**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

Filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores

Marli Leite de Moraes

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho
Co-orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

São Carlos – 2008

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, ____/____/____

_____
Marli Leite de Moraes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido marido Miguel, pelo amor, paciência, dedicação, estímulo e incansável ajuda em todas as etapas de minha vida.

Aos meus pais, Hélio e Rosa, que ao longo desses anos souberam me compreender e apoiar. Obrigada pelo amor e carinho!

Aos meus irmãos Ivan e Marcelo e ao meu sobrinho Dudu, pelo amor, carinho e alegria que me proporcionam.

Agradeço a **Deus**, pela oportunidade de mais uma conquista e por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A elaboração deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha imensa gratidão a todos e de forma particular

Aos Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (Chu) e Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho (Bira), pela orientação, apoio, e pela confiança depositada no meu trabalho.

À Profa. Dra. Marystela Ferreira pela amizade, incentivo e pela dedicação em transferir seus conhecimentos contribuindo para minha formação.

Aos Profa Dra Maria Raposo e Prof. Dr. Paulo Ribeiro, pela colaboração, ajuda, dedicação e amizade.

Aos funcionários do grupo de polímeros e meus amigos, Ademir, Berto, Débora Balogh, Níbio e Rô, que sempre me socorreram nos momentos mais difíceis que encontrei neste caminho árduo.

Às técnicas do grupo de Biofísica, Bel e Andressa, pela confiança e pelas incontáveis vezes que me prestaram auxílio.

Aos meus amigos dos grupos de Polímeros e Biofísica, pelos cafezinhos, por me ouvirem e me ajudarem em todos os obstáculos que enfrentei nesta jornada.

Aos meus amigos, Val, Greves, pequenino Vitor, Clarissa, Ederval e pequenina Giulia, pela alegria, convivência e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos Institutos IQSC e IFSC, pela oportunidade.

Aos órgãos financeiros: Capes, CNPq e Fapesp.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
Capítulo 1	1
INTRODUÇÃO	1
CONCEITOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
1.1 Filmes camada por camada (<i>Layer-by-layer</i> , LbL)	4
1.2 Modelos de membrana celular	8
1.2.1 Imobilização dos lipossomos em substratos sólidos	10
1.2.2 Estabilização da melanina em lipossomos	12
1.3 Biossensores	13
1.3.1 Biossensores eletroquímicos	16
1.3.1.1 Eletrodo modificado com Azul da Prússia	17
1.3.2 Biossensores com medidas de impedância elétrica	19
1.4 Enzimas	20
1.4.1 Uricase	20
1.4.2 Fitase	23
1.4.3 Colesterol oxidase	25
OBJETIVOS	28
Capítulo 2	29
PARTE EXPERIMENTAL E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	29
2.1 Materiais	29
2.1.1 Lipossomos	29
2.1.2 Polieletrólitos	30
2.1.3 Enzimas e analitos	31
2.1.4 Substratos	32
2.1.4.1 Azul da Prússia	33
2.2 Soluções	34
2.2.1 Tampão acetato de sódio	34
2.2.2 Tampão Tris-HCl	35
2.2.3 Tampão PBS	35
2.2.4 Polieletrólitos	35
2.2.5 Enzimas	35
2.2.6 Analitos	36
2.3 Métodos	36
2.3.1 Preparação dos lipossomos	36
2.3.1.1 Melanina incorporada em lipossomos	37
2.3.2 Preparação dos filmes camada-por-camada (LbL)	38
2.3.2.1 Filmes PAMAM/lipossomo e PEI/lipossomo-melanina	38
2.3.2.2 Filmes polieletrólito/enzima	39
2.3.3 Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV-vis)	39
2.3.4 Espectroscopia de Fluorescência Molecular	40
2.3.4.1 Efeito da concentração na intensidade fluorescente	41

2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	42
2.3.6 Espalhamento de Luz.....	43
2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura	43
2.3.8 Ressonância de plasmon da superfície (Surface Plasmon Resonance, SPR)	44
2.3.9 Refletividade de nêutrons	45
2.3.10 Microscopia de força atômica	47
2.3.11 Medidas eletroquímicas	48
2.3.11.1 Medidas amperométricas	48
2.3.12 Medidas elétricas	49
2.3.12.1 Análise da componente principal (<i>Principal component analysis</i> , PCA) ..	51
Capítulo 3	52
IMOBILIZAÇÃO DE LIPOSSOMOS E MELANINA EM FILMES AUTOMONTADOS	52
3.1 Filmes automontados com Lipossomos.....	52
3.1.1 Filme automontado PAMAM/lipossomo	54
3.2 Filme automontado PEI/lipossomo-melanina	58
3.2.1 Incorporação da melanina em lipossomos.....	58
3.2.2 Caracterização dos filmes automontados contendo melanina	64
Capítulo 4	73
URICASE E FITASE EM BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS	73
4.1 Filmes automontados com Uricase.....	73
4.1.1 Crescimento dos filmes PEI/uricase e PDAC/uricase	75
4.1.2 Medidas amperométricas	80
4.2 Filmes automontados com Fitase	87
4.2.1 Crescimento do filme PAH/fitase.....	88
4.2.2 Medidas de voltametria cíclica	90
4.2.3 Medidas amperométricas	91
Capítulo 5	97
FITASE E COLESTEROL OXIDASE EM BIOSSENSORES BASEADOS EM ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA	97
5.1 Filme automontado PAH/fitase e sua aplicação como biossensor	97
5.1.1 Crescimento e mecanismo de adsorção do filme PAH/fitase.....	97
5.1.2 Caracterização morfológica.....	99
5.1.3 Medidas elétricas	100
5.2 Filme automontado PAH/colesterol oxidase (COX) e sua aplicação como biossensor	107
5.2.1 Crescimento e mecanismo de adsorção do filme PAH/COX.....	108
5.2.2 Detecção de colesterol com medidas elétricas	111
Capítulo 6	114
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Representação esquemática do processo de deposição do filme automontado sobre um substrato sólido. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos polieletrólitos aniônico e catiônico, respectivamente, e as etapas 2 e 4 são os procedimentos de lavagem. No fim da etapa 4 tem-se a construção de um filme simples do tipo (A/B) _n . B) Estrutura idealizada do filme automontado contendo as duas primeiras etapas de adsorção dos polieletrólitos. Figura extraída de Decher [7].	5
Figura 2: Imagem de AFM 3D (2x2 μm) do filme automontado PEI/(PGA/PAH) ₂ /vesículas/(PGA/PAH) ₂ . Figura adaptada de [25]	8
Figura 3: Modelo da membrana celular. Figura adaptada de [33]	9
Figura 4: Representação esquemática da bicamada lipídica e dos lipossomos, MLV, SUV e LUV. Figura obtida da <i>Avanti Polar Lipids</i> [36].	10
Figura 5: Esquema da imobilização de lipossomos em filmes automontados. Lipossomos foram recobertos com PLL e então depositados sobre o substrato contendo um filme automontado PLL/HA de 12 bicamadas. Figura adaptada de [40]	12
Figura 6: Elementos e componentes de um típico biossensor. Figura adaptada de Grieshaber e colaboradores [51].	14
Figura 7: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico. Figura adaptada de [62].	16
Figura 8: Reação catalítica da enzima uricase com oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio produzindo alantoína e CO ₂ como produto de oxidação do ácido úrico, e H ₂ O ₂ como produto de redução do O ₂ .	21
Figura 9: Imobilização da uricase em filme automontado sobre um eletrodo de Pt modificado com uma membrana de (PAA/PVS) ₂ . Figura adaptada de [63].	22
Figura 10: Reação catalítica da enzima fitase com ácido fítico produzindo inositol como produto de hidrólise do ácido fítico, e íons fosfatos (PO ₄ ³⁻).	24
Figura 11: Diagrama esquemático do mecanismo de detecção do ácido fítico com o eletrodo contendo as enzimas fitase e piruvato oxidase. Figura adaptada por [15].	25
Figura 12: Reação catalítica da enzima colesterol oxidase com oxidação do colesterol na presença de oxigênio produzindo colesteno e H ₂ O ₂ .	26
Figura 13: Estrutura química da melanina sintética e do fosfolípido DPPG.	30
Figura 14: Estruturas dos polieletrólitos poli(etilenoimina) (PEI), cloreto de poli(alilamônio) (PAH), poli(vinil sulfato) (PVS) poliamidoamina geração 4 (PAMAM-G4) e cloreto de poli(dodecildimetil amônio) (PDAC).	31
Figura 15: Estruturas terciárias das enzimas fitase, uricase e colesterol oxidase, e estruturas químicas dos analitos ácido fítico, ácido úrico e colesterol. As estruturas das enzimas; fitase [79], uricase [91] e colesterol oxidase [92] foram obtidas do <i>Protein Data Bank</i> (PDB) [93].	32
Figura 16: Representação esquemática de um biossensor com a enzima oxidase para a detecção de peróxido de hidrogênio com eletrodo modificado com azul da Prússia (PB). Figura adaptada de Ricci [52].	34
Figura 17: Representação esquemática da preparação dos lipossomos. Figura adaptada da <i>Avanti Polar Lipids</i> [36].	37
Figura 18: Representação esquemática do processo de montagem de uma bicamada do filme camada-por-camada (LbL).	38

Figura 19: Representação esquemática de um instrumento típico de SPR. Uma lâmina de vidro recoberta com prata/ouro é colocada sob um prisma, através do qual o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, a qual é refletida para um detector. Adaptada de Carvalho [97].	44
Figura 20: Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente. Figura adaptada de [102].	47
Figura 21: Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos; referência, trabalho e contra eletrodo, acoplada a um potenciostato.	48
Figura 22: Circuito equivalente para eletrodo metálico recoberto com filme pouco condutor (A). Gráfico teórico de C e G/ω do circuito equivalente. Figura adaptada de [71].	50
Figura 23: Distribuição de tamanho dos lipossomos de DPPG em solução aquosa (A) e representação esquemática dos lipossomos esféricos em diferentes tamanhos (B).	53
Figura 24: Distribuição de tamanho dos lipossomos de DPPG em solução aquosa (a). Imagem de microscopia eletrônica de varredura do filme <i>cast</i> de lipossomo de DPPG (b).	54
Figura 25: Espectros de FTIR dos filmes <i>cast</i> , PAMAM (—) e DPPG (—), e filmes automontados PAMAM/DPPG 12 bicamadas, como depositado (—) e após a imersão em solução de BSA 15 μ M por 3 minutos (—).	55
Figura 26: Índice de refração vs. tempo de adsorção <i>in situ</i> das camadas de PAMAM e lipossomos de DPPG. As flechas indicam o início da adsorção de cada camada.	56
Figura 27: Representação esquemática do processo de montagem do filme automontado: 1) primeira camada de PAMAM-G4 sobre o substrato, 2) bicamada PAMAM/lipossomo, 3) filme PAMAM/lipossomo/PAMAM e 4) 2 bicamadas de PAMAM/lipossomo.	58
Figura 28: Espectro de FTIR da melanina em pastilhas de KBr (—) e melanina após dissolução em filme <i>cast</i> depositado sobre CaF_2 (—).	59
Figura 29: Espectro de FTIR do Lipossomo-DPPG (—) e melanina incorporada em lipossomo-DPPG em filmes <i>cast</i> montados sobre CaF_2 .	60
Figura 30: Espectro de UV-visível da melanina em água Milli-Q (—) e incorporada em lipossomos de DPPG (—) na concentração de 0,16 mg/mL. Ambas as amostras foram extrudadas por uma membrana de policarbonato com poro de 50 nm.	61
Figura 31: Espectro de emissão fluorescente (excitação em 316, 396 e 470 nm) da melanina em água Milli-Q (—) e incorporada em lipossomos de DPPG (—). Todas as soluções foram extrudadas por uma membrana de policarbonato com poro de 50 nm.	62
Figura 32: Decaimento fluorescente da solução contendo melanina (—) e DPPG-melanina (—).	63
Figura 33: Espectros de UV-visível de n-bicamadas do filme PEI/melanina.	64
Figura 34: Espectros de UV-visível de n-bicamadas do filme PEI/lipossomo-melanina.	65
Figura 35: Aumento do máximo de absorção em 396 nm do filme PEI/melanina em função do número de bicamadas depositadas.	66
Figura 36: Aumento do máximo de absorção em 396 nm do filme PEI/DPPG-melanina em função do número de bicamadas depositadas.	66
Figura 37: Imagem dos filmes automontados 10 bicamadas (a) PEI/DPPG-melanina e (b) PEI/melanina.	67
Figura 38: Máximo de absorção em 396 nm da camada de lipossomo-DPPG/melanina sobre uma camada de PEI em função do tempo de imersão. Tempo zero corresponde a monocamada de PEI.	68
Figura 39: Curvas de Refletividade de Nêutrons como obtida do molde padrão PEI(PSS/PAH) ₅ (●) e PEI(PSS/PAH) ₅ + camada de lipossomo-melanina (●).	69
Figura 40: Espectro de emissão fluorescente da melanina em solução e em filme automontado PEI/lipossomo-melanina 10 bicamadas.	71

Figura 41: Decaimento fluorescente do filme PEI/lipossomo-melanina.....	71
Figura 42: Representação esquemática do filme automontado PEI ou PDAC/uricase sobre ITO modificado com PB (A). Mecanismo envolvido na detecção de ácido úrico com geração de H_2O_2 (B).	74
Figura 43: Espectros de absorção (—) e emissão (—) da uricase livre em tampão PBS.....	75
Figura 44: Espectro de absorção do filme automontado PEI/uricase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.	77
Figura 45: Espectro de absorção do filme automontado PDAC/uricase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.	77
Figura 46: Espectros de fluorescência (A) e aumento do máximo de emissão em 320 nm (B) do filme PEI/uricase em função do número de bicamadas depositadas.....	79
Figura 47: Espectros de fluorescência (A) e aumento do máximo de emissão em 320 nm (B) do filme PDAC/uricase em função do número de bicamadas depositadas.	79
Figura 48: Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de PBS, pH 7.4, com o biossensor ITO/PB/(PDAC/UOx) ₁₀ (A) e ITO/PB/(PEI/UOx) ₁₀ (B). Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL de ácido úrico 0,001 mol/L.	81
Figura 49: Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de ácido úrico dos biossensores ITO/PB(PACD/UOx) ₁₀ (●) e ITO/PB(PEI/UOx) ₁₀ (●)... ..	82
Figura 50: Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de ácido úrico dos biossensores ITO/PB(PEI/UOx) _n (A) e ITO/PB(PDAC/UOx) _n (B) com n = 4 (●), 8 (●), 10 (●) e 14 (●) bicamadas.	83
Figura 51: Estrutura idealizada para os filmes (PDAC/uricase) ₂ (A) e (PEI/uricase) ₂ (B).	84
Figura 52: Efeito da adição de PBS, ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico.	86
Figura 53: Estrutura idealizada do filme automontado PAH/fitase imobilizada sobre ITO modificado com PB (A). Mecanismo de detecção do ácido fítico com eletrodo modificado com PB (B).	87
Figura 54: Espectro de absorção do filme automontado PAH/fitase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.	88
Figura 55: Espectro de UV-visível (a) e fluorescência (b) do filme PAH/fitase. <i>Inset</i> : máximo de absorção (a) e emissão (b) vs. Número de bicamadas depositadas.	89
Figura 56: Voltametria cíclica do filme PAH/fitase 10 bicamadas para a detecção do ácido fítico (A). Curva de corrente a -0,2 V versus concentração de ácido fítico (B).	90
Figura 57: Resposta amperométrica do filme PAH/fitase obtida a 0,0 V (versus SCE) em tampão acetato a pH 5,5. Cada estágio de corrente corresponde a um aumento de 0,5 mmol/L de ácido fítico. As setas indicam as adições consecutivas de ácido fítico.....	92
Figura 58: Curvas analíticas obtidas para os filmes automontados com 4 (●), 8 (●), 10 (●) e 14 (●) bicamadas.	93
Figura 59: Efeito da adição de íons fosfatos, tampão, inositol, DPPC e fenil fosfato.....	94
Figura 60: Estabilidade do sensor PAH/fitase 10 bicamadas estocado em tampão acetato de sódio a 4°C.	95
Figura 61: Absorbância em 280 nm versus tempo de adsorção da camada de fitase. A linha sólida representa o ajuste com a equação de JMA.	98
Figura 62: Imagem de AFM do filme automontado PAH/fitase 10 bicamadas adsorvido sobre um substrato de quartzo com um janela de $1 \times 1 \mu m^2$ (A). Perfil da altura do filme (B). ..	99
Figura 63: Média do diâmetro versus a média da altura dos domínios para o filme automontado PAH/fitase 10 bicamadas.....	100
Figura 64: Curvas de capacitância (A) e perda (<i>Loss</i>) (B) versus a frequência do eletrodo puro em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).....	102

Figura 65: Curvas de capacitância (A) e perda (<i>Loss</i>) (B) versus frequência para eletrodo contendo o filme automontado PAH/PVS em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).	102
Figura 66: Curvas de capacitância (A) e perda (<i>Loss</i>) (B) versus frequência para o eletrodo contendo o filme automontado PAH/fitase em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).	102
Figura 67: Perda (<i>Loss</i>) em 1 kHz das três unidades sensoriais: eletrodo interdigitado puro, contendo o filme automontado (PAH/PVS) ₇ e (PAH/PVS) ₂ (PAH/fitase) ₅ , como indicado na figura, para diferentes concentrações de ácido fítico.	104
Figura 68: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS) ₇ . Os valores das perdas em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de ácido fítico: 0 (○), 10^{-6} (×), 10^{-5} (+), 10^{-4} (*), 10^{-3} (□) e 10^{-2} (◇) M.	105
Figura 69: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS) ₂ +(PAH/fitase) ₅ . Os valores das perdas em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de ácido fítico: 0 (○), 10^{-6} (×), 10^{-5} (+), 10^{-4} (*), 10^{-3} (□) e 10^{-2} (◇) M.	106
Figura 70: Representação esquemática do processo de adsorção da COX em filmes automontados alternados com PAH sobre um substrato previamente modificado com filme automontado PAH/PVS (A) e arquitetura do filme (B). Representação idealizada do mecanismo de detecção do colesterol através da reação enzimática da COX com colesterol incorporado em lipossomos (C).	107
Figura 71: Absorbância em 280 nm versus tempo de adsorção da camada de COX. A linha sólida representa o ajuste com a equação de JMA.	109
Figura 72: Imagem de AFM do filme automontado PAH/COX 10 bicamadas adsorvido sobre um substrato de quartzo com um janela de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ (A). Perfil da altura do filme (B).	110
Figura 73: Média do diâmetro dos domínios versus média da altura para o filme automontado PAH/COX 10 bicamadas.	110
Figura 74: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS) ₇ . Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol incorporado em lipossomos: 0 (○), 10^{-6} (×), 10^{-5} (+), 10^{-4} (*) e 10^{-3} (□) M.	112
Figura 75: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS) ₂ (PAH/PVS) ₅ . Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol incorporado em lipossomos: 0 (○), 10^{-6} (×), 10^{-5} (+), 10^{-4} (*) e 10^{-3} (□) M.	112
Figura 76: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS) ₂ +(PAH/COX) ₅ . Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol presente na gema natural de ovo: 10^{-5} (○), 10^{-4} (×) e 10^{-3} (+) M.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espessura de cada camada adsorvida de PAMAM ou lipossomo de DPPG.	57
Tabela 2: Tempo de vida (τ) e fator pré-exponencial normalizado (α), para três exponenciais, da melanina pura e em lipossomo.	63
Tabela 3: Espessura e rugosidade do filme calculados a partir do melhor ajuste das curvas de refletividade de nêutrons.	70
Tabela 4: Parâmetros n , τ e k obtidos da equação JMA para o ajuste dos dados de cinética da camada de fitase no filme automontado.	98
Tabela 5: Parâmetros n , τ e K obtidos da equação JMA para o ajuste dos dados da cinética de adsorção de uma camada da COX no filme automontado.....	109

RESUMO

A imobilização de moléculas de interesse biológico em superfícies sólidas é essencial para uma série de aplicações biotecnológicas. Dentre as técnicas de imobilização, a automontagem camada por camada por adsorção física possui inúmeras vantagens, incluindo condições brandas e fisiológicas de preparação, capacidade de incorporar diferentes biomoléculas, e controle molecular. Nesta tese foram explorados filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico, bem como modelos de membranas, em que foram empregadas a técnica de automontagem e a preparação de lipossomos. Os lipossomos, que serviram como modelos de membrana, foram imobilizados em filmes automontados e sua integridade estrutural foi mantida. Também foram utilizados para incorporar e estabilizar melanina, e então imobilizados em filmes automontados, com preservação da propriedade fluorescente da melanina. A automontagem também foi utilizada para imobilização das enzimas uricase, fitase e colesterol oxidase, alternadas com camadas de polieletrólitos. Estes filmes mostraram bom desempenho como biossensores amperométricos para uricase e fitase, e como biossensores usando espectroscopia de impedância para a fitase e colesterol oxidase. Tais biossensores foram usados para detectar baixas quantidades de ácido úrico, ácido fítico e colesterol, respectivamente. Não houve efeitos de interferentes nos sensores amperométricos devido à utilização de eletrodos previamente modificados com azul da Prússia, que funcionou como mediador redox. A alta sensibilidade e seletividade dos biossensores foram atribuídas à natureza do filme ultrafino e à capacidade de reconhecimento das biomoléculas, respectivamente. Esta abordagem abre caminho para novas tecnologias de dispositivos para diagnósticos clínicos e análises de alimentos, bem como para entender mecanismos de interação da biomolécula com a membrana celular para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

ABSTRACT

The immobilization of molecules of biological interest on solid surfaces is essential for a number of biotechnological applications. Among the techniques for immobilization the layer-by-layer (LbL) method based on physical adsorption exhibits several advantages, including mild, physiological conditions for film preparation, ability to incorporate different biomolecules and molecular control. In this thesis, nanostructured films made with materials of biological interest were exploited as model membranes, where use was made of the LbL technique and liposomes. The latter, which served as membrane models, were immobilized in LbL films and had their structural integrity preserved. Liposomes were also used to incorporate and stabilize melanin, which were then deposited on LbL films with the fluorescence of melanin being preserved. The LbL method was also used to immobilize the enzymes uricase, phytase and cholesterol oxidase, alternated with layers of polyelectrolytes. These LbL films were employed in amperometric biosensors with uricase and phytase, and in biosensors based on impedance spectroscopy for phytase and cholesterol oxidase. Low amounts of uric acid, phytic acid and cholesterol were detected, respectively. There was no effect from interferents in the amperometric biosensors because the electrodes were previously modified with a layer of Prussian Blue, which acted as a redox mediator. The high sensitivity and selectivity were attributed to the ultrathin nature of the films and the ability of molecular recognition of the biomolecules, respectively. The approaches used here open the way for novel devices for clinical diagnostics and food quality control, in addition to understanding the interaction mechanisms between the biomolecules and the cell membranes, which is important for developing therapeutic agents.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Filmes finos nanoestruturados têm sido amplamente explorados em diferentes áreas, da física à medicina, e engloba compostos orgânicos, poliméricos e biológicos, além dos metálicos e inorgânicos [1]. A montagem destes filmes ultrafinos é essencial para o desenvolvimento de dispositivos moleculares, sensores, estudos de fármacos, bem como para o desenho de agentes terapêuticos [2]. Os métodos mais utilizados para a construção de filmes ultrafinos de materiais orgânicos e biológicos são as técnicas de Langmuir-Blodgett (LB) [3, 4], monocamadas automontadas (*self-assembly monolayer*, SAM) [5, 6] e camada por camada (*Layer-by-Layer*, LbL) [7, 8]. Ambas as técnicas de deposição Langmuir-Blodgett, desenvolvida durante a primeira metade do século XX por Langmuir [9] e Blodgett [10], e monocamada automontada (SAM), descrita por Sagiv [11] em 1979, têm mostrado uma notável capacidade para a imobilização de biomoléculas, como proteínas e células [1], e subseqüente aplicações em biocatálises, liberação controlada de drogas (*drug delivery*) e engenharia de tecidos [12]. No entanto, há algumas desvantagens intrínsecas de ambos os métodos que limitam determinadas aplicações em biotecnologia.

