácido ascórbico 0,1 mmol dm⁻³, paracetamol 0,2 mmol dm⁻³ e glicose 2,5 mmol dm⁻³, $E = 0,4 \text{ V vs Ag/AgCl}_{(\text{KCl sat})}$.

4.9. DESEMPENHO DOS BIOSENSORES DESENVOLVIDOS

A presença de filmes por si só já altera a sensibilidade e o intervalo dinâmico do biossensor. Na ausência dos mesmos a sensibilidade do biossensor aumentaria, com o inconveniente lixiviamento quando utilizados apenas processos de adsorção. Adicionalmente, a possibilidade de degradação da enzima imobilizada na superfície do eletrodo torna-se maior. Na presença dos filmes poliméricos as respostas dos biossensores foram praticamente estáveis, porém diminuíram quando comparadas com a sensibilidade inicial. Isto, obviamente, deve estar relacionado com a obstrução

da passagem dos reagentes (glicose e/ou O_2) e/ou do produto (H_2O_2) do que com a velocidade de transferência de elétrons junto ao eletrodo. Na Figuras 25 pode-se verificar as respostas entre 0,0 e 12,5 $mmol\ dm^{-3}$ de glicose. Este comportamento foi acompanhado ao longo de onze dias e verificou-se um aumento de sinal de corrente até o quinto dia, porém após o oitavo e décimo primeiro houve um decaimento da ordem de 68% e 80% em relação do sinal do quinto dia. O aumento inicial de sinal pode ser causado pela somatória de diversos fatores, entre os quais uma maior hidratação das membranas, o estabelecimento de um melhor equilíbrio de transporte no interior de seus poros e conseqüente presença de eletrólito para o estabelecimento do processo eletroquímico. A partir do quinto dia, ocorreu o decréscimo de sinal, e diversos fatores podem ser apontados como prováveis causas, dentre os quais a perda da atividade da Gox ou uma eventual perda da enzima através das membranas.

Figura 25: Decaimento da resposta do biossensor com adições de 2,5 $mmol\ dm^{-3}$ de glicose em tampão fosfato 0,05 $mol\ dm^{-3}$ aplicando um $E = 0,4\ V$ vs $Ag/AgCl_{(KCl\ sat)}$. Azul após dois, vermelho após cinco dias, verde após oito dias e azul turquesa após onze dias da construção do biossensor.

A determinação de glicose em formulação farmacêutica foi utilizada para verificar o desempenho de diferentes biossensores construídos e os resultados obtidos foram comparados com aqueles provenientes do equipamento comercial (Accu Chek). Para isso soluções injetáveis de glicose 50%, estéreis foram usadas. Os resultados apresentados na tabela 5 mostram uma aproximação bastante satisfatória entre as duas metodologias.

Tabela 5: Comparação de uma amostra com o biossensor e um equipamento comercial utilizado na determinação da glicose.

Amostra	Concentração mol dm ⁻³	Amperometria ± SD ^a (mol dm ⁻³)	Accu Chek ± SD ^b (mol dm ⁻³)	Δ ^c (%)	Δ ^d (%)	Δ ^e (%)
Glicose	2,78	2,45 ± 0,53	2,55 ± 0,31	(-) 11,9	(-)8,3	(-) 4,4

a) desvio padrão para três sensores usando método amperométrico; b) desvio padrão para três diferentes determinações (com fitas para glicose) obtidas com o aparelho comercial Accu Chek; c) desvio relativo (%) entre o valor de concentração rotulado com o obtido com o método amperométrico proposto; d) desvio relativo (%) do valor da concentração do valor da amostra com Accu Chek; e) desvio relativo (%) entre os valores obtidos com método amperométrico proposto e utilizando o instrumento comercial.

Na figura 26 é apresentado o comportamento do biossensor desenvolvido após a sua imersão em uma matriz biológica complexa (sangue). O significativo decréscimo de sinal verificado era previsível, uma vez que sangue é altamente complexo e contém muitas espécies com afinidade por adsorver na superfície do sensor. Adicionalmente, é preciso também levar em conta que quando se aplica um determinado potencial (positivo ou negativo) sobre o sensor, espécies de cargas opostas a este potencial serão atraídas o que favorecerá a ocorrência do bloqueio de sua superfície.

Figura 26: Resposta do biossensor com adições de 5 mmol dm⁻³ de glicose em tampão fosfato antes de imergir em sangue (preto), imerso em sangue (verde) e em tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³ após a imersão em as

4.10. RESULTADOS DA IRRADIAÇÃO

Para a esterilização de produtos para uso médico geralmente se deve aplicar uma dose de 25 a 35 KGy. Esta dosagem é suficiente para matar os microrganismos mais comumente encontrados com um fator de segurança adequado [129]. Uma dose de 25 KGy é considerada uma dosagem adequada para esterilizar dispositivos médicos que não foram expostos a fatores de risco, como por exemplo contato direto com vírus [129]. Para avaliar a influência de radiações ionizantes nesta dosagem sobre a estabilidade da *glucose oxidase* (GOx) imobilizada diretamente na superfície de eletrodos por eletrodeposição e “sanduichada” entre estruturas poliméricas sua atividade enzimática foi monitorada. As medidas amperométricas de glicose 5,0 ou 10 mmol dm⁻³ foram realizadas no eletrodo modificado, antes (controle) e após exposição às radiações ionizantes. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e a média dos resultados foi registrada nas figuras 27, 28 e 29.

Figura 27. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos (1 – Nafion[®]; 2 – acetato de celulose; 3 – Nafion[®] + acetato de celulose) após aplicação de uma dose de 25 KGy. a) controle; b) irradiados com ⁶⁰Co (*radγ*) (GamaCell) e c) biossensores irradiados com acelerador de elétrons. Resposta média de 3 bioeletrodos.

Figura 28. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos com: a) controles; b) Nafion[®]; c) acetato de celulose; d) Nafion[®] + acetato de celulose. 1) 24 h e 2) 48 h após aplicação de uma dose de 25 KGy com ⁶⁰Co (*radγ*) (GamaCell). Resposta média de 3 bioeletrodos.