No caso do filme Langmuir-Blodgett as desvantagens estão na dependência de instrumentação relativamente cara, tempo de preparação, tipo de biomoléculas limitadas (filmes LB requerem moléculas anfifílicas) e uma considerável instabilidade da biomolécula devido à fraca atração física no interior do filme [12]. Para os filmes SAM, a desvantagem está na quantidade de material (biomolécula) sobre o filme, devido à sua natureza monomolecular [12]. Uma alternativa é o uso da técnica de automontagem camada por

camada (*Layer-by-Layer*, LbL), desenvolvida mais recentemente por Decher et al. [13, 14], baseada na atração eletrostática entre moléculas de cargas opostas. Esta técnica supera algumas das desvantagens das técnicas de LB e SAM. Não depende de instrumentação sofisticada, bastam alguns béqueres, utiliza moléculas solúveis em água, maior quantidade de moléculas adsorvidas no substrato e a alta estabilidade atribuída às condições brandas do processo de fabricação.

A inclusão de biomoléculas, proteínas e modelos de membranas, nestes sistemas é relevante porque podem simular interações específicas enzima-substrato, antígeno-anticorpo e/ou mimetizar a superfície da membrana celular, permitindo o desenvolvimento de dispositivos, como biossensores [1, 2, 12]. Tais dispositivos funcionalizados são originados a partir de uma combinação de processos físicos e químicos, como transferência de energia ou elétrons, e transformações químicas [12]. Estudos com mais de uma molécula tornam possível combinar estas propriedades, para fornecer mais estabilidade ou melhorar a montagem das biomoléculas, bem como para viabilizar a aplicação do sistema como dispositivos eletrônicos [15, 16, 17]. Além disso, dispositivos exigem controle na organização e orientação molecular em uma escala nanométrica. Esta é mais uma vantagem da técnica de automontagem, pois em condições ideais permite o controle da montagem de nanoestruturas com diferentes compostos.

Uma ampla gama de técnicas experimentais tem sido empregada no estudo e caracterização de filmes ultrafinos, obtidos através da técnica de automontagem. A construção de filme automontado pode ser acompanhada por espectroscopia UV-visível, fluorescência e ressonância de plasmon de superfície. Interações entre grupos químicos constituintes dos filmes podem ser identificados, por exemplo, através de espectroscopias vibracionais, ou por alterações nas propriedades elétricas e eletroquímicas dos filmes. Estas últimas, em particular, podem ser exploradas para o emprego dos filmes ultrafinos como sensores [17, 18].

Neste trabalho foram estudados filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico e modelos de membranas, usando as técnicas de automontagem e preparação de lipossomos. Os modelos de membrana, lipossomos, foram utilizados para incorporar melanina e estudar a imobilização em filmes automontados. Este tipo de abordagem tem por objetivo entender mecanismos de interação da biomolécula com a membrana celular para o desenho de agentes terapêuticos. A técnica de automontagem também foi usada para imobilizar as enzimas uricase, fitase e colesterol oxidase, alternadas com camadas de polímeros, visando à aplicação em biossensores para detecção de ácido úrico, ácido fítico e colesterol, respectivamente.

O texto está organizado da seguinte forma: No Capítulo 1 estão descritos os aspectos teóricos, com base na literatura, necessários para o desenvolvimento do trabalho, e os seus objetivos. No Capítulo 2 estão as metodologias e uma breve descrição das técnicas experimentais utilizadas. No Capítulo 3 são abordados resultados obtidos para filmes com lipossomos e melaninas em lipossomos. Os resultados obtidos para os filmes oriundos da imobilização das enzimas uricase e fitase e suas aplicações como biossensores amperométricos estão apresentados no Capítulo 4. No Capítulo 5 estão descritos os resultados para os filmes contendo as enzimas fitase e colesterol oxidase e suas aplicações como biossensores elétricos. As conclusões finais, perspectivas e referências bibliográficas são mostradas no Capítulo 6.

CONCEITOS E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir será apresentada uma revisão teórica e bibliográfica dos métodos empregados para a realização deste trabalho. Destacam-se filmes automontados nanoestruturados (LbL), modelos de membranas (lipossomos) e biossensores (amperométrico e por impedância elétrica). Além dos métodos também serão abordadas as características das biomoléculas utilizadas, melanina e das enzimas uricase, fitase e colesterol oxidase.

1.1 Filmes camada por camada (*Layer-by-layer*, LbL)

Decher, Lvov e colaboradores [13, 14] desenvolveram um método simples e versátil para preparar filmes, com diferentes políons e/ou materiais carregados. Biomoléculas carregadas, tais como DNA, fosfolipídios e proteínas, bem como nanopartículas inorgânicas podem ser incluídos nestes filmes [12]. Além da simplicidade, o baixo custo do processo de montagem é uma vantagem deste método, pois os instrumentos necessários para a produção do filme são apenas béqueres e pinça. A montagem do filme, em sua maioria, é baseada na interação eletrostática entre as camadas dos diferentes materiais.

As Figuras 1A e 1B ilustram, esquematicamente, o mecanismo de fabricação do filme automontado através da interação eletrostática entre um polycation e um poliânion, e a estrutura idealizada do filme automontado contendo uma bicamada, respectivamente. O polieletrólito aniônico é adsorvido em superfície carregada positivamente de um suporte sólido. Algumas superfícies, tais como metais, silícios e vidros, têm cargas negativas em solução devido a sua oxidação e hidrólise. Na Figura 1, o substrato estava inicialmente carregado positivamente e após a adsorção do poliânion a rede de cargas da superfície torna-se negativa (etapa 2). Em seguida, este substrato é imerso em solução contendo polieletrólito carregado positivamente que gera uma nova rede de cargas positiva na superfície. Como

resultado, obtém-se uma bicamada de polieletrólito sobre um substrato (etapa 3, Figura 1). Este processo pode ser repetido possibilitando a fabricação de filmes contendo multicamadas com estruturas e espessuras desejadas. Como a espessura de uma bicamada de polieletrólito é geralmente de cerca de 1 nm [7], a técnica de automontagem permite controle de espessura em escala nanométrica.

Figura 1: A) Representação esquemática do processo de deposição do filme automontado sobre um substrato sólido. As etapas 1 e 3 representam a adsorção dos polieletrólitos aniônico e catiônico, respectivamente, e as etapas 2 e 4 são os procedimentos de lavagem. No fim da etapa 4 tem-se a construção de um filme simples do tipo $(A/B)_n$. B) Estrutura idealizada do filme automontado contendo as duas primeiras etapas de adsorção dos polieletrólitos. Figura extraída de Decher [7].

A formação do filme automontado, inicialmente descrito pela interação eletrostática entre as moléculas, pode também ocorrer por outros tipos de interações, como ligações de hidrogênio, quimissorção, interações de van der Waals, hidrofóbicas, dentre outras [12]. Esta multiplicidade de interações intermoleculares favorece o emprego de diferentes moléculas, como as biomoléculas, onde o efeito cooperativo de atração em multipontos exerce papel fundamental na imobilização [12]. Importante também é que os filmes automontados são

construídos essencialmente com substâncias solúveis em água, favorecendo o emprego de biomoléculas. De fato, a desnaturação da biomolécula é minimizada devido à adsorção, que pode ser realizada em condições adequadas de pH e temperatura. Estes filmes são altamente permeáveis para pequenas moléculas e íons, tornando um sistema apropriado para funções baseadas na interação entre biomoléculas imobilizadas e substâncias livres em solução [2, 12].

A simplicidade, versatilidade e robustez da técnica de automontagem e a possibilidade do emprego de diferentes biomoléculas para diferentes aplicações, levaram a um crescente interesse dos grupos de pesquisa nesta área. Desde 1997 quando Gero Decher [7] mostrou que era possível depositar camadas poliméricas de cargas opostas sobre um substrato com controle molecular, o número de artigos publicados a cada ano em filmes automontados tem crescido exponencialmente [19]. Em 2007, por exemplo, mais de 1000 artigos foram publicados neste tópico, sendo que 30% destes artigos estão relacionados à aplicações biológicas [20].

Os pioneiros a estudar filmes automontados com biomoléculas foram Sukhorukov e colaboradores (1996) [21] e Montrel e colaboradores (1997) [22] que fabricaram filmes automontados contendo ácido desoxirribonucléico (*deoxyribonucleic acid*, DNA) aniônico alternado com os polieletrólitos poli(etileno imina) (PEI), poli-L-lisina (PLL) e cloreto de poli(alilamônio) (PAH). A estrutura do DNA nesses filmes foi investigada por espectroscopias vibracionais e eletrônicas. Os autores mostraram que as forças no filme eram interações eletrostáticas entre os grupos fosfatos (PO_4^{2-}) carregados negativamente do DNA e os grupos carregados positivamente dos policátions. A estrutura dupla-hélice do DNA foi conservada em todos os filmes e moléculas de água foram encontradas nos filmes ligadas aos centros de hidratação do DNA (grupos fosfatos). Filmes contendo DNA apresentaram boa bioatividade e notável habilidade de ligação com diferentes moléculas intercaladas com DNA, incluindo agentes antitumorais [23].

A estabilidade e atividade de proteínas em filmes automontados foi demonstrado por Onda e colaboradores em 1999 [24] com a imobilização da enzima glicose oxidase (GOD) em bicamadas alternadas com o polieletrólito PEI ou cloreto de poli(dialil dimetil amônio) (PDDA). Para testar a bioatividade da enzima imobilizada foi realizada uma sequência de reações enzimáticas através da imersão do filme polímero/GOD em uma solução contendo D-glicose, peroxidase (POD) e um corante (DA67). O filme polímero/GOD reagiu convertendo n-glicose e O_2 em D-glucono-d-lactona e H_2O_2 . A POD e o corante DA67 (indicador) reagiram com o H_2O_2 usado como agente oxidante. O produto de oxidação do DA67 tem coeficiente de extinção alto e absorve em 665 nm, a reação enzimática e a atividade da GOD foram monitoradas pela mudança no espectro de absorção. Quando comparado à GOD nativa em solução, a atividade da GOD no filme foi reduzida em 20%, indicando que o processo de imobilização não causou extensa desnaturação da enzima. A atividade enzimática do filme GOD foi mantida por 14 semanas quando estocadas em tampão a 4°C. Desde então inúmeros trabalhos vêm surgindo com a imobilização de proteínas, tais como as enzimas. A imobilização destas enzimas em filmes automontados, em sua maioria, tem como finalidade a construção de biossensores [2].

Mais recentemente, Michel e colaboradores (2004) [25] mostraram que vesículas de fosfolipídios (lipossomos) também podem ser incorporadas em filmes com multicamadas de polieletrólito, poli(ácido glutâmico)/cloreto de poli(alilamônio) (PGA/PAH), construído pelo método de automontagem. Imagens de microscopia de força atômica (AFM), análises de microbalança de quartzo e elipsometria mostraram que os lipossomos permaneceram intactos quando aderidos na superfície. A Figura 2 ilustra a imagem de AFM do filme contendo vesículas. A morfologia granular do filme sugere que a morfologia esférica dos lipossomos foi mantida e que o diâmetro das partículas depositadas seja de 100 a 400 nm, compatível com o diâmetro das vesículas em solução. Este trabalho abriu caminho para a construção de filmes

contendo lipossomos em multicamadas que podem funcionar como "reservatórios" de fármacos, como agente terapêutico, ou nanorreatores enzimáticos [26, 27].

Figura 2: Imagem de AFM 3D (2x2 μm) do filme automontado PEI/(PGA/PAH)₂/vesículas/(PGA/PAH)₂. Figura adaptada de [25]

A partir das publicações que mostraram a viabilidade na utilização de biomoléculas, a preparação de filmes finos tem sido das mais ativas áreas de pesquisa em filmes camada por camada [19]. Diferentes tipos de biomoléculas podem ser incorporados e então usados como biossensores, e mais recentemente em liberação controlada de fármacos através da imobilização de modelos de membrana [28]. Neste contexto, para entender o funcionamento das biomoléculas em filmes finos é necessário fazer uma abordagem ampla das diferentes construções de modelo de membranas e biossensores, bem como os métodos de análise.

1.2 Modelos de membrana celular

Membranas biológicas se caracterizam por uma bicamada lipídica que serve como barreira para o transporte de determinadas moléculas (Figura 3). As moléculas que constituem a bicamada não estão ligadas covalentemente entre si, e por isso possuem certa flexibilidade, com mudança na sua forma e nos seus movimentos [29]. São constituídas basicamente por lipídios (tais como: fosfolipídios, esfingolipídios e colesterol), proteínas e carboidratos como parte de glicoproteínas e glicolipídios. As proporções relativas a proteínas e lipídios variam

com o tipo de membrana e função da mesma [30]. Devido à complexidade da membrana celular, mecanismos de interações lipídio-biomolécula e suas funções têm sido estudados através de modelos de membranas simplificados, denominados sistemas biomiméticos [31, 32].

Figura 3: Modelo da membrana celular. Figura adaptada de [33].

Dentre os sistemas biomiméticos da membrana celular os modelos mais estudados são os filmes de Langmuir [31] obtidos com moléculas de lipídios na interface ar/água, e os lipossomos [32], que são vesículas de fosfolipídios mimetizando uma bicamada lipídica em forma esférica. Este último método foi introduzido em 1965 por Bangham e colaboradores [34] em estudos de difusão de íons na membrana lipídica artificial. Nos últimos anos, os lipossomos vêm sendo estudados na incorporação e liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), essencialmente devido à sua capacidade de proteção, versatilidade estrutural, composição, fluidez e possibilidade de incorporar moléculas indiferentemente de solubilidade e estrutura [35].

Os lipossomos são obtidos pela dispersão de fosfolipídios em meio aquoso e podem ser constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas intercaladas com meio aquoso. O tamanho, bem como o número de bicamadas por vesícula, pode ser controlado com o método

de preparação e composição do lipídio. Os lipossomos mais encontrados na literatura são vesículas multilamelares (*multilamellar vesicle*, MLV), vesículas unilamelares (*small unilamellar vesicle*, SUV) e vesículas unilamelares gigantes (*large unilamellar vesicle*, LUV). Os três tipos de suspensão lipídica estão descritos na Figura 4.

Figura 4: Representação esquemática da bicamada lipídica e dos lipossomos, MLV, SUV e LUV. Figura obtida da *Avanti Polar Lipids* [36].

1.2.1 Imobilização dos lipossomos em substratos sólidos

Os lipossomos podem ser imobilizados sobre um substrato para estudar as interações entre membranas e moléculas de interesse biológico, tais como proteínas, peptídeos ou fármacos. As superfícies de membranas lipídicas são usualmente receptoras de ligações biológicas, pois os elementos de reconhecimento estão expostos na parte externa da célula [35]. Imobilização e estabilização dos lipossomos sobre superfícies sólidas exercem papel fundamental para biossensores [37], que são baseados nas interações entre lipídios imobilizados e proteínas específicas, e para o desenho de sistemas de liberação controlada de

fármacos como adesivos (*patches*) [38], que requer a incorporação do fármaco ou proteína nos lipossomos.

Vários métodos para gerar sistemas modelo de membrana em substratos sólidos têm sido descritos na literatura, incluindo os filmes de Langmuir-Blodgett (LB) e filmes camada por camada. A técnica camada por camada permite que os fosfolipídios sejam montados com multicamadas de polieletrólitos, que podem servir como matriz apropriada para imobilização. Além disso, também podem encapsular biomoléculas sem alterar o ambiente aquoso nativo, sem contato direto com os polieletrólitos. Uma vez que as camadas exteriores e interiores dos lipossomos são hidrofílicas, as interações com as superfícies incluem forças eletrostáticas e de hidratação, além de forças de van der Waals [39].

Devido à baixa estabilidade da bicamada lipídica em suportes sólidos, estudos têm sido feitos para preservar a estabilidade do lipossomo em filmes automontados. Volodkin e colaboradores [40] produziram filmes automontados com lipossomos utilizando dois polieletrólitos biocompatíveis, ácido hialurônico (HA) e poli-L-lisina (PLL). A morfologia do filme foi caracterizada e comparada à morfologia de um filme dos mesmos polieletrólitos, mas com partículas de látex rígidas ao invés dos lipossomos. Ambas as morfologias foram similares, indicando que os lipossomos, quando recobertos com PLL, mantêm sua forma esférica. A Figura 5 representa esquematicamente o sistema de deposição dos lipossomos proposto por Volodkin e colaboradores [40].

Figura 5: Esquema da imobilização de lipossomos em filmes automontados. Lipossomos foram recobertos com PLL e então depositados sobre o substrato contendo um filme automontado PLL/HA de 12 bicamadas. Figura adaptada de [40]

1.2.2 Estabilização da melanina em lipossomos

Melaninas pertencem a uma classe importante de bio-macromoléculas contidas em diferentes órgãos dos organismos vivos [41]. Podem ser encontradas em diversas regiões do corpo humano e animais, como pele, cabelo, olhos, e nas plantas, como chá verde. Existem três classes de melaninas: eumelaninas, feomelaninas e allomelaninas [42], sendo as eumelaninas atualmente as mais investigadas [43]. Estas são encontradas em animais e se apresentam na forma de pigmentos marrom e preto. Estas bio-macromoléculas têm propriedades físico-químicas variadas, incluindo fotocondução e piezeletricidade, e exercem funções como fotoproteção, fotossensibilização, e termorregulação [42]. Podem absorver numa larga faixa do UV-visível e agem como antioxidantes [44, 45]. Devido a essa variedade de funções e propriedades físicas, estas macromoléculas vêm sendo usadas no tratamento de doenças [46], e em dispositivos eletrônicos, fotoativos e biossensores [47].

A imobilização e manipulação da melanina em substratos sólidos são interessantes para aplicações tecnológicas por causa das propriedades eletrônicas que apresentam, além de servir para investigar o processo de automontagem [48]. No entanto, essa é uma tarefa difícil devido a sua baixa solubilidade e estabilidade química em meio aquoso e pelos filmes apresentarem suas estruturas heterogêneas. Há relatos de deposição de melanina sobre

substratos sólidos através de técnicas de evaporação de solvente (*film cast*) [49], mas este procedimento geralmente resulta em filmes não-homogêneos, descontínuos e pouco reprodutíveis. A otimização da manipulação de melaninas com o uso de detergentes, como o dimetilsulfóxido (DMSO), e solventes alternativos tem sido investigada [48-50]. Entretanto, a incorporação da melanina em vesículas lipídicas (lipossomos), que poderia propiciar um ambiente mais próximo do fisiológico, sem usar solventes orgânicos ou pHs elevados, tem sido pouco explorada.

1.3 Biossensores

Um biossensor geralmente é definido como dispositivo analítico contendo um elemento biológico capaz de reconhecer determinada substância, conectado ou integrado em um transdutor que converte uma resposta biológica em um sinal eletrônico ou óptico proporcional à concentração do composto a ser detectado [51]. A Figura 6 representa esquematicamente os componentes de um típico biossensor: a) biorreceptor que interage especificamente com o analito; b) arquitetura da interface onde uma molécula biológica específica interage com o analito e dá origem a um sinal captado pelo c) transdutor. O sinal do transdutor é convertido em um sinal eletrônico e amplificado por um circuito detector utilizando uma referência apropriada e enviado para um processador, como um software de computador (d) para ser convertido em parâmetros físicos que descrevem o efeito envolvido no sistema (e). Os biossensores podem ser aplicados em diversas amostras, tais como fluidos humanos (sangue, urina e saliva), amostras de alimentos, culturas celulares e em amostras ambientais (solo, ar, e água).

Figura 6: Elementos e componentes de um típico biossensor. Figura adaptada de Grieshaber e colaboradores [51].

Os biossensores são geralmente muito seletivos devido à possibilidade de adequar a interações específicas de determinados compostos biológicos através da sua imobilização sobre a superfície de um eletrodo (sensor). Dentre as moléculas de reconhecimento específico utilizadas em biossensores estão as enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos e antígenos, sendo as enzimas as mais encontradas na literatura [1, 2, 12]. Para explorar as interações específicas através do biorreconhecimento, a arquitetura da superfície do sensor também deve suprimir qualquer interação não-específica. Inúmeros esforços têm sido feitos para modificar superfícies capazes de eliminar qualquer interação do analito ou interferentes diretamente com a superfície e conseqüentemente capazes de prolongar o tempo de vida do biossensor [52].

Uma multiplicidade de biossensores pode ser encontrada em laboratórios do mundo todo, inclusive sendo utilizados como ferramenta de diagnóstico em testes clínicos. Mas a produção de dispositivos portáteis e baratos está praticamente limitada a um exemplo bem conhecido, o sensor de glicose [53]. Em muitos casos as principais limitações da produção de dispositivos para teste de diagnósticos são a habilidade para melhorar o princípio de

transdução e a falta de boa relação custo-eficácia do método de produção. Portanto, os testes clínicos são limitados aos usuários experientes, alto custo do equipamento, necessidade de laboratório e não podem ser utilizados, por exemplo, pelos próprios pacientes ou médicos no campo.

Publicações relacionadas a sensores foram esparsas no início do século 20. O primeiro sensor foi introduzido por Clark em 1955/56 [54] com o eletrodo para detectar oxigênio. As subseqüentes modificações do eletrodo de oxigênio levaram a outra publicação em 1962 [55], com o primeiro sensor de glicose, realçando sensores eletroquímicos com um transdutor baseado na enzima glicose oxidase. A tecnologia desse trabalho foi transferida e desenvolvida pela *Yellow Spring Instrument Company* levando ao lançamento comercial do primeiro biossensor de glicose em 1975 [56]. Desde então, várias formas de biossensores de glicose foram desenvolvidas [52], assim como muitas outras tecnologias de dispositivos [57].

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a técnica utilizada para traduzir um processo bioquímico em um sinal analógico, que incluem: sensores óticos [58], piezelétricos [59], calorimétricos [68], eletroquímicos [51] e elétricos [61]. Podem também ser classificados de acordo com a biomolécula que reconhece o analito alvo, por exemplo: sensores por afinidade, quando o biorreceptor usa somente interações como antígeno-anticorpo [61], sensores enzimáticos ou catalíticos, quando o analito é o substrato da enzima que participa de uma reação catalítica detectada através do sinal produzido pelo substrato ou produto da reação enzimática [51]. As técnicas de eletroquímica e impedância elétrica possibilitam medir propriedades elétricas para extrair tais informações dos sistemas biológicos. A seguir serão descritas algumas das características de ambas as técnicas.

1.3.1 Biossensores eletroquímicos

Biossensores eletroquímicos são normalmente baseados na catálise enzimática de uma reação que produz ou consome elétrons, por exemplo as enzimas oxido-redutases [51]. Um sistema de sensoriamento eletroquímico usualmente contém três eletrodos, um eletrodo de referência, que mantém o potencial constante, um contra eletrodo e um eletrodo de trabalho, onde ocorre o processo biológico. O composto a ser analisado reage na superfície do eletrodo de trabalho, e os íons produzidos geram sinal.

Dos sensores eletroquímicos o mais utilizado é o biossensor amperométrico [62] que baseia-se na medida de corrente em função do tempo, quando o eletrodo é mantido a um potencial apropriado e constante. A mudança da corrente registrada é proporcional à quantidade de espécies eletro-reduzidas/oxidadas, ou seja, proporcional à concentração do analito. O sinal deste biossensor é gerado pela troca de elétrons entre o sistema biológico na camada biorreceptora e o eletrodo. A Figura 7 ilustra os princípios de trabalho de uma biossensor amperométrico.

Figura 7: Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico. Figura adaptada de [62].