Figura 29. Atividade remanescente de biossensores de *glicose oxidase* recobertos com náfion + acetato de celulose após (1) 24 h e (2) 48 h. a) controles; b) irradiados com ⁶⁰Co (*radγ*) (GamaCell), 25 KGy; c) irradiados com acelerador de elétrons com 24 doses cumulativas de 1,04 KGy e d) irradiados com acelerador de elétrons, 25 KGy. Resposta média de 3 bioeletrodos.

Por análise da Figura 27 pode-se notar que a fonte de radiação ^{60}Co ($\text{rad}\gamma$) (GamaCell) minimizou o decaimento das respostas do biossensores em relação ao acelerador de elétrons. Isto pode ser uma consequência direta na forma de acondicionamento dos biossensores para a aplicação da irradiação. Quando se utilizou ^{60}Co ($\text{rad}\gamma$) (GamaCell), os biossensores foram irradiados na presença de gelo o que não aconteceu no acelerador de elétrons. Este procedimento, provavelmente, diminui a chance da desnaturação térmica da enzima.

Na figura 28 são mostradas as atividades remanescentes do biossensores de glicose em função das membranas de Nafion[®] e acetato de celulose (isoladas ou não) quando da aplicação da irradiação por ^{60}Co ($\text{rad}\gamma$) (GamaCell). Verificou-se que a maior proteção para a enzima imobilizada foi proporcionada pela associação de Nafion[®] + acetato de celulose. A atividade remanescente após a irradiação ficou em torno de 80%.

O efeito da irradiação tendo como fontes ^{60}Co ($\text{rad}\gamma$) (GamaCell) (dose acumulada de 25 KGy), acelerador de elétrons (dose acumulada de 25 KGy) e acelerador de elétrons (24 doses acumulativas de 1,04 KGy) sobre a atividade remanescente dos biossensores de glicose recobertos com Nafion[®] e acetato de celulose são apresentados na figura 29. Os biossensores com maior atividade enzimática foram aqueles irradiados com 24 doses acumulativas de 1,04 KGy (decaimento de 15%), devido a minimização dos efeitos deletérios proporcionados pelo calor gerado quando da aplicação desta metodologia.

5. CONCLUSÕES

Sensores de glicose miniaturizados (tipo agulha) baseados em uma configuração com três eletrodos foram desenvolvidos e avaliados *in vitro*, tanto em soluções padrão, como em sangue humano. A *glicose oxidase* foi eletrodepositada em eletrodos sólidos, que foram platinizados com o objetivo de aumentar sua área superficial. A platinização com a variação de potencial resultou em depósitos mais reprodutíveis e que adicionalmente, aumentaram a estabilidade das enzimas adsorvidas. Os filmes de enzima obtidos foram uniformes e biologicamente ativos. A eletropolimerização do polímero 1,2-diaminobenzeno conjuntamente com albumina de soro bovino formou uma estrutura compacta com propriedades anti-interferentes, estabilizadora e protetora. Além dessas estruturas poliméricas, membranas como Nafion® e poliuretano, (isoladas ou associadas) foram adicionadas como recobrimento externo. Filmes de Nafion® trouxeram a vantagem adicional de proporcionar uma minimização dos efeitos deletérios dos processos de esterilização. Os filmes de poliuretano foram utilizados com a finalidade de proporcionar biocompatibilidade quando em uso em matrizes biológicas (Figura 30).

Figura 30: Representação esquemática da ação do biossensor

Biossensores construídos com poli(1,2-diaminobenzeno) apresentaram uma melhor relação sinal de corrente/ruído e melhor reprodutibilidade quando comparados com outros polímeros testados no início deste estudo (pirrol e fenol) aplicando com eletrodo de trabalho um fio de platina platinizado. Testes *in vitro* em tampão fosfato 0,05 mol dm⁻³ (pH 7,2) evidenciaram seletividade, sensibilidade para determinação de glicose (intervalo de 0,0 a 12,5 mmol dm⁻³), boa precisão, tempo de resposta rápida e uma vida útil média de sete dias quando estocados sob refrigeração (~8 °C), tanto a seco como em tampão fosfato. O biossensor requereu uma polarização de 5 a 10 min para sua estabilização, para então ser usado. Em sangue, tais sensores perderam rapidamente a sensibilidade devido à aderência de proteínas na superfície dos eletrodos, mesmo quando modificados com poliuretano.

Portanto, existem ainda barreiras para serem vencidas, dentre as quais, minimizar os problemas de bloqueio da superfície do biossensor quando em presença de matrizes biológicas complexas. No entanto, os resultados apresentados nesta dissertação mostraram avanços.

Os estudos envolvendo processos de esterilização por irradiação também se constituem em uma contribuição significativa desta dissertação. Os biossensores desenvolvidos puderam ser irradiados com doses adequadas para garantir a esterilidade externa do sensor, com perdas de sensibilidade bastante reduzidas. Este fato abre uma interessante perspectiva, pois os processos de irradiação possibilitam que os sensores sejam lacrados em embalagens para então realizar a sua esterilização.

6. PERSPECTIVAS

O trabalho desenvolvido durante este mestrado abriu diversas perspectivas:

Os problemas de bloqueio superficial dos sensores se constituem no verdadeiro “calcanhar de Aquiles” para a obtenção de sensores capazes de monitorar glicose *in vivo*, pois é conhecido que tanto nas universidades como em muitas indústrias farmacêuticas este objetivo tem sido buscado incessantemente.