Biossensores amperométricos têm a vantagem de serem altamente sensíveis, apresentarem resposta rápida e serem de baixo custo, em comparação aos biossensores ópticos, calorimétricos e piezelétricos. Porém, a contaminação da superfície do eletrodo pode

causar falhas, o que tem sido evitado com o uso de uma membrana excluindo interferentes ou substâncias indesejáveis na reação. Assim, permite-se somente a passagem de oxigênio e peróxido de hidrogênio, como descrito por Clark para o sensor de oxigênio [54].

Moléculas de O_2 e H_2O_2 em contato com o eletrodo de trabalho em altos potenciais, oxidam e/ou reduzem espontaneamente, gerando um sinal. Usando este princípio, pesquisadores constroem eletrodos com enzimas oxidases que geram peróxido de hidrogênio detectado em altos potenciais [63]. Para estes eletrodos não é conveniente usar membrana seletiva, uma vez que o substrato (analito) tem que interagir com a enzima fixada no eletrodo. Por isso, esses biossensores estão sujeitos a interferentes de outras espécies eletroativas, tais como ácido úrico e ácido ascórbico, que também são oxidadas em altos potenciais. Uma alternativa para este problema tem sido o uso de outras enzimas, as peroxidases, que catalisam a redução do H_2O_2 e possibilitam a transferência de elétrons entre o subproduto da enzima e o eletrodo [17]. Esta abordagem, embora apresente boa sensibilidade e precisão, tem como desvantagem o alto custo e baixa estabilidade, bem como a limitação na imobilização sobre um substrato sólido.

O problema de interferentes vem sendo resolvido nas últimas décadas com o emprego de mediadores inorgânicos eletroquímicos, que catalisam a oxidação ou redução do peróxido de hidrogênio [52]. Com mediadores, pode-se operar com um potencial aplicado menor, eliminando os efeitos dos interferentes eletroquímicos. Nesta perspectiva, hexacianoferratos e em particular Azul da Prússia (*Prussian Blue*, PB), hexacianoferrato (II) férrico, têm sido amplamente utilizados.

1.3.1.1 Eletrodo modificado com Azul da Prússia

A detecção do H_2O_2 , gerado pela reação catalítica das enzimas oxidases, é a principal ferramenta de detecção em biossensores amperométricos, pois sua concentração é diretamente proporcional à concentração do substrato (analito) da enzima. Após as descobertas de Neff

(1978) [64] e Itaya (1982) [65], a primeira tentativa para estudar o azul da Prússia como mediador eletroquímico de peróxido de hidrogênio foi feita por Boyer e colaboradores [66] em 1990 com o eletrodo de pasta de carbono. Embora eles tenham demonstrado um bom desempenho analítico (detecção linear de 0,03 a 0,003 M operando a -0,4 V versus SCE), o experimento despertou pouco interesse até 1994 quando Karyakin e colaboradores [67] demonstraram o processo de otimização do PB sobre um substrato sólido aumentando a capacidade catalítica para H_2O_2 .

Mais tarde foi investigado o peróxido de hidrogênio em diferentes potenciais, permitindo o uso de eletrodos modificados com PB aplicando um potencial de 0,0 V versus Ag/AgCl com uma sensibilidade de micromolar [68]. Nas condições otimizadas, ou seja, deposição eletroquímica de uma camada fina de PB, a detecção do H_2O_2 foi muito similar ao obtido com o uso de enzimas peroxidases [68, 69]. Devido à alta atividade catalítica e seletividade o PB foi considerado uma “peroxidase artificial”. O potencial de detecção (0,0 V versus Ag/AgCl) foi baixo o suficiente para evitar efeitos dos interferentes mais comuns, como ácido úrico e ácido ascórbico [69]. Após a otimização do PB na detecção de H_2O_2 , houve grande aumento na aplicação de biossensores com PB [52]. Mais de dez enzimas têm sido acopladas com PB, e em todos os casos um bom desempenho em termos de limite de detecção e em nível de interferentes foi obtido, adequado para diferentes procedimentos amperométricos [52].

Um biossensor amperométrico de glicose baseado na imobilização da glicose oxidase (GOD) em filmes automontados sobre um substrato de *óxido* de índio dopado com estanho (*indium tin oxide, ITO*) modificado com PB foi construído no nosso grupo de pesquisa [70]. O biossensor apresentou alta sensibilidade e limite de detecção de $0,2 \text{ molL}^{-1}$. A alta sensibilidade foi atribuída à natureza do filme ultrafino, além de o sistema operar em baixo potencial, que só possível devido à eficiência na catálise do H_2O_2 na reação enzimática com a

presença de PB. A seletividade para a glicose foi demonstrada pela inexistência de efeitos de interferentes, como ácido ascórbico e ácido úrico. O biossensor manteve-se estável durante 20 dias indicando a estabilidade do sistema PB + GOD.

1.3.2 Biossensores com medidas de impedância elétrica

Biossensores baseados em medidas de impedância elétrica podem trazer diferentes informações do sistema, desde mudanças no filme a mudanças no meio. Medidas de impedância com tensão ou corrente alternada (AC) de um material combinam ambas as propriedades capacitiva e resistiva [71]. As regiões de frequência da tensão AC podem dar informações das propriedades elétricas dos diferentes eventos do sistema em análise, como as reações biológicas na superfície do eletrodo. Uma variedade de biomoléculas tem sido usada como biossensores com medidas AC, com diferentes graus de sucesso. Em particular, anticorpos e moléculas de reconhecimento [61] têm sido imobilizados sobre eletrodos, com a detecção sendo feita através da mudança de capacidade e/ou resistência quando o antígeno liga-se ao sensor. Embora medidas de impedância AC não tenham sido tão exploradas em sistemas biológicos, há vários trabalhos, incluindo uma patente, descrevendo este modelo de detecção com sensores de filmes poliméricos, como exemplo a “língua eletrônica” [72].

Medidas de impedância AC foram usadas para detectar uréia, com filme contendo material polimérico e urease [73]. A produção de íons amônio gerada da reação urease-uréia nas amostras resultou em mudança no pH, provocando aumento na capacitância. A detecção de uréia entre 2 e 100 mM foi obtida com uma mudança na resposta elétrica, ao longo deste intervalo, por mais de quatro ordens de grandeza. Zucolotto e colaboradores [18] desenvolveram um biossensor altamente sensível para detecção de catecol utilizando a enzima Cl-catecol 1,2-dioxigenase (CCD) depositada sobre um eletrodo interdigitado. A CCD foi imobilizada alternada com o dendrímero poli(amido amina) geração 4 (PAMAM-G4) usando a técnica de automontagem. Mudanças na capacitância, em função da concentração do

catecol, foram monitoradas nas frequências de 1Hz a 1 MHz. O limite de detecção atingido foi de 10^{-10} M. A detecção elétrica foi comparada com a detecção ótica, utilizando o mesmo biossensor, no qual o limite de detecção obtido foi de 10^{-7} M, ou seja, o sensor elétrico apresentou maior sensibilidade que o sensor ótico.

1.4 Enzimas

1.4.1 Uricase

A determinação de ácido úrico dissolvido em fluído humano é necessária no diagnóstico de doenças como gota, hiperuricemia, síndrome de Fanconi e as que são causadas por falhas do catabolismo da purina [74]. Sensores de ácido úrico têm sido produzidos desde 1980 com a enzima uricase [75], denotada como *urate oxidase* (UOx). Esta catalisa a oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio, que age como oxidante, produzindo alantoína e CO_2 como produto de oxidação do ácido úrico, e H_2O_2 como produto de redução do O_2 (Figura 8) [76]. Uma estratégia para detecção do H_2O_2 é o emprego do método amperométrico com enzimas oxidases. No caso da UOx existe um inconveniente, pois o próprio ácido úrico é oxidado em eletrodos convencionais, tais como platina (Pt), ouro (Au) e carbono em potenciais que são suficientes para oxidar o H_2O_2 . Para contornar este problema, vários autores desenvolveram eletrodos modificados para detectar o ácido úrico através da UOx utilizando potenciais baixos [76, 77] ou bloqueando o acesso do ácido úrico ao eletrodo permitindo somente a passagem do H_2O_2 , que é uma molécula menor que o ácido úrico [63].

Figura 8: Reação catalítica da enzima uricase com oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio produzindo alantóina e CO_2 como produto de oxidação do ácido úrico, e H_2O_2 como produto de redução do O_2 .

Kuwabata e colaboradores [76] imobilizaram a uricase em monocamada automontada sobre um eletrodo de ouro modificado com 2-aminoetano tiolato. A uricase foi depositada em conjunto com glutaraldeído como agente reticulante. O eletrodo Au/UOx apresentou resposta amperométrica ao ácido úrico com o uso de $[Fe(CN)_6]^{3-}$, como mediador de H_2O_2 , dissolvido em solução, podendo assim ser detectado em baixos potenciais (0,1 V versus SCE). Miland e colaboradores [77] depositaram a uricase com peroxidase de raiz forte (*horseradish peroxidase*, HRP) sobre eletrodos de pasta de carbono com poli(o-aminofenol), usado como polímero condutor. O H_2O_2 foi detectado a 0,05 V versus Ag/AgCl. Hoshi e colaboradores [63] prepararam sensores amperométricos usando uma membrana de polieletrólito e o método de multicamadas automontadas. Eles depositaram a UOx alternada com a poli(alilamina) (PAA) sobre eletrodos de Pt previamente modificados com uma membrana, resultando em um filme automontado contendo duas bicamadas de PAA/PVS (poli(vinil sulfônico), como apresentado na Figura 9. Moléculas de H_2O_2 poderiam passar livremente na membrana, que bloqueia moléculas maiores tais como o ácido úrico. Neste caso, a detecção amperométrica foi obtida a 0,6 V versus Ag/AgCl.

Figura 9: Imobilização da uricase em filme automontado sobre um eletrodo de Pt modificado com uma membrana de $(\text{PAA/PVS})_2$. Figura adaptada de [63].

Embora os biossensores mencionados aqui possibilitem detecção de ácido úrico na presença de interferentes, ácido ascórbico e dopamina, com eletrodos modificados, estes sistemas apresentam desvantagens. No biossensor proposto por Kuwabata e colaboradores [76], a uricase foi depositada com o método de reticulação através de ligações covalentes, dificultando a mobilidade da enzima e, conseqüentemente, a perda de atividade da mesma. No biossensor de Miland e colaboradores [77] a detecção do H_2O_2 em baixos potenciais foi possível devido à enzima peroxidase, mas com o inconveniente da baixa estabilidade da enzima. Para o sensor proposto por Hoshi [63], embora haja a estabilidade da enzima em filme automontado, a detecção do ácido úrico é conduzida em potencial em que ocorrem interferentes. Além disso, a membrana de polieletrólito deve ser seletiva a grandes moléculas e este filme não pode apresentar “imperfeições”.

1.4.2 Fitase

O ácido fítico (hexafosfato de mio-inositol) é uma fonte rica em fósforo, considerado reservatório de fosfato em cereais, legumes e grãos [78]. O fósforo é um nutriente essencial para todas as formas de vida, sendo essencial para os ácidos nucleicos, fosfolípidios e adenosina tri-fosfato (ATP) [79]. Entretanto, na forma de ácido fítico o fósforo é antinutricional, pois promove efeito inibitório sobre a biodisponibilidade de minerais, tendendo a quelar metais essenciais, como magnésio, zinco, ferro e cálcio, formando sais insolúveis e pouco biodisponíveis [80]. Além de antinutricional, contribui para a poluição do meio ambiente, pois a maior parte do ácido fítico ingerido é inevitavelmente excretado sem nenhum aproveitamento. De fato, os criadores inserem fosfatos inorgânicos na alimentação dos animais e grande quantidade desses fosfatos é lançada no meio ambiente pela prática agrícola através de esterco. O esterco espalhado é conseqüentemente levado do solo pelas águas que podem provocar um crescimento incontrolável de algas nos rios e mar. Esta eutroficação causa desequilíbrios na natureza e ameaça a vida aquática [81].

As fitases, além de combater a poluição, apresentam aspecto econômico positivo, pois o que não se gasta com os fosfatos inorgânicos nas rações de animais é aplicado na compra da enzima que catalisa o ácido fítico da ração, liberando fosfatos. Para que não haja excesso desta enzima é necessário o conhecimento da quantidade de ácido fítico dos alimentos e qual proporção ideal enzima-ácido fítico para minimizar o desperdício, viabilizando economicamente e diminuindo o impacto ambiental [82].

Os métodos mais utilizados para determinar o ácido fítico requerem procedimentos sofisticados, tais como ressonância magnética nuclear, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de fase reversa [83] e eletroforese em Gel de SDS-Policrilamida (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE) [84]. Biossensores baseados na atividade catalítica da enzima fitase podem constituir um método mais simples e rápido para a

quantificação e detecção do ácido fítico. Esta catálise do ácido fítico na presença da fitase e água produz inositol como produto de hidrólise do ácido fítico, e íons fosfatos (PO_4^{3-}) (Figura 10).

Figura 10: Reação catalítica da enzima fitase com ácido fítico produzindo inositol como produto de hidrólise do ácido fítico, e íons fosfatos (PO_4^{3-}).

Um biossensor amperométrico foi proposto por Mak e colaboradores [15] para detecção de ácido fítico baseado na co-imobilização das enzimas fitase e piruvato oxidase em eletrodos de platina. Ambas as enzimas foram imobilizadas com hidrogel de poli(carbamoil sulfonado) (PCS), sendo o sistema de detecção bi-enzimático apresentado na Figura 11. A fitase hidrolisa o ácido fítico gerando íons fosfatos, catalisados pela piruvato oxidase gerando H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio é então oxidado a 0,6 V versus Ag/AgCl na superfície do eletrodo. O limite de detecção foi de 0,002 mM com resposta linear de 0,2 a 2 mM. Apesar de o sistema oferecer uma alternativa para detecção de ácido fítico aos métodos convencionais, apresenta inconvenientes, como a pouca estabilidade da piruvato oxidase, que diminui a eficiência do biossensor com o tempo de armazenamento, e o efeito de interferentes, uma vez que o sensor opera em alto potencial.

Figura 11: Diagrama esquemático do mecanismo de detecção do ácido fítico com o eletrodo contendo as enzimas fitase e piruvato oxidase. Figura adaptada por [15].

1.4.3 Cholesterol oxidase

Biossensores contendo a colesterol oxidase imobilizada podem ser vantajosos em comparação aos métodos tradicionais de detecção do colesterol, como por exemplo, espectrofotometria [85], cromatografia gás-líquido e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC) [86, 87], devido à simplicidade e baixo custo. O desenvolvimento de métodos viáveis para detecção de colesterol no sangue, um parâmetro fundamental para identificar distúrbios como hipercolesterolemia [88, 89], é necessário. Além disso, é importante para controlar a quantidade de colesterol em alimentos para o consumo humano. O colesterol é um esterol encontrado em ovos, carnes, queijos amarelos, e derivados. A enzima colesterol oxidase catalisa a reação química do colesterol, que na presença de oxigênio produz colesteno e H₂O₂ (Figura 12).

Figura 12: Reação catalítica da enzima colesterol oxidase com oxidação do colesterol na presença de oxigênio produzindo colesteno-3,6-diona e H_2O_2 .

Biossensores para colesterol têm sido amplamente utilizados em análises bioquímicas devido à boa seletividade, resposta rápida, baixo custo, portabilidade e longa estabilidade [90]. Os biossensores de colesterol descritos na literatura em sua maioria são focados em diagnosticar doenças [17, 90] e no controle de alimentos. Por exemplo, Basu e colaboradores [16] desenvolveram um biossensor com co-imobilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase para determinar o teor de colesterol em alimentos, utilizando medidas eletroquímicas. As enzimas foram imobilizadas por reticulação com glutaraldeído e albumina de soro bovino (BSA) sobre um substrato de ouro. Este sensor apresentou resposta linear de 2 a 50 mg/dL de colesterol, em uma faixa que permite aplicação em amostras reais de alimentos. Porém, neste estudo o colesterol foi detectado na presença de Triton X-100 e não em amostras reais.

Um outro sistema multienzimático contendo as enzimas colesterol oxidase e peroxidase de raiz forte (HRP) foi apresentado por Bongiovanni e colaboradores [17], para um biossensor eletroquímico que detectava colesterol a um potencial de -280 mV vs. Ag/AgCl na presença de Triton X-100. A resposta amperométrica foi linear de 0,04 a 0,27 mM. A imobilização da colesterol oxidase em filmes automontados com poli(etileno imina)

(PEI) foi relatada por Ram e colaboradores [90], sendo que a forte interação entre a proteína e o polieletrólito melhorou a estabilidade da multicamada, e conseqüentemente manteve a atividade da enzima devido às condições brandas de deposição. As multicamadas PEI/COX foram depositadas sobre eletrodo de ITO e então analisada a resposta eletroquímica do sistema. Para este biossensor foi obtida uma resposta amperométrica linear de 0,1 a 1 mM da concentração de colesterol em Triton X-100 com potencial de 0,6 V versus Ag/AgCl. Embora o sistema de deposição seja mais eficaz do que em outros trabalhos descritos na literatura, a detecção foi realizada em alto potencial, ou seja, tem-se o efeito de interferentes. Além disso, como nos outros trabalhos, a detecção foi realizada com o colesterol na presença de Triton X-100.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo de filmes automontados nanoestruturados contendo moléculas de interesse biológico, como modelo de membrana e enzimas, com o intuito de aplicação em agentes terapêuticos e desenvolvimento de protótipos de biossensores, respectivamente. Dentre as metas específicas, destacam-se:

- 1 Estudar a integridade de lipossomos do fosfolipídio dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) imobilizados em filmes automontados com o dendrímero poli(amido amina) geração 4 (PAMAM-G4)
- 2 Avaliar a estabilidade da melanina incorporada em lipossomos de DPPG, e então imobilizar o sistema melanina em lipossomos em filmes automontados com poli(etileno imina) (PEI).
- 3 Imobilizar as enzimas fitase e uricase em filmes automontados, alternadas com polieletrólitos, cloreto de poli(alilamônio) (PAH) e cloreto de poli(dimetildialilamônio) (PDAC) e PEI, para detecção amperométrica do ácido fítico e ácido úrico, respectivamente.
- 4 Imobilizar as enzimas fitase e colesterol oxidase em filmes automontados, alternadas com o polieletrólito PAH, para detectar ácido fítico e colesterol, respectivamente. Para o colesterol, em particular, realizar a detecção em amostra real (gema de ovo de galinha).

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

2.1 Materiais

2.1.1 Lipossomos

Os lipossomos foram preparados a partir do fosfolipídio dipalmitoil fosfatidil glicerol (*1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-rac-(1-glycerol)]*, DPPG) adquirido comercialmente da *Avanti Polar Lipids* com alto grau de pureza ($> 99\%$) e massa molecular $744,96 \text{ g mol}^{-1}$. Este fosfolipídio, além de ser um dos mais estudados em modelos de membranas, foi selecionado devido a sua carga negativa em pH~7. Os reagentes utilizados para solubilizar o DPPG foram metanol e clorofórmio com grau de pureza para cromatografia obtidos da *Merck* e *Mallinkrod*, respectivamente. Os fosfolipídios foram então hidratados com água ultrapura, do sistema de purificação Milli-Q com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega$ e pH $\sim 5,7$. A melanina sintética, preparada através da oxidação de tirosina com peróxido de hidrogênio e incorporada nos lipossomos, e a proteína albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA) foram adquiridas da *Sigma-Aldrich* com grau de pureza $\geq 97\%$ e $\geq 96\%$, respectivamente. As estruturas do fosfolipídio DPPG e da melanina estão representadas na Figura 13.

Figura 13: Estrutura química da melanina sintética e do fosfolípido DPPG.

2.1.2 Polieletrólitos

Os filmes contendo lipossomos e lipossomos+melanina foram automontados alternados com o dendrímero poliamidoamina geração 4 (PAMAM-G4) e o polieletrólito poli(etilenoimina) (PEI), respectivamente. Na fabricação dos filmes contendo enzimas foram utilizados como polieletrólitos o cloreto de poli(alilamônio) (PAH), cloreto de poli(dodecildimetil amônio) (PDAC) e PEI. Antes da deposição dos filmes, foi depositado sobre o substrato um filme contendo os polímeros PAH e poli(vinil sulfonato de sódio) (PVS), que atua como camada intermediária para diminuir efeitos do substrato. Os polieletrólitos PEI (massa molecular média, M_w média = 25000 g/mol), PDAC (alta M_w média = 400000-500000 g/mol), PVS (25% da massa total, wt, em H_2O) e o dendrímero PAMAM-G4 (solução metanólica 10% peso a peso, M_w = 14215 g/mol) foram adquiridos comercialmente da *Sigma-Aldrich* e o PAH (M_w média = 60000) foi obtido da *Alfa Aesar*. A Figura 14 ilustra as estruturas químicas dos polieletrólitos descritos acima.

As enzimas fosfolipase, fitase de *Aspergillus ficuum* (EC 3.1.3.8) (1,1 unidades/mg, ponto isoelétrico, PI = 4,5), e oxidoreduções, uricase de *Bacillus fastidiosus* (EC 1.7.3.3) (~9 unidades/mg, PI = 5,4) e colesterol oxidase (EC 1.1.3.6) (100 unidades/mg, PI = 4,6 - 5,2) foram obtidas comercialmente da *Sigma-Aldrich*. Os analitos ácido fólico, ácido úrico e colesterol, adquiridos da *Aldrich*, *Fluka* e *Sigma*, respectivamente. Uma vez que o colesterol é insolúvel em água, um sistema biomimético foi empregado usando o colesterol incorporado em lipossomos. O lipídio utilizado neste sistema foi o fosfolipídio natural fosfatidil glicerol de ovo de galinha (EggPG) ($M_w = 771$ g/mol) obtido da *Avanti Polar Lipids*. A gema natural de ovo de galinha utilizada nas análises de colesterol foi obtida comercialmente da Mr. Valley. A concentração do colesterol na gema foi calculada a partir das informações nutricionais

fornecidas pelo produtor. A Figura 15 representa as estruturas terciárias das enzimas e estruturas químicas dos analitos estudados.

Figura 15: Estruturas terciárias das enzimas fitase, uricase e colesterol oxidase, e estruturas químicas dos analitos ácido fítico, ácido úrico e colesterol. As estruturas das enzimas; fitase [79], uricase [91] e colesterol oxidase [92] foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) [93].

2.1.4 Substratos

Os filmes automontados camada por camada foram depositados sobre substratos apropriados para cada tipo de medida. Para medidas de espectroscopia no UV-visível e fluorescência foram utilizados substratos de quartzo, devido à absorção e emissão das enzimas que foram monitoradas por volta de 200-400 nm e 290-400 nm, respectivamente. Os substratos utilizados nas medidas de voltametria e amperometria foram de vidro recoberto com óxido de índio dopado com estanho (*indium tin oxide*, ITO) Delta Technologies e filme de azul da Prússia (*Prussian Blue*, PB) eletrodepositado sobre ITO, respectivamente. As medidas elétricas foram conduzidas com eletrodos de vidro interdigitados, com trilhas de ouro com espaçamento de 10 µm entre as trilhas, preparados e cedidos pelo prof. Dr. Antonio Riul Jr. Substratos de silício e fluoreto de cálcio (CaF₂) foram utilizados para medidas de espectroscopia no infravermelho no modo de transmitância. Os substratos de silício e quartzo foram previamente tratados com solução de hidrofilição, sendo que o substrato foi imerso

em uma solução básica contendo $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:5) por 10 minutos à temperatura de 70°C e então lavado com água Milli-Q. Em seguida adicionado na solução ácida $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:6) por mais 10 minutos a 70°C e novamente lavado com água ultrapura.

2.1.4.1 Azul da Prússia

O azul da Prússia, hexacianoferrato férrico, ou do inglês *Prussian Blue* (PB) foi usado como mediador para detecção eletroquímica de oxigênio (O_2) e peróxido de oxigênio (H_2O_2) [52]. A estrutura do PB determinada como célula unitária cúbica de $10,2 \text{ \AA}$ com canais de diâmetros de aproximadamente $3,2 \text{ \AA}$ que permitem a difusão de moléculas de baixa massa molecular. O filme de PB pode ser reduzido formando o branco da Prússia (*Prussian White*, PW), como mostrado na equação 1:

onde Fe^{III} e Fe^{II} são os estados de oxidação dos átomos de Ferro.

As formas reduzidas e oxidadas do PB têm atividade catalítica para a redução do O_2 e H_2O_2 e oxidação do H_2O_2 , respectivamente. A Figura 16 representa esquematicamente a detecção de H_2O_2 baseado em um biossensor, no qual a enzima catalisa o analito liberando o H_2O_2 , e então este é reduzido através da atividade catalítica do PB.

Figura 16: Representação esquemática de um biossensor com a enzima oxidase para a detecção de peróxido de hidrogênio com eletrodo modificado com azul da Prússia (PB). Figura adaptada de Ricci [52]

O filme de PB foi montado sobre ITO através de deposição eletroquímica, com um potencial de +0,40V aplicado durante 100 segundos em uma solução aquosa contendo 2×10^{-3} molL⁻¹ de K₃[Fe(CN)₆] e 2×10^{-3} molL⁻¹ de FeCl₃ em 0,1 molL⁻¹ KCl e 0,01 molL⁻¹ de HCl, respectivamente. Após a deposição, o eletrodo modificado foi lavado com água Milli-Q e então imerso em uma solução contendo 0,1 molL⁻¹ de KCl e 0,01 molL⁻¹ HCl, onde o potencial do eletrodo foi ciclado entre -0,01 e 1,0 V (vs. SCE) na velocidade de 0,05 V/s, até que a estabilidade do voltamograma fosse obtida.

2.2 Soluções

2.2.1 Tampão acetato de sódio

A solução tampão acetato de sódio/ácido acético foi preparada dissolvendo 0,82 mg de acetato de sódio em 100 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético, obtendo então uma solução tampão 100 mM de acetato de sódio com pH 5,5. Este tampão foi utilizado em todas as medidas e soluções dos sistemas contendo a enzima fitase.

2.2.2 Tampão Tris-HCl

O tampão Tris-HCl 10 mM foi preparado a partir da diluição de uma solução estoque de tris(hidroximetil)aminometano 100 mM. O pH foi ajustado para 7,5 com ácido clorídrico (HCl) concentrado. O tampão Tris-HCl foi utilizado em todas as soluções relacionadas com a enzima colesterol oxidase.

2.2.3 Tampão PBS

O tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) foi preparado com fosfato de sódio dibásico, Na_2HPO_4 , (6 mmol/L) e cloreto de sódio, NaCl, (150 mmol/L). O pH foi ajustado com uma solução de fosfato de potássio monobásico, KH_2PO_4 , (150 mmol) até atingir o pH de 7,4. O PBS foi utilizado em todas as soluções contendo os sistemas com a enzima uricase.

2.2.4 Polieletrólitos

Todas as soluções contendo polieletrólitos, utilizados na montagem dos filmes automontados, foram preparadas na concentração de 1 mg/mL diluído em solução tampão. O tampão foi escolhido de acordo com a enzima a ser utilizada na montagem do filme.

2.2.5 Enzimas

As enzimas fitase e colesterol oxidase foram dissolvidas e/ou diluídas na concentração de 0,2 mol/L em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5) e Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), respectivamente. A uricase inicialmente foi dissolvida em tampão borato de sódio 100 mM (pH 9) em uma concentração de 2,5 mg/mL e então diluída para 0,2 mg/mL em tampão PBS (pH 7,4).

2.2.6 Analitos

O ácido fítico foi dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,5) na concentração de 0,01 mol/L. Para a solubilização do ácido úrico foi necessário dissolver o ácido úrico em NaOH 1 mol/L na concentração de 0,01 mol/L e então diluir para 0,001 mol/L em tampão PBS. Devido ao caráter básico do NaOH, o pH foi novamente ajustado para 7,4 com HCl 1 mol/L. O colesterol foi dissolvido juntamente com o fosfolípido natural EggPG em metanol/clorofórmio (1:9) nas proporções EggPG (1 mM) e colesterol em diferentes concentrações (0, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M). A mistura foi evaporada com nitrogênio até formar um filme em torno do frasco, em seguida este filme foi hidratado com tampão Tris-HCl 10 mM por 2 horas. Esta solução foi sonicada por 10 ciclos de 30 segundos cada com intervalo de 1 minuto a cada ciclo.

2.3 Métodos

2.3.1 Preparação dos lipossomos

Os lipossomos ou vesículas unilamelares (*small unilamellar vesicles*, SUV) foram preparados dissolvendo-se 1 mM do DPPG metanol/clorofórmio (1:9). O solvente foi evaporado com nitrogênio até formar um filme ao redor do frasco, e posteriormente hidratado com água ultrapura por 2 horas, obtendo-se as vesículas multilamelares (MLVs). Para obter as SUVs esta solução foi sonicada com uma ponta de titânio e/ou extrudada em um miniextrusor da *Avanti Polar Lipids* com membrana de policarbonato com diâmetro definido de 100 nm (Figura 17). A distribuição de tamanho dos lipossomos foi analisada por espalhamento de luz e microscopia eletrônica de varredura.

Figura 17: Representação esquemática da preparação dos lipossomos. Figura adaptada da *Avanti Polar Lipids* [36].

2.3.1.1 Melanina incorporada em lipossomos

A melanina foi incorporada em lipossomos dissolvendo 1 mM do fosfolipídio DPPG em metanol/clorofórmio (1:9) e 0,16 mg/mL da melanina em metanol. As soluções foram misturadas e o solvente foi evaporado até formar um filme seco em volta do frasco, que foi hidratado com água Milli-Q por 2 horas. Esta solução passou então por um extrusor com membrana de policarbonato com poro de 100 nm. A incorporação e estabilização da melanina foram confirmadas utilizando espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared*) e espectroscopia eletrônica molecular, ou seja, UV-visível e fluorescência.

2.3.2 Preparação dos filmes camada-por-camada (LbL)

Os filmes automontados camada-por-camada (*Layer-by-Layer*, LbL) foram produzidos sobre um substrato previamente tratado com solução de ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$; 1:1:5 e $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$; 1:1:6). Após o tratamento do substrato, este foi imerso na solução de polication durante o tempo necessário para que uma camada adsorvesse completamente no substrato. O filme era então lavado com água Milli-Q ou solução tampão, para que se pudesse retirar o excesso de moléculas. Em seguida, o substrato foi imerso na solução contendo poliânion (DPPG ou enzimas), promovendo a adsorção do mesmo na camada previamente adsorvida pelo polication, e depois imerso na solução de lavagem. Este procedimento foi repetido até se obter o número de bicamadas desejadas (Figura 18).

Figura 18: Representação esquemática do processo de montagem de uma bicamada do filme camada-por-camada (LbL).

2.3.2.1 Filmes PAMAM/lipossomo e PEI/lipossomo-melanina

Os filmes automontados contendo lipossomos ou melanina (pura e incorporada em lipossomos) foram obtidos alternados com os polications PAMAM-G4 ou PEI, respectivamente. O tempo de imersão do PAMAM foi de 5 minutos e do PEI de 3 minutos. Após a adsorção do polication o filme foi lavado com água Milli-Q. Em seguida, o substrato foi imerso na solução contendo lipossomo ou melanina-lipossomo durante 10 minutos, e então lavado em água ultrapura. Nos sistemas PAMAM/lipossomo, PEI/melanina e PEI/lipossomo-melanina todas as soluções foram preparadas em água ultrapura e o filme foi produzido à temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$).

2.3.2.2 Filmes polieletrólito/enzima

Os filmes PAH/fitase, PAH/colesterol oxidase, PEI/uricase e PDAC/uricase foram automontados como descrito no item 2.3.2 com o tempo de adsorção das camadas de polieletrólitos de 3 minutos, sendo 10 minutos para as camadas de enzimas. Para a construção do filme PAH/fitase, as soluções, inclusive a de lavagem, foram preparadas com tampão acetato de sódio 0,1 M em pH 5,5. A deposição da fitase foi possível com temperatura controlada com banho a 40°C. Esta temperatura não afeta a atividade da enzima, uma vez que a atividade desta enzima tem máximo entre 37°C e 60°C a pH 5,5 [94]. A temperatura das soluções do polieletrólito e de lavagem foi a temperatura ambiente (22°C). As soluções para os filmes contendo colesterol oxidase foram preparadas com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) e a temperatura de deposição da enzima foi de aproximadamente 5°C. Durante todo o período de deposição a temperatura da enzima foi controlada e as demais soluções, polieletrólito e lavagem, estavam à temperatura ambiente (22°C). A deposição da uricase foi realizada a 22°C e as soluções PEI, PDAC e lavagem foram preparadas em tampão PBS pH 7,4. O crescimento dos filmes foi monitorado a cada camada depositada através de espectroscopia de fluorescência e UV-visível.

2.3.3 Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV-vis)

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e do visível depende da estrutura eletrônica das moléculas. A absorção de energia é quantizada através da passagem do elétron do estado fundamental para o estado excitado, envolvendo uma mudança de configuração eletrônica molecular nos orbitais de fronteira. A espectroscopia de absorção está baseada na medida de transmitância T ou absorbância A de moléculas contidas em recipientes transparentes, vidro ou quartzo, tendo um caminho óptico de b cm, onde a concentração c da

molécula absorvente está relacionada linearmente com a absorbância [95], como representado pela equação 2:

$$A = \varepsilon bc \quad (2)$$

onde ε é a absortividade molar. Esta equação é uma representação matemática da lei de Lambert Beer.

Os espectros de UV-vis foram utilizados para monitorar o crescimento dos filmes automontados através da absorbância em função do número de camadas depositadas, ou seja da quantidade de material depositado a cada camada. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis da marca Hitachi modelo U-2001 e os filmes foram fabricados sobre um substrato de quartzo.

2.3.4 Espectroscopia de Fluorescência Molecular

A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo estrutural de macromoléculas, como proteínas e polímeros. A técnica baseia-se na propriedade que algumas moléculas possuem de emitir luz devido às transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia. As proteínas em geral contêm cromóforos intrínsecos, os aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, denominados fluoróforos [96]. Mudanças conformacionais envolvendo estes cromóforos, em particular, induzem resultados distintos no espectro de emissão da fluorescência, no rendimento quântico ou no deslocamento do máximo de emissão. Além da mudança conformacional, outros aspectos influenciam no espectro de fluorescência, como concentração, solvente, temperatura e pH.

O espectro de emissão foi utilizado nesta tese para monitorar o crescimento dos filmes automontados contendo enzimas e melanina, através do aumento da intensidade fluorescente no máximo da banda correspondente em função da concentração. Também foram verificadas alterações no espectro, devido à mudanças estruturais e moleculares das enzimas e da

melanina decorrentes da desnaturação, oxidação e/ou agregação das mesmas quando depositada no filme. O equipamento utilizado nas medidas de fluorescência foi um espectrofluorímetro da marca Shimadzu, modelo RF-5301 PC.

2.3.4.1 Efeito da concentração na intensidade fluorescente.

A linearidade e/ou não-linearidade da intensidade fluorescente com a concentração pode ser explicada através das equações descritas a seguir:

$$F = K'(I_0 - I) \quad (3)$$

onde a intensidade de emissão fluorescente F é proporcional à intensidade do feixe de excitação que é absorvido pelo sistema, sendo I_0 e I a intensidade do feixe incidente e após atravessar uma distância b do meio, respectivamente. K' é a constante que depende da eficiência quântica do processo de fluorescência. Relacionando F com a concentração da espécie fluorescente, c , tem-se, aplicando a lei de Beer:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon bc} \quad (4)$$

onde ε é a absorvidade molar das moléculas fluorescentes e εbc é a absorbância A . Substituindo as equações 3 e 4 e expandindo o termo exponencial em série de Maclaurin, tem-se as equações 5 e 6, respectivamente:

$$F = K' I_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc}) \quad (5)$$

$$F = K' I_0 \left[2,303 \varepsilon bc - \frac{(2,303 \varepsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \varepsilon bc)^3}{3!} \dots \right] \quad (6)$$

Considerando que $2,303 \varepsilon bc = A < 0,05$, todos os termos em parênteses são pequenos em relação ao primeiro, sendo o erro relativo máximo causado por desprezar estes termos em

parênteses de 0,13%. Desprezando os termos entre parênteses considerando I_0 constante a equação pode ser descrita como:

$$F = Kc \quad (7)$$

Portanto, o espectro da emissão de fluorescência em função da concentração deveria ser linear para baixas concentrações. Quando a concentração se torna alta suficiente com a absorbância maior que 0,05, os termos entre parênteses na equação 6 tornam-se relevantes e a linearidade é perdida. Outros fatores responsáveis pelo desvio da linearidade da intensidade fluorescente com a concentração do cromóforo são a auto-supressão e a auto-absorção. A auto-supressão é resultado de colisões entre moléculas excitadas, com transferência de energia, e pode ser aumentada com o aumento da concentração devido à maior probabilidade da ocorrência de colisões. A auto-absorção ocorre quando o comprimento de onda de emissão se superpõe a um pico de absorção, em que a fluorescência diminui à medida que a emissão atravessa a solução e é reabsorvida por outras moléculas fluorescentes.

2.3.5 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é baseada no fato de que as ligações químicas possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula (chamados nesse caso de níveis vibracionais) [95]. O FTIR foi utilizado para monitorar o crescimento dos filmes contendo lipossomos, pois o DPPG não absorve no UV-visível, e para monitorar a estabilidade e/ou degradação da melanina pura e incorporada em lipossomos.

Os filmes automontados PAMAM/lipossomo-DPPG foram automontados como descrito no item 2.3.2, e os filmes com as moléculas separadas, PAMAM e DPPG, foram preparados por derramamento (filme *cast*). Estes filmes foram depositados sobre o substrato

de silício. Para analisar a melanina foram preparadas duas amostras: 1) uma pastilha de brometo de potássio (KBr) juntamente com a melanina em pó e 2) a melanina após a dissolução parcial em água espalhada (filme *cast*) sobre um substrato de fluoreto de cálcio (CaF_2). Amostras contendo lipossomo-DPPG e melanina em filme *cast* sobre CaF_2 foram preparadas para analisar a incorporação da melanina nos lipossomos. Todos os substratos foram tratados previamente com a solução de hidrofilição, sem o uso de temperatura, e o método utilizado foi o de transmitância.

2.3.6 Espalhamento de Luz

O espalhamento de luz ocorre quando uma radiação eletromagnética incide sobre um sistema, induzindo polarização da nuvem eletrônica das moléculas que oscila no tempo com a mesma frequência da radiação. As moléculas, por sua vez, irradiam a radiação incidente, que é a chamada radiação espalhada. As mudanças de frequência, a distribuição angular, a polarização e a intensidade da radiação espalhada dependem do tamanho, forma e das interações moleculares do material irradiado. A partir das características da radiação espalhada de um dado sistema, é possível obter informações sobre a estrutura e a dinâmica molecular do meio espalhador. Medidas de espalhamento de luz foram utilizadas para determinar o tamanho médio dos lipossomos em solução aquosa. As medidas foram realizadas em um *Brookhaven Instruments Corporation*.

2.3.7 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (*Scanning electron microscope*, SEM) é capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução da superfície de uma amostra. Devido à maneira com que as imagens são criadas, imagens de SEM têm aparência tridimensional característica. Imagens de SEM foram obtidas com filmes por derramamento (*cast films*) do lipossomo para determinar sua forma e diâmetro quando em superfícies sólidas.

2.3.8 Ressonância de plasmon da superfície (Surface Plasmon Resonance, SPR)

A técnica de ressonância de plasmon da superfície (SPR) baseia-se em propriedades ópticas e pode ser empregada para estudos de fenômenos de superfície monitorando, em tempo real, a mudança do índice de refração devido à interação de moléculas na superfície do metal, tipicamente ouro ou prata (Figura 19). O efeito de SPR é uma oscilação da densidade de carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal e outro um dielétrico [97]. Esta técnica permite monitorar processos de adsorção e/ou interação para uma variedade de superfícies por ligação e/ou acoplamento de camadas finas sobre o filme metálico. Estas camadas podem constituir-se de monocamadas com grupos funcionais, bicamadas lipídicas ou filmes poliméricos [97].

Figura 19: Representação esquemática de um instrumento típico de SPR. Uma lâmina de vidro recoberta com prata/ouro é colocada sob um prisma, através do qual o feixe de luz convergente é focado sobre o lado de baixo do filme de prata/ouro, a qual é refletida para um detector. Adaptada de Carvalho [97].

As medidas de SPR fornecem o índice de refração efetivo de cada camada depositada em função do tempo que foram utilizadas para monitorar o crescimento e a espessura, em tempo real, do filme automontado PAMAM/lipossomo-DPPG a cada camada depositada. A espessura da camada adsorvida, d , pode ser estimada através dos valores de índice de refração efetivo, (η_{eff}) usando a equação (8):

$$d = -\left(\frac{l_d}{2}\right) \ln\left(1 - \frac{n_{eff} - n_s}{n_a - n_s}\right) \quad (8)$$

onde l_d é o comprimento de decaimento característico, η_a e η_s são os índices de refração da camada adsorvida e da solução, respectivamente. Os índices de refração 1,45 e 1,339 foram usados para o PAMAM [98] e lipossomo [99], respectivamente. O l_d pode ser calculado a partir da equação (9):

$$l_d = \frac{\left(\frac{\lambda}{2\pi}\right)}{Re\left[-n_{eff}^4 / (n_{eff}^2 + \varepsilon_m)\right]^{1/2}} \quad (9)$$

onde λ é o comprimento de onda da irradiação incidente (840 nm), ε_m é a constante dielétrica do metal e Re é a parte real da equação.

O equipamento utilizado para medidas de SPR foi um SPR-EVM-*Spreeta Evaluation Module, Texas Instruments*, em que uma luz no infravermelho próximo ($\lambda=840$ nm, de um diodo emissor de luz) foi polarizada para aumentar a ressonância de plasmon de superfície.

2.3.9 Refletividade de nêutrons

A técnica envolve um feixe de nêutrons altamente colimado incidindo sobre uma superfície plana em ângulo rasante que permite medir a intensidade da radiação refletida em função do ângulo ou comprimento de onda de nêutrons. A forma exata do perfil de refletividade fornece informações detalhadas sobre a estrutura da superfície, incluindo

espessura, densidade e rugosidade dos filmes depositados sobre a superfície. A reflexão de nêutrons a partir de um filme fino dá origem a franjas de interferência, onde a separação das franjas está diretamente relacionada à espessura do filme e a sua amplitude aos índices de refração do meio.

A refletividade de nêutrons é uma técnica de reflexão especular, em que o ângulo de incidência do feixe é igual ao ângulo do feixe refletido. A reflexão é usualmente descrita em termos de um vetor de projeção, denotado q_z , que descreve a mudança no vetor de onda de um nêutron após ser refletido pelo material. A direção z é definida como a direção normal ao filme. Um modo simplificado para expressar este vetor de projeção perpendicular à interface, q_z , está descrito na equação 10:

$$q_z = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta) \quad (10)$$

sendo λ é o comprimento de onda do nêutron e θ o ângulo de incidência. Mais detalhes da técnica são fornecidos em Fragneto-Cusani [100].

Para a produção de nêutrons é necessário um reator nuclear em que o feixe de nêutrons é produzido por fissão nuclear. O comprimento de onda de nêutrons usado para a refletividade é tipicamente da ordem de 0,2 a 1 nm. As medidas de refletividade de nêutrons dos filmes automontados contendo lipossomo-DPPG e lipossomo-DPPG + melanina foram realizadas no *Hahn-Meitner-Institut* em Berlim, Alemanha. O equipamento utilizado foi V6 *Neutron Reflectometer* com o comprimento de onda de nêutrons incidente de 4,66 Å. As amostras foram preparadas sobre um substrato de silício de 80x50x15 mm³, obtido da Holm Siliciumbearbeitung, Alemanha, tratado com as soluções de hidrofiliação (NH₄OH:H₂O₂:H₂O; 1:1:5 e HCl:H₂O₂:H₂O; 1:1:6). Os filmes foram automontados com os polieletrólitos PEI, poli(estireno sulfonado) (PSS) e PAH nas concentrações de 1 mg/mL em solução aquosa contendo 1 M de NaCl. O tempo de adsorção foi de 30 minutos para a camada

de PEI e 20 minutos para cada camada de PSS e PAH. As arquiteturas dos filmes foram PEI/(PSS/PAH)₅ + lipossomo-DPPG e PEI/(PSS/PAH)₅ + lipossomo-DPPG+melanina. Todos os dados foram fitados aplicando o método de matriz óptica Parratt32 [101].

2.3.10 Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*) é uma das principais ferramentas no estudo de superfícies de materiais sólidos, com resolução que pode atingir escalas nanométricas. A técnica baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta com dimensões de alguns micra de comprimento (100 a 200 μm) e largura geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, acoplada em um cantiléver, que consiste de uma haste flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantiléver se aproxime ou se afaste, sendo essa deflexão proporcional à força de interação. Para percorrer a amostra de forma a se obter uma imagem é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (XYZ), com precisão de ângstrons ($\text{\AA}$) [104]. Durante a varredura um feixe de laser incide sobre o cantiléver refletindo em um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e intensidade de luz produzidas pelas deflexões do cantiléver, permitindo a obtenção da imagem. A técnica de AFM pode ser operada em três modos diferentes: contato, não-contato e contato intermitente (*tapping*), como ilustrado na Figura 20.

Figura 20: Representação esquemática dos modos de operação em AFM: (a) modo contato, (b) modo não-contato e (c) modo intermitente. Figura adaptada de [102]

Neste trabalho de tese, imagens de AFM foram utilizadas para o estudo da morfologia dos filmes automontados depositados sobre lâminas de vidro. Os dados foram adquiridos com um microscópio de força atômica SPM multimode – Nanoscope III, da *Digital Instruments* utilizando o modo contato de varredura para a obtenção das imagens.

2.3.11 Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab PGSTAT 30. A célula eletroquímica foi uma célula convencional de três eletrodos: referência, contra eletrodo e trabalho (Figura 21). O eletrodo de referência foi de calomelano saturado (*saturated calomel electrode*, SCE) $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$, uma lâmina de platina de $1,5 \text{ cm}^2$ foi usada como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo e o eletrodo de trabalho utilizado nas medidas foi o filme automontado depositado sobre o substrato de ITO.

Figura 21: Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos; referência, trabalho e contra eletrodo, acoplada a um potenciostato.

2.3.11.1 Medidas amperométricas

As medidas amperométricas foram realizadas a $0,0 \text{ V}$ (vs SCE), à temperatura ambiente (22°C), em uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos contendo 10 mL de solução tampão como eletrólito. O eletrodo de trabalho foi o filme automontado PAH/fitase ou PEI/uricase ou PDAC/uricase sobre ITO modificado com azul da Prússia (PB). O potencial foi fixado em $0,0 \text{ V}$ x SCE, e a cada estabilização da corrente foram adicionados

100 μL da solução de ácido fítico ou ácido úrico. As medidas amperométricas foram usadas para caracterizar a resposta do biossensor de fitase ou uricase para detecção de ácido fítico ou ácido úrico, respectivamente.