Enfocando do ponto de vista do monitoramento de pacientes em UTIs, uma possível forma de minimizar os problemas de bloqueio poderia ser o desenvolvimento de sistemas extracorpóreos. Nestes, um pequeno volume de sangue (da ordem de 10 μL) poderia ser bombeado até a superfície do eletrodo. Ao longo do percurso, ocorreria a sua diluição (em soro esterilizado) e chegaria até a superfície do eletrodo já significativamente diluído. A medição de glicose ocorreria durante um curto espaço de tempo e em seguida um fluxo de soro em sentido inverso lavaria a superfície dos eletrodos. Este fluxo seria injetado no paciente (volume da ordem de 100 a 200 μL). Desta forma, a esterilidade da operação ficaria garantida e a possibilidade do sensor responder por períodos mais longos aumenta significativamente.

Uma ilustração da célula proposta pode ser visualizada na Figura 31. Esta célula apresenta dois orifícios (um de entrada e outro de saída) e um local onde poderia ser colocado um chip que conteria três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). A propulsão de líquidos pode ser feita com mini-bombas e um depósito de soro teria que estar interligado à célula.

Figura 31: Futura célula em fluxo com chip de três eletrodos (trabalho, auxiliar, referência) que será utilizada na quantificação da glicose em sangue.

Os estudos envolvendo a esterilização dos biossensores deverão ter continuidade no futuro. Não ficou bem estabelecido como é alterado o material enzimático durante a esterilização, nem com os filmes poliméricos são afetados. A presença dos filmes de acetato de celulose e de Nafion protegem significativamente as enzimas quando da irradiação e a associação destes dois materiais conferiram proteção ainda maior. É necessário retomar o tema para um maior entendimento de todo o processo.

Um outro aspecto que poderá ser abordado no futuro é a fabricação de arranjos de múltiplos eletrodos de cobre. Ao longo dos trabalhos, este pós-graduando adquiriu habilidade para também construir arranjos de eletrodos, como os ilustrados na Figura 32.

Figura 32: Arranjo de eletrodos de cobre com diâmetros de 80 μm e 20 μm junto com um eletrodo de prata 200 μm dentro de uma agulha de aço inox de diâmetro externo de 1,2 mm: a) 26 eletrodos, b) 46 eletrodos de e c) 34 eletrodos.

O primeiro conjunto (A) apresenta um arranjo com 26 eletrodos de cobre com 80 μm de diâmetro, posicionados ao redor do eletrodo de prata (diâmetro de 200 μm). Com o aumento da experiência, foi possível colocar até 42 fios de cobre no interior de uma agulha (B), cujo diâmetro interno é de apenas $\sim 0,8$ mm. Mais desafiador foi posicionar mais de três dezenas de fios com apenas 20 micrometros de diâmetro no interior de agulha similar (C). Neste caso, foi utilizado o fio de uma bobina de relógio de pulso. Só não foram colocados mais fios porque durante a manipulação, perdeu-se parte do material que “enrolou”.

Tais arranjos poderão ser explorados tanto com a utilização de múltiplos eletrodos com a mesma enzima (o que aumentaria o sinal analítico), como também poderiam ser modificados individualmente com diferentes enzimas, permitindo assim o monitoramento de múltiplos analitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wightman, R. M. Voltammetry with Microscopic Electrodes in New Domain. *Science*, **22**, p.415-20, 1988.
2. Wang, J.; Li, R.; Lin, M. S. Flow cell based on glucose oxidase-modified carbon fiber ultramicroelectrode. *Electroanalysis*, **1**, p.151-54, 1988.
3. Niwa, O.; Xu, Y.; Halsall, H. B.; Heineman, R. W. Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay. *Anal. Chem.*, **65**, p.1559-63, 1991.
4. Abe, T.; Lau, Y. Y.; Ewing A. G. Intracellular analysis with an immobilized-enzyme glucose electrode having a 2- μ m diameter and sub-second response times. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, p.7421-23, 1991.
5. Braguglia, C. M. Biosensors: an outline of general principles and application. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **12**, p.183, 1998.
6. Magner, E. Trends in electrochemical biosensors. *Analyst*, **123**, p.1967-70, 1998.
7. Clark jr, L. C.; Lyons, L. Electrodes system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, p.29-45, 1962.
8. Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hee, H. A. O.; Aston, W.; Higgins, I. J.; Platkin, E. V.; Scott, L. D. L.; Funner, A. B. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, p.667-78, 1984.
9. Pandey, P. C.; Upadhyay, S.; Pathak, H. C.; Tiwasi, I.; Fripathi, U. S. Studies on glucose biosensor based on non-mediated and mediated electrochemical oxidation of reduced glucose oxidase encapsulated within organically modified sol-gel glasses. *Electroanalysis*, **11**, p.1251-58, 1999.

10. Kim, S. C.; Oh, M. S. Enzyme sensors prepared by electrodeposition on platinized platinum electrodes. *Electrochim. Acta*, **41**, p.2433-39, 1996.
11. Ikariyama, Y.; Tomoaki Y. S.; Ushioda, H. Electrochemical fabrication of amperometric microenzyme sensor. *J. Electrochem. Soc.*, **136**, p.702-06, 1989.
12. Liu, H.; Li, H.; Ying, T.; Sun, K.; Qin, Y.; Qi, D. Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β -galactosidase and mutarotase in β -cyclodextrin polymer. *Anal. Chim. Acta*, **358**, 137-44, 1998.
13. Cosnier, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, p.443-56, 1999.
14. Johnson, K. W.; Bryan-Poole, N.; Mastrototaro, J. J. Reduction of electrooxidizable interferent effects: Optimization of the applied potential for amperometric glucose sensors. *Electroanalysis*, **6**, p.321-26, 1994.
15. Wang, J.; Chen, L.; Hecovar, B. S.; Ogorevc, B. One-step electropolymeric co-immobilization of glucose oxidase and heparin for amperometric biosensing of glucose. *Analyst*, **125**, p.1431-34, 2000.
16. Raul, E.; Muller, K. Fundamental of Electrodeposition. Elsevier, p. 60, 1967.
17. Vidal, C. J.; García, E.; Castillo, R. J. In situ preparation of overoxidized PPy/oPPD bilayer biosensors for the determination of glucose and cholesterol in serum. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **57**, p.219-26, 1999.
18. Cosnier, S. Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **89**, p.127-38, 2000.
19. Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P. Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer

- films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. *Anal. Chim. Acta*, **311**, p.23-30, 1995.
20. Palmisano, F.; Guerrieri, A.; Quinto, M.; Zambonin, P. G. Electrosynthesized bilayer polymeric membrane for effective elimination of electroactive interferents in amperometric biosensors. *Anal. Chem.*, **67**, p.1005-09, 1995.
21. Brett, O. M. A.; Brett, A. M. C. Eletroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações. Almeida: Coimbra, 1996.
22. Mabott, G. A. An Introduction to cyclic voltammetry. *J. Chem. Educ.*, **62**, p.697-702, 1983.
23. Van Benschoten, J. J.; Lewis, J. Y.; Heineman, W. R.; Roston, D. A.; Kissinger, P. T. Cyclic Voltammetry Experiment. *J. Chem. Educ.*, **62**, p.772-776, 1983.
24. Grosser, K. D., Cyclic Voltammetry. Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms. New York: VHC Publishers, Inc., 1993.
25. Hughes, S.; Johnson, C. D. High-performance liquid chromatographic separation with triple-pulse amperometric detection of carbohydrates in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **30**, p.712-14, 1982.
26. Polta, A. J.; Johnson, C. D. The direct electrochemical detection of amino acids at a platinum electrode in an alkaline chromatographic effluent. *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, p.1727-43, 1983.
27. Austin, S. D.; Polta, A. J.; Polta, Z. T.; Tang, P.-C. A.; Cabelka, D. T.; Johnson, C. D. Electrocatalysis at platinum electrodes for anodic electroanalysis. *J. Electroanal. Chem*, **168**, p.227-48, 1984.

28. Rocklin, D. R.; Pohl, A. C. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, p.1577-90, 1983.
29. Neuburger, G. G.; Johnson, C. D. Pulsed amperometric detection of carbohydrates at gold electrodes with a two-step potential waveform. *Anal. Chem.*, **59**, p.150-54, 1987.
30. Hui, S. B.; Huber, O. C. Amperometric detection of amines and amino acids in flow injection systems with a nickel oxide electrode. *Anal. Chim. Acta*, **134**, p.211-18, 1982.
31. Yuan, J. C.; Huber, O. C. Determination of proteins and denaturation studies by flow injection with a nickel oxide electrode. *Anal. Chem.*, **57**, p.180-85, 1985.
32. Quintino, M. S. M.; Corbo, D.; Bertotti, M.; Angnes, L. Amperometric determination of acetylsalicylic acid in drugs by batch injection analysis at a copper electrode in alkaline solutions. *Talanta*, **58**, p.943-49, 2002.
33. Stulík, K.; Pacáková, V.; Le, K.; Hennisen, B. Amperometric flow detection with a copper working electrode-response mechanism and application to various compounds. *Talanta*, **35**, p.455-60, 1988.
34. Prabhu, V. S.; Baldwin, P. R. Constant potential amperometric detection of carbohydrates at a copper-based chemically modified electrode. *Anal. Chem.*, **35**, p.852-56, 1989.
35. Luo, P.; Prabhu, V. S.; Baldwin, P. R. Constant potential amperometric detection at a copper-based electrode: electrode formation and operation. *Anal. Chem.*, **62**, p.752-55, 1990.

36. Corbo, D.; Bertotti, M. Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration. *Anal. Bioanal. Chem.*, **374**, p.416-20, 2002. amphiphilic
37. Paixão, C. L. R. T.; Corbo D.; Bertotti, M. Amperometric determination of ethanol in beverages at copper electrodes in alkaline medium. *Anal. Chim. Acta*, **472**, p.123-31, 2002.
38. Hampson, A. N.; Lee, B. J.; Morley, R. J.; Scanlon, B. Oxidations involving silver. V. The oxidation of primary aliphatic amines. *Can. J. Chem.*, **47**, p.3729-36, 1989.
39. Pletcher, D.; Fleischmann, M.; Korinek, K. The oxidation of organic compounds at a cobalt electrode in alkaline media. *J. Electroanal. Chem.*, **33**, p.478-79, 1971.
40. Souza, M. F. B. Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: Uma breve abordagem, *Química Nova*, **20**, p.191, 1997.
41. Pereira, C. A.; Santos, S. A.; Kubota, T. L. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova*, **25**, p.1012-21, 2002
42. Abruña, D. H. Coordination chemistry in two dimensions: chemically modified electrodes. *Coord. Chem. Rev.*, **86**, p.135-89, 1988.
43. Lane, F. R.; Hubbard, T. A. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *J. Phys. Chem.*, **77**, p.1401-10, 1973.
44. Lane, F. R.; Hubbard, T. A. Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. Influence of charged chemisorbed molecules on the electrode reactions of platinum complexes. *J. Phys. Chem.*, **77**, p.1411-21, 1973.

45. Clark Jr, L.C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tension. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **2**, p.41-48, 1956.
46. Updike, S. J.; Hicks, G. P. The enzyme electrode. *Nature*, **214**, p.986-88, 1967.
47. Guilbault, G. G.; Montalvo, J. Urea-specific enzyme electrode. *JACS*, **91**, p. 2164-569, 1969.
48. Wang, J.; Chen, Q. Enzyme microelectrode array strips for glucose and lactate. *Anal. Chem.*, **66**, p.1007-11, 1994.
49. Huang, L.; Kennedy, T. Exploring single-cell dynamics using chemically-modified microelectrodes. *Trends Anal. Chem.*, **14**, p. 158-64, 1995.
50. Bartlett, N. P.; Birkin, R. P. A Microelectrochemical enzyme transistor responsive to glucose. *Anal. Chem.*, **66**, p.1552-59, 1994.
51. Niwa, O.; Xu, Y.; Halsall, B. H.; Heineman, R. W. Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay. *Anal. Chem.*, **65**, p. 1559-63, 1993.
52. Zhou, M. D.; Ju, X. H.; Chen, Y. H. A miniaturized glucose biosensor based on the coimmobilization of glucose oxidase and ferrocene perchlorate in nafion at a microdisk platinum electrode. *Sensors Actuators B. Chem.*, **40**, p.89-94, 1997.
53. Vassilyev, B. Y.; Khazova, A. O.; Nikolaeva, N. N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: Part I. Adsorption and oxidation on platinum. *J. Electroanal. Chem.*, **196**, p.105-25, 1985.
54. Vassilyev, B. Y.; Khazova, A. O.; Nikolaeva, N. N. Kinetics and mechanism of glucose electrooxidation on different electrode-catalysts: Part II. Effect of the nature of the electrode and the electrooxidation mechanism. *J. Electroanal. Chem.*, **196**, p.105-25, 1985.