2.3.12 Medidas elétricas

Medidas de espectroscopia de impedância, com suas componentes real e imaginária versus a frequência, são geralmente analisadas através de um modelo de circuito elétrico equivalente descrito por Taylor e MacDonald [71]. Nas medidas, um eletrodo metálico é recoberto uniformemente com uma camada isolante ou semi-isolante do material de interesse. Quando o eletrodo está imerso em uma solução eletrolítica uma dupla camada elétrica se forma na superfície do material. Para interpretar a resposta do sistema eletrodo/eletrólito é necessário identificar e considerar os processos que podem contribuir para a impedância do sistema. A Figura 22A representa um circuito elétrico equivalente para descrever a resposta elétrica do sistema. C_g é a capacitância geométrica do espaço inter-eletrodo preenchido com o eletrólito, enquanto G_t permite a transferência de carga através da interface filme/eletrólito. A resposta a.c. (corrente alternada) da dupla camada iônica é representada pela capacitância da dupla camada C_d que é carregada através da condutância do eletrólito G_d . A condutância total da solução eletrolítica é $G_t + G_d$. A Figura 22B ilustra a dependência da frequência da capacitância total C e da perda dielétrica (G/ω) do circuito equivalente descrito na Figura 22A. A região de baixa frequência é dominada pelo efeito da dupla camada, enquanto que na região entre 10^2 e 10^4 Hz há a contribuição do material sobre o eletrodo. Em frequências acima de 10^5 Hz a impedância do sistema é dependente da capacitância geométrica.

Figura 22: Circuito equivalente para eletrodo metálico recoberto com filme pouco condutor (A). Gráfico teórico de C e G/ω do circuito equivalente. Figura adaptada de [71].

Medidas de impedância foram obtidas com um analisador de resposta em frequência e fase da marca Solartron, modelo 1260A, que permite a obtenção de espectros em uma faixa de frequência de 10 μ Hz a 32 MHz. Todas as medidas foram realizadas usando três eletrodos interdigitados: um eletrodo puro (sem filme), um eletrodo recoberto com um filme polimérico (PAH/PVS) e outro eletrodo recoberto com o filme automontado PAH/enzima. Os experimentos foram conduzidos após 20 minutos de contato do eletrodo com a solução analisada. Este tempo foi necessário para atingir a estabilidade do sistema. Os resultados de

capacitância e resistência versus frequência foram analisados através do método estatístico da análise da componente principal (*Principal component analysis*, PCA).

2.3.12.1 Análise da componente principal (*Principal component analysis*, PCA)

A análise de componentes principais é uma técnica estatística que pode ser utilizada para redução da dimensionalidade e fornecer uma visão estatística do conjunto de dados expressa em sua respectiva variância. Ou seja, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos em ordem decrescente de máxima variância. Geralmente 70% da variância total estão contidas nas duas primeiras componentes, portanto neste trabalho foram utilizadas apenas a primeira e segunda componente principal. Mais detalhes do método são encontrados em [103].

Capítulo 3

IMOBILIZAÇÃO DE LIPOSSOMOS E MELANINA EM FILMES AUTOMONTADOS

Neste trabalho foi explorada uma rota alternativa para adsorver e incorporar lipossomos de fosfolipídios de DPPG em multicamadas alternadas com polieletrólitos, PAMAM-G4 e PEI. A escolha do polieletrólito PAMAM-G4 foi motivada por sua estrutura esférica e por ser carregado positivamente [99], fatores que poderiam influenciar na montagem do filme e preservação da estrutura do lipossomo. O polieletrólito PEI também foi estudado devido ao seu caráter positivo em pHs próximo do fisiológico (neutro), por ser um polieletrólito de baixo custo e quando imobilizado apresenta estrutura globular [104]. O lipossomo constituído somente de fosfolipídio foi selecionado para que não houvesse dúvida a respeito da integridade do lipossomo puro em filmes automontados. Considerando que o filme automontado depende, principalmente, de materiais com cargas opostas para a construção camada por camada através de interações eletrostáticas, o fosfolipídio escolhido foi o DPPG que possui carga negativa.

3.1 Filmes automontados com Lipossomos

Uma análise inicial da distribuição de tamanho dos lipossomos de DPPG preparados pelo método de sonicação foi obtida por espalhamento de luz. A Figura 23 mostra a distribuição de tamanho dos lipossomos em solução aquosa. Assumindo sua forma esférica, o diâmetro varia de 20 a 400 nm, sendo que a média obtida foi de 120 nm. Esta distribuição de tamanho já era esperada uma vez que foi utilizado o método de sonicação.

Figura 23: Distribuição de tamanho dos lipossomos de DPPG em solução aquosa (A) e representação esquemática dos lipossomos esféricos em diferentes tamanhos (B).

O tamanho médio obtido por espalhamento de luz e a forma esférica dos lipossomos foram confirmados por medidas de microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*, SEM) com a imagem da Figura 24. Esta imagem foi obtida através do espalhamento da solução de lipossomos sobre um substrato de silício formando um filme por derramamento ou filme *cast*.

Figura 24: Distribuição de tamanho dos lipossomos de DPPG em solução aquosa (a). Imagem de microscopia eletrônica de varredura do filme *cast* de lipossomo de DPPG (b).

3.1.1 Filme automontado PAMAM/lipossomo

A imobilização dos lipossomos em filmes automontados alternados com PAMAM-G4 foi confirmado por FTIR, como mostrado na Figura 25. O gráfico contém os espectros dos compostos utilizados separadamente em filmes *cast*, PAMAM-G4 e lipossomo de DPPG e do filme automontado PAMAM/lipossomos-DPPG. O filme *cast* de PAMAM apresentou bandas de absorção em 1648 e 1554 cm^{-1} , correspondentes às bandas de amida I e II, respectivamente. Lipossomos de DPPG exibiram bandas principais em 2852 e 2915 cm^{-1} relativas aos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente, e 1737, 1470 e 1258 cm^{-1} atribuídas aos grupos carboxílicos, CH e PO_2 , respectivamente. O espectro do filme automontado PAMAM/DPPG é essencialmente uma superposição dos espectros do PAMAM e lipossomo de DPPG.

A viabilidade do filme automontado PAMAM/lipossomo-DPPG de interagir com biomoléculas foi testada com a proteína Albumina de soro bovina (BSA), sendo o filme

PAMAM/lipossomo-DPPG imerso numa solução contendo BSA 15 μM (1mg/mL) por 3 minutos e lavado com água pura. A presença da BSA no filme PAMAM/DPPG é denotada pelo aumento relativo na intensidade das bandas em 1660 e 1543 cm^{-1} correspondentes aos modos vibracionais dos grupos amida. Como descrito na literatura, em pH 6,7 as proteínas em geral estão carregadas negativamente [105]. No entanto, a superfície da BSA é composta por 82 resíduos de aminoácidos ácidos e 105 resíduos básicos resultando em uma carga de +23 [105]. Por estes dados pode-se sugerir que a interação entre a BSA e o filme automontado deve ser mediada por interações eletrostáticas entre cargas positivas da BSA e a superfície do filme automontado carregada negativamente pelos lipossomos.

Figura 25: Espectros de FTIR dos filmes *cast*, PAMAM (—) e DPPG (—), e filmes automontados PAMAM/DPPG 12 bicamadas, como depositado (—) e após a imersão em solução de BSA 15 μM por 3 minutos (—).

A espessura do filme e os estágios de deposição das camadas de PAMAM e lipossomos-DPPG foram investigados com medidas de ressonância de plasmon de superfície (SPR) *in situ*. A Figura 26 mostra a evolução do índice de refração efetivo (η_{eff}) [98] da adsorção (camada+solução) em função do tempo. O tempo necessário para saturação do η_{eff}

com uma camada de PAMAM é menos de 2 minutos e para camada de lipossomo-DPPG é de 10-15 minutos, como visto na Figura 26. Pontos de dessorção ocorrem durante a lavagem realizada a cada camada adsorvida, de maneira similar ao que tem sido relatado para outros sistemas [18], em que durante o processo de lavagem moléculas adsorvidas fracamente e/ou excesso de moléculas na superfície são desorvidas do filme. Embora ocorra o processo de dessorção o η_{eff} aumentou com o tempo a cada camada depositada.

Figura 26: Índice de refração vs. tempo de adsorção *in situ* das camadas de PAMAM e lipossomos de DPPG. As flechas indicam o início da adsorção de cada camada.

A espessura de cada camada adsorvida pode ser estimada a partir dos valores de η_{eff} usando a equação 8 descrita no Capítulo 2. O índice de refração de 1,45 e 1,339 foi usado para o PAMAM [98] e lipossomo [99], respectivamente, e o comprimento de onda incidente $\lambda = 840$ nm. A Tabela 1 representa os valores calculados das espessuras de cada camada depositada.

Tabela 1: Espessura de cada camada adsorvida de PAMAM ou lipossomo de DPPG.

	Espessura (nm)
1ª camada PAMAM	2,04
1ª camada lipossomo DPPG (sobre PAMAM)	178
2ª camada PAMAM (sobre PAMAM/DPPG)	2,16
2ª camada de lipossomo (sobre PAMAM/DPPG/PAMAM)	143

A primeira e segunda camada de PAMAM tiveram espessura de 2,04 nm e 2,16 nm, respectivamente, abaixo do diâmetro médio do PAMAM em solução (4 nm) estimado por modelos moleculares ou por cromatografia de dendrímeros [106]. Esta diferença pode ser explicada pelo achatamento das moléculas de PAMAM após a adsorção no filme [106, 107]. A espessura da primeira e segunda camada de lipossomos de DPPG, em tempo real, foi estimada como 178 e 143 nm, respectivamente. São valores mais altos do que o esperado para uma bicamada lipídica ($\sim 40\text{\AA}$), sendo que o diâmetro médio obtido do lipossomo em solução foi de 120 nm. Este dado indica que o lipossomo adsorve na camada de PAMAM previamente adsorvida sem perder sua integridade estrutural. É possível, também, que grandes concentrações de fosfolipídios carregados negativamente interpenetrem nas camadas de PAMAM carregadas positivamente, causando mudanças nas propriedades interfaciais e no índice de refração efetivo, como observado por SPR.

A Figura 27 representa esquematicamente os passos de adsorção de cada camada de PAMAM e lipossomo sobre um substrato sólido. A montagem dos lipossomos em filmes automontados com PAMAM favorece a formação de poros, devido à forma esférica de ambos os materiais, em que moléculas pequenas e íons podem ser incorporados e liberados dos lipossomos e então difundidas nas camadas de PAMAM. Este sistema pode ser promissor para utilização como carregador de agentes terapêuticos em forma de adesivos (*patches*).

Figura 27: Representação esquemática do processo de montagem do filme automontado: 1) primeira camada de PAMAM-G4 sobre o substrato, 2) bicamada PAMAM/lipossomo, 3) filme PAMAM/lipossomo/PAMAM e 4) 2 bicamadas de PAMAM/lipossomo.

Uma vez confirmada a integridade dos lipossomos imobilizados em filmes automontados alternados com PAMAM-G4 por SPR, os lipossomos contendo melanina foram imobilizados em filmes automontados alternados com o polieletrólito PEI, cuja escolha se deve a este polímero apresentar estrutura globular quando adsorvido em filmes finos.

3.2 .Filme automontado PEI/lipossomo-melanina

3.2.1 Incorporação da melanina em lipossomos

A melanina por ser um biopolímero pouco estável em soluções aquosas foi avaliada inicialmente por FTIR como recebida, em pó, e após dissolução em água na forma de filme *cast*. A Figura 28 representa os espectros de FTIR da melanina em pastilhas de KBr e sob a forma de filme depositado sobre um substrato de CaF_2 , tendo sido derramada a solução aquosa de melanina sobre o substrato na forma de filme *cast*. O espectro da melanina em pastilhas de KBr apresenta uma banda larga e intensa em 3440 cm^{-1} , característica do grupo OH e de água retida na amostra [48]. O espectro da melanina depositada sobre o CaF_2 é diferente, pois a banda em 3440 cm^{-1} devida ao grupo OH praticamente desaparece, e surgem

bandas em 2850 e 2970 cm^{-1} correspondentes aos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente. Isto indica rompimento do anel devido à degradação da melanina exposta à luz após sua solubilização, ou seja, nestas condições não temos a melanina em sua forma nativa.

Figura 28: Espectro de FTIR da melanina em pastilhas de KBr (—) e melanina após dissolução em filme *cast* depositado sobre CaF_2 (—).

Para manter a integridade da melanina em meio aquoso, uma alternativa foi incorporá-la em lipossomos de DPPG, onde a melanina deve interagir com as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios propiciando sua estabilidade. O processo de incorporação foi realizado como descrito no item 2.3. A Figura 29 mostra espectros de FTIR dos filmes *cast* lipossomo-DPPG e melanina incorporada em lipossomos-DPPG. A banda em 3440 cm^{-1} , referente ao grupo OH do glicerol do DPPG e de água retida nos lipossomos, é observada em ambas as amostras, porém com maior intensidade no filme lipossomo-DPPG/melanina, devido à contribuição do grupo OH da melanina não degradada. As bandas em 2850 e 2970 cm^{-1} referentes aos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente, correspondem às caudas de hidrocarboneto do fosfolipídio. Pode

também haver contribuição da melanina parcialmente degradada que está livre na solução, ou seja, que não foram incorporadas nos lipossomos.

Figura 29: Espectro de FTIR do Lipossomo-DPPG (—) e melanina incorporada em lipossomo-DPPG em filmes *cast* montados sobre CaF_2 .

Espectros de UV-visível e fluorescência da melanina foram obtidos para avaliar a solubilidade e emissão fluorescente da melanina em solução e incorporada em lipossomos de DPPG. A Figura 30 mostra os espectros de absorção no UV-visível da melanina livre e incorporada em lipossomos. O decaimento longo no espectro de absorção da melanina é atribuído a agregados com larga distribuição de tamanhos [41]. Para analisar os espectros de UV-visível da melanina, estes foram ajustados usando a equação 11:

$$Y = A + B \exp(-C\lambda) \quad 11$$

onde $A = -0.0937$, $B = 4.3643$ e $C = 0.005$, Y e λ sendo a absorbância e comprimento de onda, respectivamente [41].

Um ajuste ideal é obtido quando o coeficiente de determinação, R^2 , é igual a 1, o que indica não haver dispersão de *Rayleigh e Mie*, importante para a solubilidade da melanina. O espectro da melanina incorporada em lipossomos de DPPG foi o que mais se ajustou a essa exponencial, ou seja, os valores obtidos de R^2 para melanina pura foi de 0,36 e para a melanina incorporada em lipossomos de DPPG foi de 0,86. Portanto, ao ser incorporada em lipossomos a melanina teve sua solubilidade aumentada, diminuindo a ocorrência de agregados.

Figura 30: Espectro de UV-visível da melanina em água Milli-Q (—) e incorporada em lipossomos de DPPG (—) na concentração de 0,16 mg/mL. Ambas as amostras foram extrudadas por uma membrana de policarbonato com poro de 50 nm.

Espectros de fluorescência da melanina pura e em lipossomos-DPPG também foram obtidos. A Figura 31 ilustra os espectros de emissão da melanina com excitação em três comprimentos de onda, 316, 396 e 470 nm. A fluorescência de moléculas incorporadas em lipossomos em geral tem o máximo deslocado para o azul (*blue shift*), acompanhado de

supressão da intensidade (*quenching*) devido à interação da molécula com a bicamada de fosfolípido do lipossomo [96]. Para a melanina foi observado o efeito de supressão em dois comprimentos de onda de excitação, 316 e 396 nm. Por outro lado, para 470 nm a intensidade da emissão aumenta, o que indica que parte da melanina pode estar exposta, provavelmente na região hidrofílica do fosfolípido e/ou livre de agregação.

Figura 31: Espectro de emissão fluorescente (excitação em 316, 396 e 470 nm) da melanina em água Milli-Q (—) e incorporada em lipossomos de DPPG (—). Todas as soluções foram extrudadas por uma membrana de policarbonato com poro de 50 nm.

Para confirmar o estado de agregação da melanina com os dados obtidos por espectroscopia de UV-vis e fluorescência foram realizados experimentos de fluorescência resolvida no tempo, cujos resultados estão na Figura 32. O decaimento fluorescente foi obtido utilizando um comprimento de onda de emissão de 525 nm. A curva de decaimento pode ser representada por uma função multi-exponencial descrita na equação 12:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t/\tau_i)$$

12

onde α é o fator pré-exponencial e τ é o tempo de vida de cada espécie i do decaimento.

A componente rápida do decaimento fluorescente, supostamente associada aos agregados, tem menor coeficiente pré-exponencial na amostra contendo melanina incorporada em lipossomos do que em água pura (Tabela 2). Este resultado indica que a melanina está menos agregada na bicamada lipídica do que em água pura, confirmando os dados de espectroscopia de UV-visível e fluorescência.

Figura 32: Decaimento fluorescente da solução contendo melanina (—) e DPPG-melanina (—).

Tabela 2: Tempo de vida (τ) e fator pré-exponencial normalizado (α), para três exponenciais, da melanina pura e em lipossomo.

	τ (ns)			α		
	1	2	3	1	2	3
Melanina	0,02	0,41	3,08	0,77	0,12	0,13
DPPG+Melanina	0,05	0,47	2,98	0,54	0,21	0,25

A finalidade destes experimentos, além de melhorar a estabilidade e solubilidade da melanina em solução aquosa em condições fisiológicas, seria imobilizar a melanina em substratos sólidos sem que ocorra perda das suas propriedades fluorescentes. Portanto, a melanina pura e em lipossomos-DPPG foi imobilizada em filmes automontados alternado com o polieletrólito PEI.

3.2.2 Caracterização dos filmes automontados contendo melanina

O crescimento dos filmes PEI/melanina e PEI/lipossomo-melanina foi monitorado com espectroscopia de UV-vísível como mostrado nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Os filmes de melanina pura não apresentaram crescimento linear, e com o aumento no número de bicamadas foi observada nova banda a 400 nm no espectro de absorção, que pode ser atribuída à melanina degradada tendo em conta os resultados obtidos por Kayatz et al [108]. Os filmes de PEI com melanina incorporada em lipossomos apresentaram um aumento linear na absorção com o número de bicamadas (Figura 34).

Figura 33: Espectros de UV-vísível de n-bicamadas do filme PEI/melanina.

Figura 34: Espectros de UV-visível de n-bicamadas do filme PEI/lipossomo-melanina.

O máximo de absorção (396 nm) da melanina pura e em lipossomos em função do número de bicamadas estão representados nas Figuras 35 e 36, respectivamente. Para o filme PEI/melanina após a 2ª bicamada não foi observado aumento no máximo de absorção. Este resultado pode ser atribuído à degradação da melanina e, conseqüentemente, perda de absorção no UV-visível. A curva representada na Figura 36 para o filme PEI/lipossomo-melanina mostra crescimento linear até a 4ª bicamada, entre a 5ª e a 7ª bicamada apresenta um patamar e retorna a crescer linearmente a partir da 8ª bicamada. Este efeito pode ser atribuído ao rearranjo dos lipossomos ou a um possível rompimento dos mesmos. O máximo de absorção em 396 nm foi escolhido arbitrariamente, uma vez que o comportamento da curva é o mesmo em outros comprimentos de onda.

Figura 35: Aumento do máximo de absorção em 396 nm do filme PEI/melanina em função do número de bicamadas depositadas.

Figura 36: Aumento do máximo de absorção em 396 nm do filme PEI/DPPG-melanina em função do número de bicamadas depositadas.

A Figura 37 ilustra as fotografias dos filmes automontados (LbL) sobre quartzo com 10 bicamadas de (a) PEI/lipossomo-melanina e (b) PEI/melanina. O filme contendo melanina incorporada em lipossomos apresentou uma cor mais escura (marrom escuro) do que o filme com melanina sem a proteção dos lipossomos (cor mais clara). Esta coloração observada para a melanina é referente à oxidada [47].

Figura 37: Imagem dos filmes automontados 10 bicamadas (a) PEI/DPPG-melanina e (b) PEI/melanina.

O tempo de deposição de cada camada de lipossomo-melanina no filme automontado alternado com PEI foi monitorado em 396 nm e então traçada uma curva de cinética de crescimento, ilustrada na Figura 38, com gráfico em escala logarítmica para enfatizar a curva. A adsorção do lipossomo contendo melanina pode ser composta por dois processos, um componente rápida, representado por uma cinética de primeira ordem e o segundo pode ser explicado com uma função de Johnson-Mehl-Avrami com n igual a 1 [109]. A curva pode ser ajustada com a equação 13:

$$A = k_1(1 - \exp(-t/\tau_1)) + k_2(1 - \exp(-t/\tau_2))^n \quad 13$$

sendo A a absorbância, k_1 , k_2 a intensidade de cada processo de adsorção, τ_1 e τ_2 os tempos característicos de cada processo e n uma constante.

O primeiro processo, cinética de primeira ordem, apresentou um tempo característico de 2 segundos e o segundo processo, ajustado pela equação 13, mostrou um tempo característico de 240 segundos, processo mais lento. Uma possível explicação para estes dois processos seria a nucleação e crescimento dos domínios no filme, onde o primeiro processo deve corresponder à nucleação enquanto o segundo ao crescimento de domínios [110]. A partir de 600 segundos a curva tende à saturação, o que indica o tempo necessário para adsorção completa de uma camada de lipossomo-melanina.

Figura 38: Máximo de absorção em 396 nm da camada de lipossomo-DPPG/melanina sobre uma camada de PEI em função do tempo de imersão. Tempo zero corresponde a monocamada de PEI.

As características estruturais do filme automontado contendo melanina incorporada em lipossomos foram observadas usando medidas de refletividade de nêutrons em uma interface sólido/D₂O. A Figura 39 mostra as curvas de refletividade de nêutrons para a camada adsorvida de lipossomo-melanina sobre um molde padrão contendo um filme automontado PEI/(PSS/PAH)₅ montado sobre um substrato de silício. Os parâmetros deste molde são conhecidos [111]. As curvas foram ajustadas com o programa *Parratt32 Reflectivity Tool* fornecido pelo Hahn-Meitner Institut. A espessura e rugosidade da camada lipossomo-melanina calculadas pelo ajuste da curva foram de 36 Å e 58 Å, respectivamente (Tabela 3). Note que o alto valor de rugosidade é porque se aplica a todo o filme, e não só à última camada contendo os lipossomos. Esta espessura é consistente com o valor estimado para a bicamada lipídica (~40 Å), apontando o rompimento do lipossomo contendo melanina incorporada e em filme automontado.

Figura 39: Curvas de Refletividade de Nêutrons como obtida do molde padrão PEI(PSS/PAH)₅ (●) e PEI(PSS/PAH)₅ + camada de lipossomo-melanina (●).

Tabela 3: Espessura e rugosidade do filme calculados a partir do melhor ajuste das curvas de refletividade de nêutrons.

	Espessura (Å)	Rugosidade (Å)
PEI/(PSS/PAH) ₅	360.45	36.876
PEI/(PSS/PAH) ₅ +lipossomo-melanina	396.72	58.064

Ambos os filmes PEI/melanina e PEI/lipossomo-melanina foram caracterizados por fluorescência. O filme PEI/melanina não apresentou emissão nos comprimentos de onda de excitação analisados com a melanina em solução (316, 396 e 470 nm). Estes dados confirmam os resultados obtidos por UV-vísivel que apontam a degradação da melanina quando imobilizada em filmes automontados, se não protegida em lipossomos.

As Figuras 40 e 41 apresentam, respectivamente, o espectro de fluorescência com excitação a 396 nm e o de decaimento fluorescente pulsado a 520 nm do filme PEI/lipossomo-melanina. O máximo de emissão obtido para o filme (500 nm) difere em apenas 2 nm do máximo de emissão do lipossomo-melanina em solução, um efeito esperado devido ao empacotamento das moléculas no filme automontado. O decaimento da componente rápida tem tempo de vida de 0.01 ns e fator pré-exponencial de 0,90, que está associado aos agregados devido ao empacotamento de moléculas no filme automontado. Apesar destes efeitos do empacotamento e possível agregação das moléculas, a melanina mantém suas propriedades fluorescentes, sendo um sistema com potencial para estudos futuros, especialmente em aplicações médicas. A estabilidade do filme foi verificada após 20 dias da montagem do filme, com o filme estocado seco e sem temperatura controlada, observou-se a mesma intensidade fluorescente original.

Figura 40: Espectro de emissão fluorescente da melanina em solução e em filme automontado PEI/lipossomo-melanina 10 bicamadas.

Figura 41: Decaimento fluorescente do filme PEI/lipossomo-melanina.