55. Shin, C. M.; Kim, S. H. Effects of enzyme concentration and film thickness on the analytical performance of a polypyrrole/glucose oxidase biosensor. *Anal. Letters*, **28**, p.1017-31, 1995.
56. Shin, C. M.; Kim, S. H. Electrochemical characterization of polypyrrole/glucose oxidase biosensor: Part I. Influence of enzyme concentration on the growth and properties of the film. *Biosens. Bioelectron.*, **11**, p.171-78, 1996.
57. Bélanger, D.; Nadreau, J.; Fortier, G. Electrochemistry of the polypyrrole glucose oxidase electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **274**, p.143-55, 1989.
58. Le Penven, R.; Levason, W.; Pletcher, D. Studies of platinum electroplating baths Part I: The chemistry of a platinum tetrammine bath. *J. Appl. Electrochem.*, **22**, p.415-20, 1992.
59. Gregory, J. A.; Levason, W.; Pletcher, D. Studies of platinum electroplating baths: Part II. Deposition of platinum from a solution of $\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$ in aqueous acid. *J. Electroanal. Chem.*, **248**, p.211-19, 1993.
60. Gregory, J. A.; Levason, W.; Nofle, E. R.; Pletcher, D. Studies of platinum electroplating baths Part III. The electrochemistry of $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4 - x(\text{H}_2\text{O})^{2+}_2$ and $\text{PtCl}_4 - x(\text{H}_2\text{O})^{(2-x)-}_x$. *J. Electroanal. Chem.*, **399**, p.105-13, 1995.
61. Basirun, J. W.; Pletcher, D.; Saraby-Reintjes, A. Studies of platinum electroplating baths Part IV: Deposits on copper from Q bath. *J. Appl. Electrochem.*, **26**, p.873-80, 1996.
62. Ureta-Zañartu, M.; Yáñez, C.; Páez, M.; Reyes, G. Electrocatalytic oxidation of ethylene glycol in 0.5 M H_2SO_4 and 0.5 M NaOH solutions at a bimetallic deposited electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **405**, p.159-67, 1996.

63. Allongue, P.; Souteyrand, E. Metal electrodeposition on semiconductors : Part I. Comparison with glassy carbon in the case of platinum deposition. *J. Electroanal. Chem.*, **286**, p.217-37, 1990.
64. Allongue, P.; Souteyrand, E. Metal electrodeposition on semiconductors: Part 2. Description of the nucleation processes. *J. Electroanal. Chem.*, **362**, p.79-87, 1990.
65. Farndon, E. E.; Pletcher, D.; Saraby-Reintjes, A. The electrodeposition of platinum onto a conducting ceramic, Ebonex. *Electrochim. Acta*, **42**, p.1269-79, 1996.
66. Kao, H. W.; Kuwana, T. Electrocatalysis by electrodeposited spherical Pt microparticles dispersed in a polymeric film electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, p. 473-76, 1984.
67. Bartak, E. D.; Kazee, B.; Shimazu, K.; Kuwana, T. Electrodeposition and characterization of platinum microparticles in poly(4-vinylpyridine) film electrodes. *Anal. Chem.*, **58**, p.2756-61, 1986.
68. Kost, M. K.; Bartak, E. D.; Kazee, B.; Kuwana, T. Electrodeposition of palladium, iridium, ruthenium, and platinum in poly(4-vinylpyridine) films for electrocatalysis. *Anal. Chem.*, **58**, p.151-57, 1990.
69. Vork, A. T. F.; Janssen, J. J. L.; Barendrecht, E.; Oxidation of hydrogen at platinum-polypyrrole electrodes. *Electrochim. Acta*, **31**, 1569-75, 1986.
70. Holdcroft, S.; Funt, L. B. Preparation and electrocatalytic properties of conducting films of polypyrrole containing platinum microparticulates. *J. Electroanal. Chem.*, **240**, p.89-103, 1988.

71. Gholamian, M.; Contractor, Q. A. Oxidation of formic acid at platinum microparticles dispersed in a polyaniline matrix: Influence of long-range order and metal-polymer interaction. *J. Electroanal. Chem.*, **289**, p.69-83, 1990.
72. Del Valle, A. M. S.; Gómez, H.; Veas, C.; Córdova, R. Preparation of polythiophene-modified electrodes by electrodeposition of Pt and Pt + Pb. Application to formic acid electro-oxidation. *J. Electroanal. Chem.*, **380**, p.219-27, 1994.
73. Napporn, T. W.; Laborde, H.; Léger, M. J.; Lamy, C. Electro-oxidation of C1 molecules at Pt-based catalysts highly dispersed into a polymer matrix: effect of the method of preparation. *J. Electroanal. Chem.*, **404**, p.153-59, 1996.
74. Farndon, E. E.; Pletcher, D.; Studies of platinized Ebonex[®] electrodes. *Electroanal. Acta*, **42**, p.1281-85, 1997.
75. Plyasova, M. L.; Molina, Y. I.; Gavrilov, N. A.; Cherepanova, V. S.; Cherstiouk, V. O.; Rudina, A. N.; Savinova, R. E.; Tsirlina, A. G. Electrodeposited platinum revisited: Tuning nanostructure via the deposition potential. *Electrochim. Acta*, **51**, p.4477-88, 2006.
76. Whalen, J. J.; Weiland, D. J.; Searson, C. P. Electrochemical characterization of charge injection at electrodeposited platinum electrodes in phosphate buffered saline. *J. Electrochem. Soc.*, **153**, p. C834 – 39, 2006.
77. Green, L. C.; Kucernak, A. Determination of the platinum and ruthenium surface areas in platinum-ruthenium alloy electrocatalysts by underpotential deposition of copper. I unsupported catalysts; *J. Phys. Chem. B*, **106**, p.1036-47, 2002.
78. Elliott, J. M.; Birkin, P. R.; Bartlett, P. N.; Attard, G. S. Platinum microelectrodes with unique high surface areas. *Langmuir*, **15**, p.7411-15, 1999.