Como mostrado neste trabalho, a melanina incorporada em lipossomos de DPPG apresentou maior solubilidade e estabilidade do que a melanina em solução aquosa. Este método mostrou-se eficiente, pois conserva a integridade físico-química do biopolímero proporcionando um ambiente mais próximo do fisiológico e viabilizando aplicações em sistemas biológicos. Filmes nanoestruturados contendo lipossomos-melanina imobilizados com PEI apresentaram aumento na absorbância e fluorescência em função do número de bicamadas sem afetar as propriedades físicas da melanina. Este comportamento não é visto para os filmes PEI/melanina, onde ocorre degradação da melanina, sugerindo que o lipossomo (bicamada lipídica), mesmo em filmes automontados, protege a estrutura da melanina.

Capítulo 4

URICASE E FITASE EM BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

A versatilidade da técnica de automontagem na imobilização de proteínas em filmes ultrafinos possibilita a imobilização de várias moléculas biológicas em conjunto com polieletrólitos convencionais, com preservação da atividade biológica. O processo de imobilização ocorre em condições ótimas de pH e força iônica das soluções, minimizando a desnaturação de proteínas. Além disso, a montagem do filme automontado é facilitada pelo fato de que biomoléculas são solúveis em água e possuem excesso de cargas na superfície. Neste Capítulo serão apresentados estudos sobre a fabricação de filmes automontados contendo as enzimas uricase e fitase para obter biossensores amperométricos e detectar ácido úrico e ácido fítico, respectivamente.

4.1 Filmes automontados com Uricase

A enzima uricase catalisa a oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio, que age como oxidante, produzindo alantoína e CO₂ como produto de oxidação do ácido úrico, e H₂O₂ como produto de redução do O₂. A equação da reação enzimática está descrita na equação 14:

A Figura 42 apresenta a estrutura idealizada do filme automontado contendo a enzima uricase alternado com os polieletrólitos PEI ou PDAC imobilizados sobre ITO, previamente modificado com PB (A). O mecanismo de detecção do ácido úrico com geração de H₂O₂ está

representado na Figura 42B. A montagem do filme automontado e o mecanismo de redução do PB para o PW estão descritos no item 2.1 e 2.3, respectivamente.

Figura 42: Representação esquemática do filme automontado PEI ou PDAC/uricase sobre ITO modificado com PB (A). Mecanismo envolvido na detecção de ácido úrico com geração de H_2O_2 (B).

4.1.1 Crescimento dos filmes PEI/uricase e PDAC/uricase

O crescimento do filme PEI/Urlicase e PDAC/Urlicase foi monitorado com absorção do UV-visível e espectroscopia de fluorescência. Inicialmente foram feitas medidas de absorção e emissão da uricase livre em solução (Figura 43). O espectro da uricase mostra uma banda de absorção em torno de 280 nm e um máximo de emissão por volta de 320 nm, valores condizentes com a absorção e emissão dos resíduos de aminoácidos fenilalanina e triptofano.

Figura 43: Espectros de absorção (—) e emissão (—) da uricase livre em tampão PBS.

As Figuras 44A e 45A indicam espectros de absorbância para os filmes automontados PEI/uricase e PDAC/uricase, respectivamente. Para ambos, mesmo os filmes contendo 20 bicamadas, não foi observada a banda característica da uricase em 280 nm. Este comportamento pode ser atribuído à proporção enzima/polieletrólito e à pequena quantidade de enzima depositada no filme, impossibilitando a visualização da banda.

As Figuras 44B e 45B mostram gráficos de absorbância a 280 nm versus número de bicamadas. Embora não tenha sido possível observar a banda de absorção em 280 nm, referente à absorção da enzima, este comprimento de onda foi escolhido por representar a melhor curva do máximo de absorção com o número de bicamadas depositadas. Note que o

espalhamento do espectro está sendo considerado uma vez que além da enzima, moléculas que não absorvem no UV-visível também estão adsorvidas no filme. O aumento linear da absorbância indica a mesma quantidade de material adsorvido a cada deposição. Para os filmes contendo PEI o coeficiente de correlação, R , foi mais próximo de 1 (0,98) quando comparado com os filmes contendo PDAC (0,95). Esta diferença do coeficiente de correlação já é um indício de que o filme PEI/uricase cresce mais uniformemente que o filme de PDAC. Os dados obtidos por UV-visível não permitem afirmar que a enzima foi adsorvida, e para confirmar a presença da uricase foram realizadas medidas de espectroscopia de fluorescência.

Figura 44: Espectro de absorção do filme automontado PEI/uricase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.

Figura 45: Espectro de absorção do filme automontado PDAC/uricase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.

A imobilização da uricase a cada camada depositada foi confirmada por espectroscopia de fluorescência. Os espectros de fluorescência dos filmes PEI ou PDAC/uricase (Figuras 46A e 47B) apresentaram uma nova banda em torno de 360 nm, que pode ser atribuída à desnaturação e/ou agregação da enzima imobilizada em suporte sólido. O crescimento linear do filme foi observado com máximo de emissão em 320 nm, referente aos resíduos de aminoácidos triptofano e fenilalanina da uricase, em função do número de bicamadas de PEI/UOx e PDAC/Uox, como ilustrado nas Figuras 46B e 47B, respectivamente. O coeficiente de correlação, R, dos filmes contendo PEI foi de 0,98 e PDAC de 0,96.

Figura 46: Espectros de fluorescência (A) e aumento do máximo de emissão em 320 nm (B) do filme PEI/uricase em função do número de bicamadas depositadas.

Figura 47: Espectros de fluorescência (A) e aumento do máximo de emissão em 320 nm (B) do filme PDAC/uricase em função do número de bicamadas depositadas.

Ambos os filmes PEI/uricase e PDAC/uricase cresceram linearmente com o número de bicamadas, como mostrado por UV-visível e fluorescência. Porém, o filme PEI/uricase apresentou uma maior linearidade com os melhores valores de coeficiente de correlação em ambas os métodos. Esta diferença de material adsorvido a cada camada pode ser associada com as distintas estruturas dos polieletrólitos, PEI e PDAC, em filmes automontados. Este dado indica que o filme PEI/uricase apresenta melhor empacotamento que o filme de PDAC/uricase.

4.1.2 Medidas amperométricas

Os filmes automontados PEI/uricase e PDAC/uricase foram fabricados sobre substratos de ITO modificado com azul da Prússia (PB) e então analisados como biossensor por amperometria. A resposta amperométrica para o eletrodo (biossensor) com 10 bicamadas (isto é ITO/PB/(PDAC/UOx)₁₀), mergulhado em 10 mL de PBS como eletrólito suporte, e operando a 0,0 V (vs. SCE), é mostrada na Figura 48A. A biofuncionalidade da uricase e a viabilidade do método como biossensor são demonstradas pelo aumento na corrente de redução em função de sucessivas adições de ácido úrico, em que cada adição corresponde a um aumento de 0,001 mmol/L na concentração e uma redução na corrente de aproximadamente 1 μAcm^{-2} . O biossensor ITO/PB/(PEI/UOx)₁₀ apresentou uma resposta similar, porém menor, com uma redução de aproximadamente 0,5 μAcm^{-2} (Figura 48B). O limite de detecção, calculado a partir da relação sinal/ruído considerando três vezes o ruído, foi de 0,02 $\mu\text{mol/L}$ e 0,04 $\mu\text{mol/L}$ e o tempo de resposta estimado para cada adição de ácido úrico foi de 2 e 6 segundos para o biossensor contendo PDAC/uricase e PEI/uricase, respectivamente.

Figura 48: Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de PBS, pH 7.4, com o biossensor ITO/PB/(PDAC/UOx)₁₀ (A) e ITO/PB/(PEI/UOx)₁₀ (B). Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 μL de ácido úrico 0,001 mol/L.

A Figura 49 apresenta a diferença entre os dois biossensores na resposta amperométrica. O biossensor contendo (PDAC/uricase)₁₀ é mais sensível à presença do ácido úrico do que o biossensor (PEI/uricase)₁₀. Esta diferença pode ser associada ao empacotamento das moléculas que pode dificultar a difusão do H₂O₂ sobre o eletrodo e/ou uma possível mudança na conformação da enzima afetada pelo polieletrólito [12].

Figura 49: Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de ácido úrico dos biossensores ITO/PB(PACD/UOx)₁₀ (●) e ITO/PB(PEI/UOx)₁₀ (●).

A Figura 50A mostra as curvas analíticas para os biossensores ITO/PB/(PEI/UOx)_n, com n variando de 4 a 14. A sensibilidade decresce com o número de bicamadas, devido ao aumento da espessura do filme. Este aumento da espessura pode dificultar a difusão do H₂O₂ gerado com a adição do ácido úrico ao sistema. Um efeito oposto foi observado para os biossensores ITO/PB/(PDAC/UOx)_n, onde a sensibilidade do biossensor aumenta com o aumento do número de bicamadas (Figura 50B).

Figura 50: Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de ácido úrico dos biossensores ITO/PB(PEI/UOx)_n (A) e ITO/PB(PDAC/UOx)_n (B) com $n = 4$ (●), 8 (●), 10 (●) e 14 (●) bicamadas.

Como proposto inicialmente, o filme contendo PEI apresentou-se mais empacotado do que o filme contendo PDAC. Este empacotamento possivelmente dificultou a difusão de moléculas de H_2O_2 quando o ácido úrico foi injetado. Por outro lado, o aumento do número de bicamadas aumenta a quantidade de enzima depositada, aumentando a produção de H_2O_2 , e conseqüentemente a sensibilidade. Uma vez que o filme PDAC/uricase não apresentou bom empacotamento, ou seja, não há barreiras que impeçam a difusão das moléculas de H_2O_2 no filme até atingir o eletrodo de ITO com PB, este eletrodo se torna mais sensível com o aumento do número de bicamadas.

Uma explicação para esta diferença de empacotamento pode estar na conformação adotada por ambos polieletrólitos em solução e em filmes. Para o PEI é esperada uma estrutura globular, similar ao PAH, enquanto o PDAC deve adotar estrutura em hélice como em colágenos [104]. A Figura 51 representa a estrutura idealizada para os filmes de PDAC/uricase (51A) e PEI/uricase (51B). Devido à estrutura do PDAC, o filme PDAC/uricase pode apresentar “canais” mostrados na figura que permitem maior difusão da espécie eletroativa gerando maior sensibilidade do eletrodo, como observado por amperometria. Para o filme PEI/uricase, por outro lado, o empacotamento mais compacto já comentado acima gera uma estrutura como a indicada na Figura 51B, em que a difusão da espécie eletroativa é dificultada, conseqüentemente diminuindo a sensibilidade do sensor.

Figura 51: Estrutura idealizada para os filmes (PDAC/urucase)₂ (A) e (PEI/urucase)₂ (B).

A estabilidade dos biossensores foi investigada durante 30 dias. Os sensores foram estocados em solução tampão (PBS) a 10°C, quando não estava em uso. Para o sistema ITO/PB/(PEI/UOx)_n a resposta não alterou por um período de 10 dias após a construção do biossensor. Após o 11º dia, a corrente diminuiu gradativamente até atingir 30-40% do valor original no 30º dia. Para o biossensor ITO/PB/(PDAC/UOx)_n a corrente diminuiu gradativamente após o primeiro dia até o 30º dia, obtendo 70% do valor original. O decréscimo na atividade pode ser explicado, além de uma possível desnaturação da enzima imobilizada, pelo fosfato do tampão PBS, solução em que o sensor foi estocado. Ocorre que o fosfato difunde através do filme afetando a estrutura do PB, e como a detecção é feita através da ação do ferrocianato como mediador, ocorre decréscimo da eletrocatalise do H₂O₂ a 0 V. A diferença de estabilidade entre os eletrodos pode ser associada ao empacotamento do filme, uma vez que o eletrodo contendo PDAC/uricase está mais suscetível aos fosfatos da solução, devido à facilidade de difusão destas moléculas no filme.

Os efeitos de interferentes representam algumas das maiores dificuldades para a obtenção de biossensores amperométricos para detectar ácido úrico, como mencionado anteriormente. O uso de PB permite detecção de H₂O₂ a 0,0V vs. SCE, que diminui o problema de interferentes. A Figura 52 mostra medidas amperométricas com sucessivas injeções de tampão PBS, ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico, todas na mesma concentração (10⁻² M) e mesmo volume de injeção (100 µL). Os interferentes analisados não apresentaram mudanças na corrente, exceto para o ácido ascórbico que aumenta a corrente, enquanto que na injeção de ácido úrico ocorre um decréscimo da corrente. Portanto estes sinais podem ser distinguidos.

Figura 52: Efeito da adição de PBS, ácido acetilsalicílico e ácido ascórbico.

Estes resultados podem ser comparados com os obtidos por Hoshi e colaboradores [63], que produziram biossensores para ácido úrico com uricase imobilizada sobre eletrodo de Pt e um filme automontado PAA/PVS para seleccionar o H_2O_2 , mas a detecção era feita a +0,6V, potencial susceptível a muitos interferentes. Portanto, os biossensores mostrados aqui são promissores, pois a detecção foi obtida a 0,0 V vs eletrodo de referência (com ITO modificado com PB). De qualquer forma, ambos os biossensores são mais simples que outros da literatura, em que a detecção de H_2O_2 é feita através de outras enzimas ou mediadores [15-17, 63]. Os métodos automontados para produção de biossensores têm se mostrado eficientes não somente porque a enzima tem atividade preservada por longos períodos, mas também porque é necessária uma pequena quantidade de enzimas em comparação com outros métodos [76, 77].

4.2 Filmes automontados com Fitase

Filmes automontados contendo a enzima fitase foram produzidos para detectar ácido fítico. A Figura 53 mostra a estrutura idealizada do filme automontado contendo fitase imobilizada sobre ITO, previamente modificado com PB (A). O mecanismo de detecção do ácido fítico com geração de PO_4^{-3} também está apresentado (B).

Figura 53: Estrutura idealizada do filme automontado PAH/fitase imobilizada sobre ITO modificado com PB (A). Mecanismo de detecção do ácido fítico com eletrodo modificado com PB (B).

4.2.1 Crescimento do filme PAH/fitase

O crescimento do filme PAH/fitase foi monitorado por espectroscopia de fluorescência e UV-visível. Os espectros de UV-visível apresentam um aumento na absorbância em função do número de bicamadas (Figura 54A). Como a banda de absorção em 280 nm, referente à fitase, apareceu com pouca intensidade o espalhamento também foi considerado com o aumento do número de bicamadas. Este espalhamento aparece devido à presença do polieletrólito PAH adsorvido juntamente com a enzima, tornando o filme cada vez mais opaco. O crescimento do máximo de absorção em 280 nm com o número de bicamadas está mostrado na Figura 54B. O aumento linear, $R = 0,998$, indica que a mesma quantidade de material está sendo adsorvida a cada camada depositada. Este comportamento linear é observado em todas as regiões de comprimento de onda do espectro.

Figura 54: Espectro de absorção do filme automontado PAH/fitase (A) e aumento de absorbância em 280 nm (B) com o número de bicamadas depositadas.

O crescimento do filme automontado PAH/fitase foi confirmado por espectroscopia de fluorescência. Devido à presença de resíduos de aminoácidos, como a fenilalanina e o triptofano na enzima, foi possível obter o espectro de emissão. O filme PAH/fitase foi excitado em 280 nm e emitiu em 330 nm. O máximo de emissão fluorescente aumentou com o número de camadas, como mostrado na Figura 55A. O processo de crescimento apresentou deposição exponencial da enzima sobre o substrato (Figura 55B). Este tipo de crescimento pode ser atribuído a diferentes fatores, como a influência na mudança conformacional da enzima, possível desnaturação, facilitando a emissão de cromóforos e/ou como descrito no item 2.3, com o aumento da concentração perde-se a linearidade da intensidade fluorescente e/ou então pela auto-absorção. Portanto, com os dados de fluorescência pode-se concluir que a fitase está presente no filme e através de UV-visível a mesma quantidade de material está sendo adsorvido a cada camada depositada apresentando crescimento linear.

Figura 55: Espectro de UV-visível (a) e fluorescência (b) do filme PAH/fitase. *Inset:* máximo de absorção (a) e emissão (b) vs. Número de bicamadas depositadas.

4.2.2 Medidas de voltametria cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas com o filme PAH/fitase com 10 bicamadas sobre o substrato de ITO como eletrodo de trabalho para a detecção do ácido fítico. Os voltamogramas foram obtidos em tampão acetato de sódio 0,1 M em pH 5,5 no intervalo de potenciais de -0,5 a 0,5 V. Na Figura 56A estão apresentados os voltamogramas do filme em solução tampão e com diferentes concentrações de ácido fítico. O voltamograma do filme PAH/fitase contendo ácido fítico apresentou uma eletroatividades bem definida, com um pico de redução em torno de -0,2 V, proveniente da reação enzimática que hidrolisa o grupo fosfato do ácido fítico liberando fosfatos inorgânicos. A Figura 56B ilustra o aumento linear da corrente anódica com a concentração de ácido fítico.

Figura 56: Voltametria cíclica do filme PAH/fitase 10 bicamadas para a detecção do ácido fítico (A). Curva de corrente a -0,2 V versus concentração de ácido fítico (B).

A detecção do ácido fítico por voltametria cíclica, utilizando um substrato de ITO convencional, não apresentou alta sensibilidade, sendo possível detectar concentrações acima de 10^{-3} mol/L. Para melhorar o sistema de detecção a filme PAH/fitase foi depositado sobre eletrodo de ITO modificado com azul da Prússia e então analisado com medidas amperométricas operando a 0.0 V.

4.2.3 Medidas amperométricas

As medidas amperométricas foram conduzidas com baixo potencial quando comparado com o potencial de redução do ácido fítico obtido com o eletrodo ITO/(PAH/fitase)₁₀. Este método foi utilizado para diminuir os efeitos de interferentes que podem estar presentes em amostras reais de ácido fítico. A Figura 57 ilustra a resposta amperométrica para o filme PAH/fitase com 10 bicamadas operando a 0,0 V (versus eletrodo saturado de calomelano (SCE)) em tampão acetato de sódio em pH 5,5. Para um melhor funcionamento do biossensor, o filme automontado foi crescido sobre ITO modificado com PB depositado eletroquimicamente [52]. A necessidade da modificação do ITO com o PB se deve ao fato de melhorar a resposta do sensor, bem como aumentar a sensibilidade. Na literatura há vários trabalhos que utilizam o PB para detecção principalmente de H₂O₂ [52, 70]. Embora a fitase não gere peróxido de hidrogênio como produto da catálise do ácido fítico e sim íons fosfatos, a viabilidade do eletrodo ITO/PB para a detecção desses íons foi testada. A funcionalidade do biossensor foi verificada pela variação de corrente de redução quando sucessivas alíquotas de ácido fítico foram adicionadas. Cada adição corresponde a um aumento de 5×10^{-4} mmol/L na concentração de ácido. O limite de detecção, relação sinal/ruído considerando três vezes o ruído, foi de 0,05 mmol/L e o tempo de resposta do biossensor foi de aproximadamente 1 s, que é bastante baixo devido à espessura ultrafina do filme.

Figura 57: Resposta amperométrica do filme PAH/fitase obtida a 0,0 V (versus SCE) em tampão acetato a pH 5,5. Cada estágio de corrente corresponde a um aumento de 0,5 mmol/L de ácido fóico. As setas indicam as adições consecutivas de ácido fóico.

A Figura 58 mostra as curvas analíticas da resposta do filme PAH/fitase com diferentes números de bicamadas (4, 8, 10 e 14 bicamadas). A sensibilidade aumenta com o número de bicamadas, uma vez que aumenta a quantidade de enzima imobilizada sobre o eletrodo. A resposta do biossensor mostrou uma linearidade de 0,5 a 2 mmol/L de ácido fóico, que corresponde de 0,46-1,8 mg/mL, respectivamente. De um modo geral observou se que acima de 2 mmol/L há saturação da resposta do sensor.

Figura 58: Curvas analíticas obtidas para os filmes automontados com 4 (●), 8 (●), 10 (●) e 14 (●) bicamadas.

Efeitos de interferentes foram analisados como indicado na Figura 59. O procedimento das medidas foi o mesmo, 0,0V vs SCE, as injeções dos interferentes foram feitas na mesma concentração ($0,5 \times 10^{-2}$ mol/L) e mesmo volume 100 μL em 10 mL de tampão acetato de sódio pH 5,5. Nenhuma mudança na corrente foi observada quando possíveis interferentes, como tampão, inositol, DPPC e fenil fosfato foram adicionados, como indicado na Figura 59. A resposta foi obtida apenas quando adicionado ácido fítico e fosfato livre. A interferência do fosfato foi relatada em experimentos de amperometria com eletrodo de ITO modificado com azul da Prússia [104], onde ocorreu inibição da corrente com a presença de fosfato, analogamente ao observado na Figura 59. Portanto, a sensibilidade ao ácido fítico e a interferência de fosfato no biossensor amperométrico PAH/fitase podem ser associadas à adsorção do fosfato na superfície do PB [104]. Considerando a geração de fosfato através da

hidrólise do ácido fítico catalisada pela fitase, em altas concentrações de fosfato ocorre saturação na superfície do PB, resultando em um bloqueio do sinal eletroquímico [104]. Este efeito pode explicar os dados observados na Figura 58, onde ocorre a saturação da resposta após sucessivas injeções de ácido fítico.

Figura 59: Efeito da adição de íons fosfatos, tampão, inositol, DPPC e fenil fosfato.

A estabilidade do biossensor também foi estudada e o sensor mostrou-se bioativo por 15 dias consecutivos, quando armazenados em tampão acetato de sódio pH 5,5 e temperatura de 4 °C. A Figura 60 apresenta a estabilidade da sensibilidade do filme de 10 bicamadas de PAH/fitase. A resposta linear obtida anteriormente de 0,5 a 2 mmol/L, manteve-se a mesma com o período de 15 dias. A estabilidade deste sensor foi significativamente mais alta que a do biossensor de ácido úrico descrito por Mak e colaboradores [15].

Figura 60: Estabilidade do sensor PAH/fitase 10 bicamadas estocado em tampão acetato de sódio a 4°C.

Filmes nanoestruturados contendo fitase imobilizada sobre eletrodos modificados com PB mostraram-se adequados para detectar ácido fítico. As condições brandas de deposição, quais sejam o uso de soluções aquosas e com pH controlável, favorecem a bioatividade da enzima por um longo período. A utilização do filme PAH/fitase como biossensor na detecção de ácido fítico apresentou alta sensibilidade e seletividade, como demonstrado pela ausência de efeitos de interferentes. O bom desempenho deste biossensor pode ser atribuído também ao empacotamento do filme PAH/fitase, como representado na Figura 51. Como o PAH apresenta estrutura globular, o empacotamento deste filme deverá ser similar àquele do eletrodo PEI/uricase.

Estes resultados podem ser comparados aos resultados obtidos por Mak e colaboradores [15] que produziram biossensores para ácido fítico em que a fitase foi co-imobilizada com a enzima piruvato oxidase. O limite de detecção foi de 0,002 mmol/L, com linearidade entre 0,2 e 2 mmol/L de ácido fítico com o sensor operando em 0,6V. O biossensor apresentado aqui foi menos sensível, embora mais vantajoso por operar em 0,0V,

que foi possível devido a modificação de eletrodo com azul da Prússia. O sensor operando em baixo potencial diminui a ocorrência de oxidação de outras espécies eletroativas, evitando efeitos de interferentes. Mesmo com o limite de detecção mais alto, as concentrações de ácido fítico nas sementes de grãos, legumes e nozes usualmente são de 0,4 a >1% [82], tornando possível medir o ácido fítico em amostras reais [15]. Além disso, o método automontado oferece vantagem adicional, com a eficiência na imobilização da enzima devida às condições brandas de montagem e menor quantidade de enzimas necessária, em comparação ao método de ligação cruzada (*cross-linking*) [76].

Capítulo 5

FITASE E COLESTEROL OXIDASE EM BIOSSENSORES BASEADOS EM ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA

Combinar a versatilidade da técnica de automontagem camada por camada (LbL) com moléculas de interesse biológico é fundamental no desenvolvimento de novas biotecnologias, em particular, biossensores, como mostrado no Capítulo anterior. Neste Capítulo serão apresentados protótipos de dispositivos obtidos com a imobilização das enzimas fitase e colesterol oxidase em filmes automontados alternados com a cloreto de poli(alilamônio) (PAH). A detecção do ácido fítico e colesterol foi conduzida com a técnica de espectroscopia de impedância elétrica.

5.1 Filme automontado PAH/fitase e sua aplicação como biossensor

5.1.1 Crescimento e mecanismo de adsorção do filme PAH/fitase

O processo de adsorção do filme automontado contendo fitase sobre substrato de quartzo previamente modificado com duas bicamadas de PAH/PVS, procedimento realizado para minimizar efeitos do substrato [112], foi analisado por UV-visível. A cinética de adsorção da fitase sobre o filme (PAH/PVS)₂/PAH está representada na Figura 61, sendo que a adsorção da fitase foi monitorada em 280 nm versus tempo. A cinética pode ser modelada com a equação de Johnson-Mehl-Avrami (JMA), descrita na equação 15:

$$A = k \left[1 - \exp \left(- \left(\frac{t}{\tau} \right)^n \right) \right] \quad 15$$

onde A é a absorbância, k e n são constantes e τ o tempo característico de adsorção.

Este modelo de Avrami permite descrever a adsorção e o crescimento do filme [109], utilizando os parâmetros descritos na Tabela 3. O valor de $n \approx 1,2$ corresponde à adsorção em uma dimensão (1D), ou seja, não há formação de novos núcleos durante a adsorção. O platô atingido na adsorção, com $\tau = 3$ segundos, está relacionado à saturação de sítios disponíveis para a adsorção da fitase em solução, ou seja, impede adsorção de moléculas com a mesma carga. Portanto, o tempo para adsorção de uma camada da fitase foi 3 segundos, bem menor do que para proteínas (5-10 minutos) [18].

Figura 61: Absorbância em 280 nm versus tempo de adsorção da camada de fitase. A linha sólida representa o ajuste com a equação de JMA.

Tabela 4: Parâmetros n , τ e k obtidos da equação JMA para o ajuste dos dados de cinética da camada de fitase no filme automontado.

k	τ (s)	n
$0.052 \pm 0,002$	3 ± 1	$1.2 \pm 0,1$

5.1.2 Caracterização morfológica

A Figura 62A ilustra a micrografia de AFM ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) do filme automontado PAH/fitase 10 bicamadas, a partir da qual se pode obter informações morfológicas para analisar o mecanismo de crescimento [110]. O perfil da altura na Figura 62B permite verificar a direção do crescimento do filme. A Figura 63 mostra que a média do diâmetro dos agregados aumenta linearmente com a média da altura, indicando não haver direção preferencial para o crescimento dos agregados. Estes crescem em forma de colunas, consistente com $n=1,2$ obtido do ajuste da cinética de adsorção (Tabela 3).

Figura 62: Imagem de AFM do filme automontado PAH/fitase 10 bicamadas adsorvido sobre um substrato de quartzo com um janela de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ (A). Perfil da altura do filme (B).

Figura 63: Média do diâmetro versus a média da altura dos domínios para o filme automontado PAH/fitase 10 bicamadas.

5.1.3 Medidas elétricas

Medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas com três unidades sensoriais distintas, obtidas com eletrodos interdigitados: puro (sem filme), recoberto com filme automontado (PAH/PVS) sete bicamadas e recoberto com o filme automontado PAH/PVS duas bicamadas e PAH/fitase cinco bicamadas. As Figuras 64, 65 e 66 mostram curvas de capacitância e perda (*Loss*) versus frequência dos eletrodos puro, contendo (PAH/PVS)₇ e (PAH/PVS)₂(PAH/fitase)₅, respectivamente, para as amostras de água e diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ M) dissolvido em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5. Todas as curvas foram traçadas na mesma escala para melhor visualização dos dados. Os valores de perda foram calculados a partir da resistência (R) e frequência (f) utilizando a equação 16:

$$Loss = \frac{1}{R * 2\pi * f} \quad (16)$$

Para o eletrodo puro a capacitância e a perda (*Loss*), Figuras 64A e 64B respectivamente, não variaram em função da concentração de ácido fítico, visto na mesma escala obtida para os eletrodos contendo filme automontado. Para eletrodos contendo filme automontado (Figuras 65 e 66), foram observadas algumas características importantes. O processo de relaxação na curva de perda em função da frequência apareceu nitidamente, como mostrado na Figura 66B para unidade sensorial contendo fitase, enquanto que para unidade sensorial contendo somente PAH/PVS este processo de relaxação não foi tão demarcado (Figura 65B). Porém, a resposta da unidade sensorial contendo PAH/fitase variou menos com a concentração de ácido fítico do que a unidade contendo PAH/PVS. Em frequências mais altas observou-se fraca dependência com a concentração de ácido fítico. O mesmo foi observado para medidas de capacitância (Figuras 65A e 66A).

Figura 64: Curvas de capacitância (A) e perda (*Loss*) (B) versus a frequência do eletrodo puro em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).

Figura 65: Curvas de capacitância (A) e perda (*Loss*) (B) versus frequência para eletrodo contendo o filme automontado PAH/PVS em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).

Figura 66: Curvas de capacitância (A) e perda (*Loss*) (B) versus frequência para o eletrodo contendo o filme automontado PAH/fitase em diferentes concentrações de ácido fítico (0, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} mol/L).

Em baixas frequências, 1-100 Hz, há influência da dupla camada elétrica [71], uma vez que esta faixa de frequência está relacionada com a condutividade do filme depositado sobre o eletrodo. Em frequências intermediárias, 1-100 kHz, a curva está relacionada à interface filme-meio e em frequências acima de 100 kHz os dados estão relacionados com a condutividade do meio [71]. Portanto, a unidade sensorial contendo somente PAH/PVS responde, com maior intensidade, à presença do ácido fítico através de mudanças na condutividade e/ou espessura do filme e provavelmente na dupla camada, enquanto a unidade sensorial PAH/fitase responde à variação das duas camadas, filme e meio, em função da concentração.

Em termos de habilidade de distinção entre as amostras de ácido fítico, o melhor desempenho foi obtido com o sensor PAH/PVS em baixas frequências (1-100 Hz). Isto foi contra-intuitivo, uma vez que se deveria esperar maior sensibilidade do sensor contendo a enzima fitase por sua capacidade de reconhecimento molecular. Ocorre que a resposta elétrica depende não somente das interações entre o filme e o líquido, mas também da condutividade do sistema como um todo. Se o filme depositado tornar a unidade sensorial menos condutora, é provável que a capacidade de distinção diminua. Parece ser isto o que acontece com o sensor contendo a fitase, pois o deslocamento da relaxação para baixas frequências indica que a unidade é menos condutora.

De qualquer forma, embora as mudanças na resposta não sejam tão grandes como para a unidade com o filme de PAH/PVS, há maior consistência na tendência de alteração com a concentração de ácido fítico, como ilustrado na Figura 67 para a resposta a 1 kHz. A perda da unidade sensorial sem filme não apresentou variação significativa na presença de diferentes concentrações de ácido fítico, diferentemente da unidade sensorial contendo PAH/PVS, onde a perda variou com a concentração, porém de maneira não sistemática. Para o sensor contendo fitase os valores de perda foram mais altos e apresentaram dependência com a concentração

do ácido fítico. Isto mostra que cada unidade sensorial responde diferentemente em contato com as soluções. Esta diferença no sinal elétrico entre as unidades sensoriais pode ser usada como impressão digital para identificar diferentes soluções.

Figura 67: Perda (*Loss*) em 1 kHz das três unidades sensoriais: eletrodo interdigitado puro, contendo o filme automontado (PAH/PVS)₇ e (PAH/PVS)₂(PAH/fitase)₅, como indicado na figura, para diferentes concentrações de ácido fítico.

Para melhorar o desempenho das unidades sensoriais, os valores de perda dielétrica de cada sensor foram tratados com análise de componentes principais (PCA). Os PCAs apresentados nas Figuras 68 e 69 mostram os valores de perda em 1 kHz, região de frequência associada com a interface filme-meio. O PCA foi gerado com as seguintes combinações: sistemas com dois eletrodos puro+(PAH/PVS)₇ e puro (PAH/PVS)₂ (PAH/fitase)₅. O PCA do sistema eletrodo puro+PAH/PVS apresentou aleatoriedade e não distinguiu os pontos em relação à concentração de ácido fítico. O PCA do sistema contendo os eletrodos puro e PAH/fitase apresentou melhor desempenho, os pontos foram distintos entre as diferentes concentrações, exceto para a concentração mais baixa 10⁻⁵ M de ácido fítico, que afinal corrobora a expectativa de seletividade do sensor a base de interações específicas (enzima-analito) com uma sensibilidade de 10⁻⁴ M, similar ao observado por amperometria.

Figura 68: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS)₇. Os valores das perdas em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de ácido fítico: 0 (○), 10⁻⁶ (×), 10⁻⁵ (+), 10⁻⁴ (*), 10⁻³ (□) e 10⁻² (◇) M.

Figura 69: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e $(\text{PAH/PVS})_2 + (\text{PAH/fitase})_5$. Os valores das perdas em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de ácido fítico: 0 (○), 10^{-6} (×), 10^{-5} (+), 10^{-4} (*), 10^{-3} (□) e 10^{-2} (◇) M.

5.2 Filme automontado PAH/colesterol oxidase (COX) e sua aplicação como biossensor

A colesterol oxidase (COX) foi imobilizada em filmes camada por camada, LbL, alternado com o polieletrólito PAH e avaliada em biossensor elétrico na detecção de colesterol. A Figura 70A representa o processo de adsorção das camadas de polieletrólitos (PAH e PVS) e COX. A estrutura idealizada do filme automontado PAH/COX imobilizado sobre um eletrodo interdigitado previamente modificado com um “colchão”, duas bicamadas do filme automontado PAH/PVS, está representada na Figura 70B. O mecanismo proposto da detecção do colesterol através da reação enzimática da COX com o colesterol incorporado em lipossomos está representado na Figura 70C.

Figura 70: Representação esquemática do processo de adsorção da COX em filmes automontados alternados com PAH sobre um substrato previamente modificado com filme automontado PAH/PVS (A) e arquitetura do filme (B). Representação idealizada do mecanismo de detecção do colesterol através da reação enzimática da COX com colesterol incorporado em lipossomos (C).

5.2.1 Crescimento e mecanismo de adsorção do filme PAH/COX

Para caracterizar a adsorção do filme automontado contendo COX, a montagem do filme foi conduzida sobre substrato de quartzo, apropriado para medidas ópticas. Como mencionado, o substrato foi inicialmente recoberto com duas bicamadas do filme automontado PAH/PVS para minimizar os efeitos do substrato [112]. A cinética de adsorção da COX sobre o filme (PAH/PVS)₂PAH está representada na Figura 71, com a absorbância monitorada em 280 nm ao longo do tempo de imersão. A saturação próxima de 200 segundos indica o tempo suficiente para adsorção de uma camada completa da COX. A adsorção da COX é composta por dois processos, com o primeiro, rápido, representado por uma cinética de primeira ordem e o segundo modelado com a equação de Johnson-Mehl-Avrami (JMA). Por isso, os dados foram ajustados com a equação 13 descrita no item 3.2 para a cinética de adsorção da melanina em lipossomos. O ajuste dos dados está mostrado pela linha sólida e os parâmetros obtidos estão representados na Tabela 4. O platô atingido na absorção pode estar relacionado à saturação de sítios disponíveis para adsorção de moléculas de COX em solução, ou seja, as moléculas com a mesma carga não mais adsorvem. Este processo pode ser explicado com a função JMA com $n \sim 2$ e tempo característico de 180 segundos (Tabela 4). O valor de $n \approx 2$ corresponde à adsorção em duas dimensões (2D), sem a formação de novos núcleos durante o processo de adsorção. Em outras palavras, a adsorção ocorre em sítios com o crescimento de núcleos já formados no início do processo. Este efeito é de fato consistente com a análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM).

Figura 71: Absorbância em 280 nm versus tempo de adsorção da camada de COX. A linha sólida representa o ajuste com a equação de JMA.

Tabela 5: Parâmetros n , τ e K obtidos da equação JMA para o ajuste dos dados da cinética de adsorção de uma camada da COX no filme automontado.

K_1	τ_1 (seg)	K_2	τ_2 (seg)	n
$0,041 \pm 0,002$	$0,8 \pm 0,02$	$0,014 \pm 0,003$	157 ± 7	$1,8 \pm 0,01$

A Figura 72A ilustra a micrografia de AFM ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) do filme automontado PAH/COX 10 bicamadas, sendo que o perfil de altura na Figura 72B corrobora os resultados para a cinética de adsorção através da direção do crescimento do filme. A Figura 73 mostra que a média do diâmetro dos agregados aumenta linearmente com a média da altura, indicando direção não preferencial para o crescimento dos agregados. No entanto, a média do diâmetro aumenta muito mais rápido que a média da altura, sendo possível afirmar que os agregados crescem como “discos”, consistente com $n=2$ obtido na cinética de adsorção.

Figura 72: Imagem de AFM do filme automontado PAH/COX 10 bicamadas adsorvido sobre um substrato de quartzo com um janela de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ (A). Perfil da altura do filme (B).

Figura 73: Media do diâmetro dos domínios versus média da altura para o filme automontado PAH/COX 10 bicamadas.

5.2.2 Detecção de colesterol com medidas elétricas

Medidas de espectroscopia de impedância foram usadas para detectar colesterol em lipossomos de eggPG e em gema natural de ovo utilizando um sistema de três eletrodos: eletrodo puro, contendo filmes automontados PAH/PVS e PAH/COX depositados sobre eletrodos interdigitados. Os dados coletados para os três eletrodos foi em 1 kHz, frequência mais sensível a mudanças das propriedades da interface filme-meio [71], como mostrado no item 3.3. Os valores de capacitância obtidos nesta frequência foram tratados com análise de componentes principais (PCA).

Os PCAs das Figuras 74 e 75 mostram valores de capacitância (1 kHz) em solução aquosa com diferentes concentrações de colesterol incorporado em lipossomos de eggPG (0, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M). Foram traçados com as seguintes combinações: eletrodo puro+PAH/PVS (Figura 74) e eletrodo puro+PAH/COX (Figura 75). No PCA considerando os resultados adquiridos somente com o eletrodo puro e PAH/PVS, isto é, sem o filme contendo a colesterol oxidase, não existe clara distinção entre as diferentes concentrações do colesterol e os pontos são aleatórios, ou seja, não evolui na componente principal com relação à concentração. Possivelmente, isto ocorre devido à falta de interações específicas entre o colesterol e a enzima colesterol oxidase. Na Figura 75 existe alta correlação entre a segunda componente principal (PC2) e a concentração de colesterol, que pode ser atribuída à presença de interações específicas entre COX e colesterol. Isso aumenta a “ortogonalidade química” do dado, como relatado em análises da língua eletrônica para bebidas [72].

Figura 74: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS)₇. Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol incorporado em lipossomos: 0 (○), 10⁻⁶ (×), 10⁻⁵ (+), 10⁻⁴ (*) e 10⁻³ (□) M.

Figura 75: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e (PAH/PVS)₂(PAH/PVS)₅. Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol incorporado em lipossomos: 0 (○), 10⁻⁶ (×), 10⁻⁵ (+), 10⁻⁴ (*) e 10⁻³ (□) M.

O colesterol da gema do ovo de galinha, amostra real, foi analisado nas concentrações 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} M, calculado a partir das informações nutricionais fornecidas pelo produtor, com os eletrodos puro+PAH/COX. O PCA ilustrado na Figuras 76 apresentou boa correlação entre o PC1 e a concentração de colesterol na gema do ovo, direcionado à esquerda para as amostras mais diluídas. Os dados obtidos a partir das Figuras 75 e 76 mostraram resultados similares, corroborando a viabilidade do uso de materiais com interações específicas para aumentar a “ortogonalidade química” do sensor.

Figura 76: Análise da componente principal (PCA) usando dois eletrodos: puro e $(\text{PAH/PVS})_2 + (\text{PAH/COX})_5$. Com os valores de capacitância em 1 kHz para água Milli-Q (●) e diferentes concentrações de colesterol presente na gema natural de ovo: 10^{-5} (○), 10^{-4} (×) e 10^{-3} (+) M.

Capítulo 6

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A montagem de filmes nanoestruturados camada por camada (LbL), com materiais de interesse biológico, mostrou-se apropriada nas diferentes aplicações propostas neste trabalho. Além da possibilidade de combinar num filme automontado múltiplos políons e diferentes biomoléculas sobre um substrato sólido, a integridade estrutural e funcional das biomoléculas imobilizadas foi mantida. Para manter a atividade dessas biomoléculas, cada sistema foi montado de maneira adequada à biomolécula, escolhendo-se condições de fabricação como tampão, pH, temperatura e polieletrólito, bem como para sua aplicação.

A integridade da estrutura esférica dos lipossomos de DPPG imobilizados em filmes automontados alternados com o PAMAM-G4 foi comprovada por ressonância de plasma de superfície, SPR, em que a espessura obtida para o lipossomo imobilizado foi compatível com o diâmetro dos lipossomos em solução. O filme PAMAM/lipossomo interagiu com pequenas quantidades da proteína BSA, o que pode ser detectado empregando-se espectroscopia FTIR. Este sistema, PAMAM/lipossomo, futuramente pode ser empregado como carreador de agentes terapêuticos incorporados em lipossomos, sendo conseqüentemente candidato ao uso de terapias como liberação controlada de fármacos através de adesivos.

Uma demonstração da possibilidade de empregar filmes automontados de lipossomos para agentes terapêuticos foi obtida aqui com a melanina. De fato, quando incorporada em lipossomos de DPPG, a melanina mostrou maior solubilidade e estabilidade do que livre em solução aquosa. Os lipossomos foram excelentes para encapsular e proteger a melanina, assim como propiciar um ambiente favorável e em condições fisiológicas, ou seja, sem uso de

solventes orgânicos ou pH elevado. Após a incorporação da melanina em lipossomos, esta foi imobilizada em filmes automontados alternado com o polieletrólito PEI. A integridade estrutural dos lipossomos contendo melanina foi afetada, como visto por refletividade de nêutrons, porém a melanina teve sua propriedade fluorescente preservada. A presença da bicamada lipídica na melanina foi essencial para preservação de suas funções, pois quando imobilizada sem os fosfolipídios foi degradada e perdeu sua atividade biológica. Este trabalho abre caminho para novas aplicações da melanina em substratos sólidos, tanto como agente terapêutico como em dispositivos eletrônicos.

Com intuito de desenvolver protótipos de biossensores, três enzimas com diferentes características foram estudadas em filmes automontados, sendo que dois métodos de detecção foram avaliados. A enzima uricase foi automontada alternada com os polieletrólitos PEI e PDAC, e neste caso foram investigadas a detecção amperométrica do ácido úrico e preservação da atividade enzimática com o tempo de acordo com arquitetura molecular do filme. O filme foi depositado sobre um eletrodo modificado com azul da Prússia, que permitiu o seu uso em sensores de ácido úrico com detecção de peróxido de hidrogênio a 0,0 V versus SCE. A atividade biocatalítica dependeu da estrutura do polieletrólito, sendo o eletrodo contendo PDAC o que apresentou maior sensibilidade, além de ser mais estável com o tempo. Porém, a sensibilidade de ambos biossensores foi suficiente para possível aplicação em testes clínicos na detecção de ácido úrico, com efeito desprezível de interferentes.

A adequação da temperatura e pH para a imobilização da enzima fitase teve um papel fundamental na montagem do filme, bem como para manter a atividade da enzima e estabilidade por períodos mais longos. A detecção de ácido fítico foi conduzida com amperometria e impedância elétrica. Em ambos os casos o biossensor mostrou sensibilidade para o ácido fítico e ausência do efeito de interferentes, como mostrado por amperometria usando um eletrodo previamente modificado com PB. O limite de detecção obtido em ambos

os casos permite o uso destes eletrodos para a detecção do ácido fítico em sementes e grãos e em uma variedade de vegetais.

Filmes automontados com colesterol oxidase (COX) puderam ser produzidos, em que camadas de COX foram alternadas com PAH, preservando a atividade da enzima. O filme foi adsorvido sobre eletrodos de ouro, e então usados como unidades sensoriais, com medidas impedância AC como método de detecção. Este biossensor demonstrou a viabilidade de detectar colesterol incorporado em lipossomos e para aplicações em amostras reais. Com a alta sensibilidade para detecção de colesterol em soluções aquosas, o sistema formado por filmes automontados com COX imobilizada é viável para diagnósticos clínicos. A sensibilidade e seletividade foram atribuídas à natureza do filme ultrafino e ao reconhecimento molecular da enzima com o analito.

Apesar de os resultados da tese demonstrarem a viabilidade do desenvolvimento de protótipos de biossensores, o seu emprego requer investigações mais aprofundadas. Por exemplo, é necessário investigar o efeito da alteração da arquitetura molecular dos filmes automontados, inclusive buscando otimização da sensibilidade e seletividade. É necessário também fazer análises numa faixa maior de possíveis interferentes em amostras reais, dentre outros parâmetros. Há que se lembrar que embora as biomoléculas imobilizadas em filmes automontados preservem sua bioatividade, que é uma grande vantagem da técnica, suas funções não devem ser tão eficientes em sistemas vivos ou amostras reais.

Em conclusão, o trabalho nesta tese mostrou a possibilidade de novos dispositivos para diagnósticos clínicos, análises de alimentos, e desenvolvimento de agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARIGA, K.; NAKANISHI, T.; MICHINOBU, T. Immobilization of biomaterials to nano-assembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, n. 8, p. 2278-301, 2006.
- [2] RUSLING, J. F.; HVAISTKOV, E. G; HULL, D. O; SCHENKMAN, J.B. Biochemical applications of ultrathin films of enzymes, polyions and DNA. **Chem. Commun.**, v. 14, n. 2, p. 141-54, 2008.
- [3] OLIVEIRA JR., O. N. Langmuir-Blodgett films: properties and possible applications. **Braz. J. Phys.**, v. 22, p. 60-69, 1992.
- [4] ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett films**. New York: Plenum Press, 1990.
- [5] NETZER, L.; SAGIV, J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 105, p. 674-676, 1983.
- [6] NETZER, L.; ISCOVICI, R.; SAGIV, J. Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers—Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. **Thin Solid Films**, v. 99, p. 235-241, 1983.
- [7] DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- [8] SALDITT, T., SCHUBERT, U.S. Layer-by-layer self-assembly of supramolecular and biomolecular films. **J. Biotechnol.**, v. 90, n. 1, p. 55-70, 2002.
- [9] LANGMUIR, I.; SCHAEFER, V. J. Monolayers and multilayers of chlorophyll. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 59, n. 10, p. 2075–2076, 1937.
- [10] BLODGETT, K. B. Films built by depositing successive monomolecular layers on a solid surface. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 57, n. 6, p. 1007–1022, 1935.
- [11] SAGIV, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 102, n. 1, p. 92–98, 1980.
- [12] TANG, Z.; WANG, Y.; PODSIADLO, P.; KOTOV, N. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Adv. Mater.**, v. 18, n. 24, p. 3203–3224, 2006.
- [13] DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210/211, p. 831-835, 1992.