79. Evans, S. A. G.; Elliott, J. M.; Andrews, L. M.; Bartlett, P.N.; Doyle, P. J.; Denuault, G. Detection of hydrogen peroxide at mesoporous platinum microelectrodes. *Anal Chem.*, **74**, p.1322-6, 2002.
80. Ikariyama, Y.; Yamauchi, S.; Yukiashi, T.; Ushioda, H. Surface control of platinized platinum as a transducer matrix for micro-enzyme electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **251**, p.267-74, 1988.
81. Zhang, Z.; Lei, C.; Deng, J. Electrochemical fabrication of amperometric glucose enzyme electrode by immobilizing glucose oxidase in electropolymerized poly(3,3-diaminobenzidine) film on palladinized glassy carbon electrode. *Analyst*, **121**, p.971-76, 1996.
82. Kajiya, Y.; Matsumoto, H.; Yoneyama, H. Glucose sensitivity of poly(pyrrole) films containing immobilized glucose dehydrogenase, nicotinamide adenine dinucleotide, and β -naphthoquinonesulphonate ions. *J. Electroanal. Chem.*, **319**, p.185-94, 1991.
83. Umana, M.; Waller, J. Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system. *Anal. Chem.*, **58**, p. 2979-83, 1986.
84. Oléa, D.; Moreau, P.; Faure, C. Polypyrrole–glucose oxidase biosensor. Effect of enzyme encapsulation in multilamellar vesicles on film growth and morphology. *J. Electroanal. Chem.*, **605**, p. 125-35, 2007.
85. Wang, J.; Myung, V. N.; Yun, M.; Monbouquette, G. H. Glucose oxidase entrapped in polypyrrole on high-surface-area Pt electrodes: a model platform for sensitive electroenzymatic biosensors. *J. Electroanal. Chem.*, **575**, p.139-146, 2005.
86. Malitesta, C.; Palmisano, F.; Torsi, L.; Zambonin, G. P. Glucose fast-response amperometric sensor based on glucose oxidase immobilized in an

- electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film. *Anal. Chem.*, **62**, p.2735-40, 1990.
87. McMahon, P. C.; Killoran, J. S.; O'Neill, D. R. Design variations of a polymer–enzyme composite biosensor for glucose: Enhanced analyte sensitivity without increased oxygen dependence. *J. Electroanal. Chem.*, **580**, p.193-202, 2005.
88. Lowry, J. P.; O'Neill, D. R. Partial characterization in vitro of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes for neurochemical analysis in vivo. *Electroanalysis*, **6**, p.369-79, 1994.
89. Bartlett, N. P.; Tebbutt, P.; Tyrrell, H. C. Electrochemical immobilization of enzymes. 3. Immobilization of glucose oxidase in thin films of electrochemically polymerized phenols. *Anal. Chem.*, **62**, p. 138-142, 1992.
90. Bidan, G. Electroconducting conjugated polymers: new sensitive matrices to build up chemical or electrochemical system. *Sens. Actuat. B*, **6**, p.45- 56, 1992.
91. Cosiner, S. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment of attachment to electrochemically polymerized films. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, p.443-56. 1999.
92. Barlett, P.N.; Cooper, J.M. A review of the immobilization of enzymes in the electropolymerized films. *J. Electroanal. Chem.* **362**, p.1-12, 1993.
93. Zhang, Z.; Liu, H.; Deng, J. A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized o-aminophenol film on platinized glassy carbon electrode. *Ana. Chem.*, **68**, p.1632-38, 1996.
94. Ogura, K.; Kokura, M.; Yano, J.; Shiigi, H. Spectroscopic and scanning tunnelling microscopic characterization of virgin and recast films of electrochemically prepared poly-o-phenylenediamine. *Electrochim. Acta*, **40**, p.2707-14, 1995.

95. Goyette, A. M.; Leclerc, M. Structure-property relationships in poly-*o*-phenylenediamine derivatives. *J. Electroanal. Chem.*, **382**, p.17–23, 1995.
96. Malinauskas, A.; Holze, R. A spectroelectrochemical study of the slow relaxation in polyaniline and its acceleration in composite films with poly-*o*-phenylenediamine. *Phys. Chem.*, **101**, p.1851-58, 1997.
97. Malinauskas, A.; Bron, M.; Holze, R. Electrochemical and Raman spectroscopic studies of electrosynthesized copolymers and bilayer structures of polyaniline and poly-*o*-phenylenediamine. *Synth. Met.*, **92**, p.127-37, 1998.
98. Sasso, V. S.; Pierce, J. R.; Walla, R.; Yacynych, M. A. Electropolymerized 1,2-diaminobenzene as a means to prevent interferences and fouling and to stabilize immobilized enzyme in electrochemical biosensors. *Anal. Chem.*, **62**, p.1111-17, 1990.
99. De Corcuera, R. I. J.; Cavalieri, P. R.; Powers, R. J. Improved platinization conditions produce a 60-fold increase in sensitivity of amperometric biosensors using glucose oxidase immobilized in poly-*o*-phenylenediamine. *J. Electroanal. Chim.*, **575**, p.229-41, 2005.
100. Lowry, P. J.; McAteer, K.; El Atrash, S. S.; Duff, A.; O'Neill, D. R. Characterization of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes in vitro and in vivo: Homogeneous interference by ascorbic acid in hydrogen peroxide detection. *Anal. Chem.*, **66**, p.1754-61, 1994.
101. Dempsey, E.; Wang, J.; Smyth, M. R. Electropolymerized *o*-phenylenediamine film as means of immobilising lactate oxidase for a L-lactate biosensor. *Talanta*, **40**, p.445-51, 1993.
102. Netchiporouk, I. L.; Shram, F. N.; Jaffrezic-Renault, N.; Martelet, C.; Cespuglio, R. In vivo brain glucose measurements: differential normal pulse voltammetry

- with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes. *Anal. Chem.*, **68**, p.4358-64, 1996.
103. Cooper, M. J.; Foreman, L. P.; Glidle, A.; Ling, W. T.; Pritchard, J. D. Glutamate oxidase enzyme electrodes: microsensors for neurotransmitter determination using electrochemically polymerized permselective films. *J. Electroanal. Chem.*, **388**, p.143-49, 1995.
104. Craig, D. J.; O'Neill, D. R. Comparison of simple aromatic amines for electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication. *Analyst*, **128**, p.905-11, 2003.
105. Murphy, J. L. Reduction of interference response at a hydrogen peroxide detecting electrode using electropolymerized films of substituted naphthalenes. *Anal. Chem.*, **70**, p.2928-35, 1998.
106. Cooper, J.M.; Pritchard, D.J. Biomolecular sensors for neurotransmitter determination-electrochemical immobilization of glutamate oxidase at microelectrodes in a poly(ophenylenediamine) film. *J. Mater. Sci., Mater.*, **5**, p. 111-16, 1994.
107. Kesting, R. E. Synthetic Polymeric Membranes: A structural perspective. 2nd ed., Wiley: New York, 1985.
108. Kristensen, W. E.; Kuhr, G. W.; Wightman M. R. Temporal characterization of perfluorinated ion exchange coated microvoltammetric electrodes for in vivo use. *Anal. Chem.*, **59**, p.1752-57, 1987.
109. Maalouf, R.; Chebib, H.; Saikali, Y.; Vittori, O.; Sigaud, M.; Jaffrezic-Renault, N. Amperometric and impedimetric characterization of a glutamate biosensor based on Nafion® and a methyl viologen modified glassy carbon electrode. *Biosens. Bioelectron.* **22**, p.2682-88, 2007.

110. Chen, X.; Yan, X.; Khor, A. K.; Kang, B. Multilayer assembly of positively charged polyelectrolyte and negatively charged glucose oxidase on a 3D Nafion network for detecting glucose. *Biosens. Bioelectron.*, **22**, p.3256-60, 2007.
111. Karyakin, A. A.; Kotel'nikova, A. E.; Lukachova, V. L.; Karyakina, E. E.; Wang, J. Optimal environment for glucose oxidase in perfluorosulfonated ionomer membranes: improvement of first-generation biosensors. *Anal. Chem.*, **74**, p.1597-602, 2002.
112. Nagy, G.; Gerhardt, A. G.; Oke, F. A.; Rice, E. M.; Adams, N. R.; Szentirmay, N. M.; Martin, R. C. Ion exchange and transport of neurotransmitters in nation films on conventional and microelectrode surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, **188**, p.85-94, 1985.
113. Folkes, M. J. (ed). Processing, Structure and Properties of Block Copolymer. Elsevier Applied Sci. Pub: Londres, 1985.
114. D'Orazio, P. Biosensors in clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, **334**, p.41-69, 2003.
115. Shin, C. M.; Yoon, C. H.; Kim, S. H. In situ biochemical reduction of interference in an amperometric biosensor with a novel heterobilayer configuration of polypyrrole/glucose oxidase/horseradish peroxidase. *Anal. Chim. Acta*, **329**, p.223-30, 1996.
116. Yuan, J. C.; Hsu, L. C.; Wang, C. S.; Chang, S. K. Eliminating the interference of ascorbic acid and uric acid to the amperometric glucose biosensor by cation exchangers membrane and size exclusion membrane. *Electroanalysis*, **17**, p. 2239-2245, 2005.

117. Moussy, F.; Harrison, J. D.; O'Brien, W. D.; Rajotte, V. R. Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating. *Anal. Chem.*, **65**, p.2072-77, 1993.
118. Philips, G.O. Multimedia distance learning package on tissue banking. Module 5° Processing Nat. Univ. of Singapore. Regional Co-operative Agreement. I.A.E.A.
119. Woedtke, T.; Jülich, D. W.; Hartmann, V.; Stieber, M.; Abe, U. P. Sterilization of enzyme glucose sensors: problems and concepts. *Biosens. Bioelectron.*, **17**, p.373-82, 2002.
120. Ahmed, S.; Rigby, P. G.; Crump, P.; Vadgama, M. P.; Comparative assessment of chemical and γ -irradiation procedures for implantable glucose enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, p.159-65, 2000.
122. Matsumoto, N.; Chen, X.; Wilson, S. G. Fundamental studies of glucose oxidase deposition on a Pt electrode. *Anal. Chem.*, **74**, p.362-67, 2002.
123. Im, M. D.; Jang, H. D.; Oh, M. S.; Striebel, Ch.; Wiemhöfer, D. H.; Gauglitz, G.; Göpel, W. Electrodeposited GOD/BSA electrodes: ellipsometric study and glucose-sensing behavior. *Sens. Actuators B*, **24-25**, p.149-155, 1995.
124. Strike, J. D.; De Rooij, F. N.; Koudelka-Hep, M. Electrodeposition of glucose oxidase for the fabrication of miniature sensors. *Sens. Actuators B*, **13**, p.61-64, 1993.
125. Wang, S. S.; Vieth, R. W. Collagen-enzyme complex membranes and their performance in biocatalytic modules. *Biosens. Bioelectron.*, **15**, p. 93-115, 1973.
126. Lowry, P. J.; O'Neill, D. R. Homogeneous mechanism of ascorbic acid interference in hydrogen peroxide detection at enzyme-modified electrodes. *Anal. Chem.*, **64**, p.453-56, 1992.

127. O'Neill, D. R. Sensor–tissue interactions in neurochemical analysis with carbon paste electrodes *in vivo*. *Analyst*, **118**, p.433-38, 1993.
128. Ju, H.; Zhou, D.; Xiao, Y.; Chen, H. Amperometric biosensor for glucose based on a nanometer-sized microband gold electrode coimmobilized with glucose oxidase and poly(o-phenylenediamide). *Electroanalysis*, **10**, p.541-45, 1998.
129. Richards, S. “EN 552: validating 25 KGy as a sterilization dose”, *J. Med. Dev. Tech.* **7**, p.22-25, 1996.

8. ANEXOS

Curriculum Vitae

Nome: João Victor Bueno Kozan

Data de nascimento: 25/06/1981

Naturalidade: Brasileiro

Educação

Instituto de Educação Estadual de Londrina, 1999

Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2004
Química Bacharelado

Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2007
Mestrado em Química Analítica

Publicações Científicas

Kozan, J.V.B. ; Silva,R.P. ; Serrano,S.H.P. ; Lima, A.W.O. ; L. Angnes . Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (Cocus nucifera L.) fibers. Analytica Chimica Acta, v. 591, p. 200-207, 2007.

Comunicação em Congresso

Evento: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Título: Quantificação de peróxido de benzoila utilizando enzimas peroxidase naturalmente imobilizadas em fibra de coco (Cocus nucifera, L.)

Autores: João Victor Bueno Kozan, Robson Pinho da Silva, Silvia Helena Pires
Serrano, Antonio Willian Oliveira Lima e Lúcio Angnes

Local: Águas de Lindóia - SP - Brasil

Período: 31 de maio a 3 de junho de 2007

Evento: *XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*

Título: Efeito das radiações ionizantes na estabilidade da glicose oxidase imobilizada em eletrodos de platina

Autores: João Victor Bueno Kozan, Robson Pinho da Silva, Antonio Willian Oliveira Lima, Mônica B. Mathor e Lúcio Angnes

Local: Águas de Lindóia - SP - Brasil

Período: 15 a 19 de abril de 2007

Evento: *XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*

Título: Kinetic properties of peroxidases naturally immobilized in fibrous mesocarp of coconut (cocus nucifera, L.)

Autores: João Victor Bueno Kozan, Robson Pinho da Silva, Silvia Helena Pires Serrano, Antonio Willian Oliveira Lima e Lúcio Angnes

Local: Águas de Lindóia - SP - Brasil

Período: 15 a 19 de abril de 2007

Evento: *X International Conference on Flow Analysis*

Título: Amperometric flow cell free of troubles provoked by gas bubbles

Autores: Lúcio Angnes, Antonio Willian Oliveira Lima e João Victor Bueno Kozan

Local: Porto - Pt - Portugal

Período: 3 a 8 de setembro de 2006

Evento: *V Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria*

Título: Determinação da quantidade de enzima imobilizada em matrizes de sílica mesoporosa SBA-15 e FDU-1 por termogravimetria derivada (TG/DTG)

Autores: Luis C. Cides, João Victor Bueno Kozan, Antonio Willian Oliveira Lima, Lúcio Angnes e Jivaldo R. Matos

Local: Poços de Caldas - MG - Brasil

Período: 2 a 5 de abril de 2006

Evento: *III Encontro Nacional de Química Ambiental*

Título: Determinação espectrofotométrica em fluxo de catecol mediante bioconversão com polifenoloxidase de coco (Cocus Nucifera, L.)

Autores: Giovana Cristina Liutti, João Victor Bueno Kozan, Antonio Willian Oliveira Lima, Lúcio Angnes e Renato Sanches Freire

Local: Cabo Frio - RJ - Brasil

Período: 21 a 24 e março de 2006

Evento: *XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica*

Título: Imobilização de Biomoléculas por aprisionamento em filme eletroquimicamente polimerizado em eletrodo de platina

Autores: João Victor Bueno Kozan, Robson Pinho da Silva, Antonio Willian Oliveira Lima e Lúcio Angnes

Local: Londrina - PR - Brasil

Período: 4 a 7 de dezembro de 2005

Evento: *XIII Encontro Anual de Iniciação Científica*

Título: Transporte de metais em sedimento de rio

Autores: João Victor Bueno Kozan. Maria Josefa Santos Yabe e Bruno Lomba

Local: Londrina - PR - Brasil

Período: 29 de agosto a 1 de setembro de 2004

Evento: *56ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*

Título: Disponibilidade de metais em sedimentos de rio testemunho curto

Autores: João Victor Bueno Kozan. Maria Josefa Santos Yabe, Bruno Lomba e Sônia Maria Nobre Gimenez

Local: Cuiabá - MT - Brasil

Período: 18 a 23 de julho de 2004

Evento: *XII Encontro Anual de Iniciação Científica*

Título: Interação da matéria orgânica com íons Cu (II) como indicador de modificações do sistema aquático – Bacia do Rio Apucarantina “Reserva Indígena kainGang

Autores: João Victor Bueno Kozan. Maria Josefa Santos Yabe, Bruno Lomba e Magda Elisa Turini da Cunha

Local: Foz do Iguaçu - PR - Brasil

Período: 2 a 5 de setembro de 2003

Curso Ministrado

Título: 1º Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular

Área: Biossensores

Local: Universidade de São Paulo

Período: 9 a 20 de janeiro de 2006 (80 horas)

Atuação como Monitor

Local: Universidade de São Paulo

Disciplina: (QFL 0605) Química Geral

Curso: Geologia (diurno)

Período: primeiro semestre de 2006

Local: Universidade de São Paulo

Disciplina: (QFL 0605) Química Geral

Curso: Física (noturno)

Período: segundo semestre de 2006