- [14] LVOV, Y.; DECHER, G.; MÖHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). **Langmuir**, v. 9, p. 481-486, 1993.
- [15] MAK, W. C.; NG, Y. M.; CHAN, C.; KWONG, W. K.; RENNEBERG, R. Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, p. 1029-1035, 2004.
- [16] BASU, A. K. ; CHATTOPADHYAY, P.; ROYCHOUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 375-379, 2007.
- [17] BONGIOVANNI, C.; FERRI, T.; POSCIA, A.; VARALLI, M.; SANTUCCI, R.; DESIDERI, A. An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. **Bioelectrochemistry**, v. 54, n. 1, p. 17-22, 2001.
- [18] ZUCOLOTTO V.; PINTO, A. P.; TUMOLO, T.; MORAES, M. L.; BAPTISTA, M. S.; RIUL JR, A.; ARAÚJO, A. P.; OLIVEIRA JR, O. N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. **Biosens Bioelectron.**, v. 21, n. 7, 1320-1326, 2006.
- [19] POLYELECTROLYTE Multilayers. Department of Chemistry. Disponível em <<http://www.chem.fsu.edu/multilayers/>>. Acesso em: 24 jul. 2008.
- [20] ISI WEB OF KNOWLEDGE. Disponível em: <<http://apps.isiknowledge.com>>. Acesso em: 24 jul. 2008.
- [21] SUKHORUKOV, G. B., MONTREL, M. M.; PETROV, A. I.; SHABARCHINA, L. I.; SUKHORUKOV, B. I. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. **Biosens. Bioelectron.**, v. 11, n. 9, p. 913-922, 1996.
- [22] MONTREL, M. M.; SUKHORUKOV, G. B.; PETROV, A. I.; SHABARCHINA, L. I.; SUKHORUKOV, B. I. Spectroscopic study of thin multilayer films of the complexes of nucleic acids with cationic amphiphiles and polycations: their possible use as sensor elements. **Sens. Actuators B Chem.**, v. 42, n. 3, p. 225-231, 1997.
- [23] JEWELL, C. M.; LYNN, D. M. Multilayered polyelectrolyte assemblies as platforms for the delivery of DNA and other nucleic acid-based therapeutics. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 60, n. 9, p. 979-999, 2008.
- [24] ONDA, M.; ARIGA, K.; KUNITAKE, T. Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 87, n. 1, p. 69-75, 1999.
- [25] MICHEL, M.; VAUTIER, D.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; BALL, V. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles. **Langmuir**, v. 20, n. 12, p. 4835-4839, 2004.

- [26] MICHEL, M.; IZQUIERDO, A.; DECHER, G.; VOEGEL, J.-C.; SCHAAF, P.; BALL, V. Layer by layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded phospholipid vesicles obtained by spraying: Integrity of the vesicles. **Langmuir**, v. 21, n. 17, p. 7854-7859, 2005.
- [27] MICHEL, M.; ARNTZ, Y.; FLEITH, G.; TOQUANT, J.; HAIKEL, Y.; VOEGEL, J. C.; SCHAAF, P.; BALL, V. Layer-by-layer self-assembled polyelectrolyte multilayers with embedded liposomes: immobilized submicronic reactors for mineralization. **Langmuir**, v. 22, n. 5, p. 2358-2364, 2006.
- [28] GERALDO, Vananélia Pereira Nunes. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para liberação controlada de ibuprofeno**. 2008. 102f. (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [29] HULBERT, A. J.; ELSE, P.L. Membranes as possible pacemakers of metabolism. **J. theor. Biol.**, v. 199, p. 257-274, 1999.
- [30] NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehinger principles of biochemistry**. 3. ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 280.
- [31] BREZESINSKI, G.; MÖHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 100-102, p. 563-584, 2003.
- [32] CHAN, Y.H.; BOXER, S.G. Model membrane systems and their applications. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, n. 6, p. 581-587, 2007.
- [33] THE CELL MEMBRANE by: Greg Geibel. Disponível em: <http://sun.menloschool.org/~cweaver/cells/c/cell_membrane/> Acesso em: 24 jul. 2008.
- [34] BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **J. Mol. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 238-52, 1965.
- [35] VLADIMIR, P. Torchilin recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, p. 145-160, 2005.
- [36] AVANTI POLAR LIPIDS, The phospholipids and sphingolipid people home page. Disponível em: <<http://www.avantilipids.com/>> Acesso em: 24 jul. 2008.
- [37] FISHER, M. I.; TJÄRNHAGE, T. Structure and activity of lipid membrane biosensor surfaces studied with atomic force microscopy and a resonant mirror. **Biosens. Bioelectron.**, v. 15, p. 463-471, 2000.
- [38] LAVAN, D.A.; MCGUIRE, T.; LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. **Nat. Biotechnol.**, v. 21, n. 10, p. 1184-1191, 2003.
- [39] WANG, L.; SCHÖNHOF, M.; MÖHWALD, H. Lipids coupled to polyelectrolyte multilayers: ultraslow diffusion and the dynamics of electrostatic interactions. **J. Phys. Chem. B**, v. 106, n. 35, p. 9135-9142, 2002.

- [40] VOLODKIN, D.; ARNTZ, Y.; SCHAAF, P.; MOEHWALD, H. VOEGEL, J.-C.; BALL, V. Composite multilayered biocompatible polyelectrolyte films with intact liposomes: stability and temperature triggered dye release. **Soft Matter.**, v. 4, p. 122–130, 2008.
- [41] DÍAZ, P.; GIMENO, Y.; CARRO, P.; GONZÁLEZ, S.; SCHILARDI, P. L.; BENÍTEZ, G.; SALVAREZZA, R. C.; CREUS, A. H. Electrochemical self-assembly of melanin films on gold. **Langmuir**, v. 21, n. 13, p. 5924-5930, 2005.
- [42] PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects. **Acta Biochim. Pol.**, v. 53, p. 429–443, 2006.
- [43] NIGHSWANDER-REMPEL, S. P.; RIESZ, J.; GILMORE, J.; BOTHMA, J. P.; MEREDITH, P. Quantitative fluorescence excitation spectra of synthetic eumelanin. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, n. 43, p. 20629-20635, 2005.
- [44] HUNG, Y.-C.; SAVA, V. M.; MAKAN, S. YU.; CHEN, T.-H. J.; HONG, M.-Y.; HUANG, G. S. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states. **Food Chem.**, v. 78, p. 233–240, 2002.
- [45] SAVA, V. M.; YANG, S.-M.; HONG, M.-Y.; YANG, P.-C.; HUANG G. S. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. **Food Chem.**, v. 73, p. 177-184, 2001.
- [46] HUNG, Y. C.; SAVA, V. M.; BLAGODARSKY, V. A.; HONG, M.-Y.; HUANG, G. S. Protection of tea melanin on hydrazine-induced liver injury. **Life Sci.**, v. 72, p. 1061–1071, 2003.
- [47] KARLSSON, A.M.; BJUHR, K.; TESTORF, M.; ÖBERG, P.Å.; LERNER, E.; LUNDSTRÖM, I.; SVENSSON, S. P.S. Biosensing of opioids using frog melanophores. **Biosens. Bioelectron.**, v. 17, n. 4, p. 331–335, 2002.
- [48] DA SILVA, M.I.N.; DEZIDÉRIO, S.N.; GONZALEZ J.C.; GRAEFF, C.F.O.; COTTA, M.A. Synthetic melanin thin films: Structural and electrical properties. **J. Appl. Phys.**, v. 96, p. 5803-5807, 2004.
- [49] CLANCY, C.M.R.; NOFSINGER, J.B.; HANKS, R.K.; SIMON, J.D. A hierarchical self-assembly of eumelanin. **J. Phys. Chem. B**, v. 104, n. 33, p. 7871-7873, 2000.
- [50] LL'ICHEV, Y.V.; SIMON, J.D. Building blocks of eumelanin: relative stability and excitation energies of tautomers of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-indolequinone. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, n. 29, p. 7162-7171, 2003.
- [51] GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.
- [52] RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, p. 389–407, 2005.

- [53] WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, n. 12, p. 983–988, 2001.
- [54] CLARK, L. C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. **ASAIO J.**, v. 2, p. 41-48, 1956.
- [55] CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.
- [56] YELLOW SPRING INSTRUMENT COMPANY. Technology and environmental monitoring. Disponível em: <<https://www.yssi.com/>> Acesso em: 24 jul. 2008.
- [57] ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 23, n. 7, p. 1083-1100. 2008.
- [58] FAN, X.; WHITE, I. M.; SHOPOVA, S. I.; ZHU, H.; SUTER, J. D.; SUN, Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. **Anal. Chim. Acta**, v. 620, n. 1-2, p. 8-26, 2008.
- [59] TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. **Methods**, v. 37, n. 1, p. 48-56, 2005.
- [60] DANIELSSON, B. Calorimetric biosensors. **J Biotechnol.**, v. 15, n. 3, p. 187-200, 1990.
- [61] ZUCOLOTTO, V.; DAGHASTANLI, K. R.; HAYASAKA, C. O.; RIUL JR, A.; CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA JR, O. N. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. **Anal. Chem.**, v. 79, n. 5, p. 2163-2167, 2007.
- [62] BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. É.; LAGIER, C. M. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. **Sensors**, v. 8, p. 1366-1399, 2008.
- [63] HOSHI, T.; SAIKI, H.; ANZAI, J.-I. Amperometric uric acid sensors based on polyelectrolyte multilayer films. **Talanta**, v. 61, p. 363-368, 2003.
- [64] NEFF, V.D. Electrochemical oxidation and reduction of thin films of Prussian Blue. **J. Electrochem. Soc.**, v. 125, n. 6, p. 886–887, 1978.
- [65] ITAYA, K.; AKAHOSHI, H.; TOSHIMA, S. Electrochemistry of Prussian Blue modified electrodes: an electrochemical preparation method. **J. Electrochem. Soc.**, v. 129, n. 7, p. 1498–1500, 1982.
- [66] BOYER, A.; KALCHER, K.; PIETSCH, R. Voltammetric behavior of perborate on Prussian Blue modified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**, v. 2, p. 155–161, 1990.
- [67] KARYAKIN, A. A.; CHAPLIN, M. Polypyrrole Prussian Blue films with controlled level of doping: codeposition of polypyrrole and Prussian Blue. **J. Electroanal. Chem.**, v. 56, p. 85–92, 1994.

- [68] KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. Prussian-Blue based amperometric biosensors in flow-injection analysis. **Talanta**, v. 43, p. 1597–1606, 1996.
- [69] HASINOFF, B. B.; DUNFORD, H. B. Kinetics of the oxidation of ferrocyanide by horseradish peroxidase compounds I and II. **Biochemistry**, v. 9, p. 4930–4932, 1970.
- [70] FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA JR, O. N.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, n. 12, p. 1611-1615, 2004.
- [71] TAYLOR, D. M.; MACDONALD, A. G. AC admittance of the metal/insulator/electrolyte interface. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 20, p. 1277-1283, 1987.
- [72] RIUL JR, A.; MATTOSO, L. H. C.; FONSECA, F. J.; TAYLOR, D. M.; MELLO, S. V.; VENANCIO, E. C. “Sensor à base de plásticos condutores e lipídios para avaliação de paladar de bebidas (Língua Eletrônica)”. BR n. PI 0103502-9, 21 fev. 2001.
- [73] SAUM, A. G. E.; CUMMING, R. H.; ROWELL, F. J.; Use of substrate coated electrodes and AC impedance spectroscopy for the detection of enzyme activity. **Biosens. Bioelectron.**, v. 13, p. 511–518, 1998.
- [74] HALL, A. P.; BARRY, P. E.; DAWBER, T. R.; MCNAMARA, P. M. Epidemiology of gout and hyperuricemia : A long-term population study. **Am. J. Med.**, v. 42, p. 27-37, 1967.
- [75] JÄNCHEN, M.; WALZEL, G.; NEEF, B.; WOLF, B.; SCHELLER, F.; KÜHN, M.; PFEIFFER, D.; SOJKA, W.; JAROSS, W. Uric acid determination in dilute serum with an enzyme electrochemical and enzyme-free sensor. **Biomed. Biochim. Acta**, v. 42, n. 9, p. 1055-1065, 1983.
- [76] KUWABATA, S; NAKAMINAMI, T.; ITO, S.-I.; YONEYAMA, H. Preparation and properties of amperometric uric acid sensors. **Sens. Actuators B Chem.**, v. 52, p. 72-77, 1998.
- [77] MILAND, E.; ORDIERES, A. J. M.; BLANCO, P. T.; SMYTH, M. R.; FÁGÁIN, C. Ó. Poly(o-aminophenol)-modified bienzyme carbon paste electrode for the detection of uric acid. **Talanta**, v. 43, n. 5, p. 785-796, 1996.
- [78] PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN LOON, A. P. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 1696-1700, 1997.
- [79] LIU, Q.; HUANG, Q.; LEI, X. G.; HAO, Q. Crystallographic Snapshots of *Aspergillus fumigatus* Phytase, Revealing Its Enzymatic Dynamics. **Structure**, v. 12, p. 1575-1583, 2004.
- [80] NAGASHIMA, T.; TANGE, T.; ANAZAWA, H. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4682-4684, 1999.
- [81] NOVOZYMES. Disponível em: <<http://www.novozymes.com/>> Acesso em: 3 jul. 2008.

- [82] RABOY, V. Seeds for a better future: 'low phytate' grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. **Trend Plant. Sci.**, v. 6, p. 458-462, 2001.
- [83] HATZACK, F.; HÜBEL, F.; ZHANG, W.; HANSEN, P. E.; RASMUSSEN, S.K. Inositol phosphates from barley low-phytate grain mutants analysed by metal-dye detection HPLC and NMR. **Biochem. J.**, v. 354, p. 473-480, 2001.
- [84] BAE, H. D.; YANKE, L. J.; CHENG, K.-J.; SELINGER, L. B. A novel staining method for detecting phytase activity. **J. Microbiol. Methods**, v. 39, p. 17-22, 1999.
- [85] ZAK, B. Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 27, n. 5, p. 583-588, 1957.
- [86] BLOMHOFF, J. P. Serum cholesterol determination by gas-liquid chromatography. **Clin. Chim. Acta**, v. 43, n. 2, p. 257-265, 1973.
- [87] AGULLÓ, E.; GELÓS S. B. Gas-liquid chromatographic determination of total and free cholesterol in egg pastas. **Food Res. Int.**, v. 29, p. 77-80, 1996.
- [88] ZICHA, J.; KUNES, J.; DEVYNEK, M.-A. Abnormalities of membrane function and lipid metabolism in hypertension: A review. **J. Am. J. Hypertens.**, v. 12, p. 315-331, 1999.
- [89] FOSTER, R.; CASSIDY, J.; O'DONOGHUE, E. Electrochemical diagnostic strip device for total cholesterol and its subfractions. **Electroanalysis**, v. 12, n. 9, p. 716-721, 2000.
- [90] RAM, M. K.; BERTONCELLO, P.; DING, H.; PADDEU, S.; NICOLINI, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, n. 9-12, p. 849-856, 2001.
- [91] GABISON, L.; CHIADMI, M.; COLLOC'H, N.; CASTRO, B.; EL HAJJI, M.; PRANGE, T. Recapture of [S]-allantoin, the product of the two-step degradation of uric acid, by urate oxidase. **Febs Lett.**, v. 580, p. 2087-2091, 2006.
- [92] YUE, Q. K.; KASS, I. J.; SAMPSON, N. S.; VRIELINK, A. Crystal structure determination of cholesterol oxidase from *Streptomyces* and structural characterization of key active site mutants. **Biochemistry**, v. 38, n. 14, p. 4277-4286, 1999.
- [93] RCSB protein data bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>> Acesso em: 24 jul. 2008.
- [94] ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; LEI, X. G.; MULLANEY, E. J. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 275, n. 2, p. 279-285, 2000.
- [95] SKOOG, DOUGLAS A. **Principles of instrumental analysis**. Philadelphia: Orlando, Harcourt Brace College Publishers, 1998. p. 299-444.
- [96] LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York: Springer, 2006.

- [97] DE CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR - uma nova ferramenta para biossensores, **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.
- [98] ZACHER, T.; WISCHERHOFF, E. Real-time two-wavelength surface plasmon resonance as a tool for the vertical resolution of binding processes in biosensing hydrogels. **Langmuir**, v. 18, n. 5, p. 1748 -1759, 2002.
- [99] WINK, T.; VAN ZUILEN, S. J.; BULT, A.; VAN BENNEKOM, W. P. Liposome-mediated enhancement of the sensitivity in immunoassays of proteins and peptides in surface plasmon resonance spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 70, n. 5, p. 827-832, 1998.
- [100] FRAGNETO-CUSANI, G. Neutron reflectivity at the solid/liquid interface: examples of applications in biophysics. **J. Phys. Condens. Matter.**, v. 13, n. 21, p. 4973-4989, 2001.
- [101] PARRATT32 or the reflectivity tool for windows. Version 1.6: analysis of reflectivity data. Berlin Neutron Scattering Centre, 2008. Disponível em: <<http://www.hmi.de/bensc/>>. Acesso em: 24 jul. 2008.
- [102] FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.
- [103] BORATO, Carlos Eduardo. **Desenvolvimento de sensores poliméricos para detecção de metais pesados e avaliação da água**. 2007. 171f. (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [104] MORAES, M. L.; OLIVEIRA JR., O. N.; RODRIGUES FILHO, U. P.; FERREIRA, M. Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing. **Sens. Actuators B Chem.**, v. 131, n. 1, p. 210-215, 2008.
- [105] JANIN, J. Surface and inside volumes in globular proteins. **Nature**, v. 277, p. 491-492, 1979.
- [106] TSUKRUK, V. V.; RINDERSPACHER, F.; BLIZNYUK, V. N. Self-assembled multilayer films from dendrimers. **Langmuir**, v. 13, n. 8, p. 2171-2176, 1997.
- [107] KIM, B. Y.; BRUENING, M. L. pH-dependent growth and morphology of multilayer dendrimer/poly(acrylic acid) films. **Langmuir**, v. 19, n. 1, p. 94 -99, 2003.
- [108] KAYATZ, P.; THUMANN, G.; LUTHER, T. T.; JORDAN, J. F.; BARTZ-SCHMIDT, K. U.; ESSER, P.J.; SCHRAERMAYER, U. Oxidation causes melanin fluorescence. **IOVS**, v. 42, p. 241-246, 2001.
- [109] RAPOSO, M.; PONTES, R. S.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA JR., O. N. Kinetics of adsorption of poly(o-methoxyaniline) self-assembled films. **Macromolecules**, v. 30, n. 20, p. 6095 -6101, 1997.
- [110] DE SOUZA, N. C.; SILVA, J. R.; RODRIGUES, C. A.; HERNANDES, A. C.; COSTA, L. D.; GIACOMETTI, J. A.; OLIVEIRA JR., O. N. Diffusion-controlled growth of aggregates in layer-by-layer films of poly(o-methoxyaniline). **Synth. Met.**, v. 135, p. 121-122, 2003.

[111] RIBEIRO, P. A.; STEITZ, R.; LOPIS, I. E.; HAAS, H.; SOUZA, N. C.; OLIVEIRA JR., O. N.; RAPOSO, M. Thermal Stability of Poly(o-Methoxyaniline) Layer-by-Layer Films Investigated by Neutron Reflectivity and UV-VIS Spectroscopy. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 6, p. 1396–1404, 2006.

[112] LOBO, R. F. M.; PEREIRA-DA-SILVA, M. A.; RAPOSO, M.; FARIA, R. M.; OLIVEIRA JR, O. N. The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy. **Nanotechnology**, v. 14, p. 101-108, 2003.

CURRICULUM VITAE

Marli Leite de Moraes

Instituto de Física de São Carlos/USP

Av. Trabalhador Sãoocarlense, 400

CEP: 13560-970, São Carlos - SP

Fone: +55 1633739797 Ramal 220

e-mail: moraes@ifsc.usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2004   Doutorado em Físico-Química em andamento
                  Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
                  com período sanduíche na Universidade Nova de Lisboa (Orientador : Maria Raposo)
                  de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2001 - 2003   Mestrado em Física Aplicada Ênfase Em Física Biomolecular.
                  Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
                  Título: Filmes de Langmuir e vesículas multilamelares de fosfolipídios e suas interações com um peptídeo oriundo da proteína p24 do HIV-1, Ano de obtenção: 2003
                  Orientador: Leila Maria Beltramini
                  Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1997 - 2000   Graduação em Bacharel em Química.
                  Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
                  Título: preparação e caracterização de matrizes acelulares de colágeno e elastina para desenvolvimento de próteses traqueais
                  Orientador: Gilberto Goissis

Artigos completos publicados em periódicos

1. MORAES, M. L., BAPTISTA, M. S., ITRI, R., ZUCOLOTTO, V., OLIVEIRA JR., O. N. Immobilization of liposomes in nanostructured layer-by-layer films containing dendrimers. **Materials Science & Engineering. C: Biomimetic Materials, Sensors and Systems.**, v.28, p.467 - 471, 2008.
2. MORAES, M. L., OLIVEIRA JR., O. N., RODRIGUES-FILHO, U. P., FERREIRA, M. Phytase Immobilization on Modified Electrodes for Amperometric Biosensing. **Sensors and Actuators. B, Chemical.** , v.131, p.210 - 215, 2008.

3. MORAES, M. L., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N., FERREIRA, M. Immobilization of uricase in layer-by-layer films used in amperometric biosensors for uric acid. **Journal of Solid State Electrochemistry.** , v.11, p.1489 - 1495, 2007.
4. ZUCOLOTTI, V., PINTO, A. P. A., TUMOLO, T., MORAES, M. L., BAPTISTA, M. S., RIUL JR., A., ARAUJO, A. P. U., OLIVEIRA JR., O. N. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. **Biosensors & Bioelectronics.**, v.21, p.1320 - 1326, 2006.
5. CASELI, L., MORAES, M. L., ZUCOLOTTI, V., FERREIRA, M., NOBRE, T. M., ZANIQUELLI, M. E. D., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N. Fabrication of phytic acid sensor based on mixed phytase-lipid Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v.22, p.8501 - 8508, 2006.
6. MORAES, M. L., BONARDI, C., MENDONÇA, C. R., CAMPANA, P. T., LOTTERSBERGER, J., TONARELLI, G., OLIVEIRA JR., O. N., BELTRAMINI, L. M. Cooperative effects in phospholipid monolayers induced by a peptide from HIV-1 capsid protein. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.41, p.15 - 20, 2005.

Artigo aceito para publicação

1. MORAES, M. L., de SOUZA, N. C., HAYASAKA, C. O., FERREIRA, M., RODRIGUES-FILHO, U. P., RIUL JR., A., ZUCOLOTTI, V., OLIVEIRA JR., O. N. Immobilization of cholesterol oxidase in LbL films and detection of cholesterol using ac measurements. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems.** , 2008.

Livro publicado

1. MOTHEO, ARTUR DE JESUS, GABRIEL, J. R., JOHANSEN, H. D., MORAES, M. L. **Experimentos de Química Geral.** São Carlos : IQSC-USP, 2006, v.1. p.99.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. MORAES, M. L., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N., FERREIRA, M. Amperometric biosensors made with layer-by-layer (LbL) films In: 3rd International Symposium on Advanced Materials and Nanostructures, 2008, Viña del Mar.
2. MORAES, M. L., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N., FERREIRA, M. Enzyme immobilization using layer-by-layer films for amperometric biosensors In: 2nd French-Brazilian Meeting on Polymers, 2008, Florianópolis.
3. MORAES, M. L., GOMES, P. J., RIBEIRO, P. A., MACANITA, A. L., GONCALVES, D., KOHLER, R., OLIVEIRA JR., O. N., RAPOSO, M. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated into liposomes In: International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals, 2008, Porto de Galinhas.

4. MORAES, M. L., RODRIGUES-FILHO, U. P., RIUL JR., A., FERREIRA, M., GOMES, H. L., OLIVEIRA JR., O. N. Strategies to optimize biosensors based on impedance spectroscopy In: International Conference on Science and Technology of Synthetic Metals, 2008, Porto de Galinhas.
5. GOMES, P. J., MORAES, M. L., KOHLER, R., RIBEIRO, P. A., RAPOSO, M. X-rays Effect on Biomimetic Membranes Studied by Neutron Reflectivity In: Electron Controlled Chemical Lithography, 2008, Lisboa.
6. FERREIRA, M., MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., Coutinho-Netto, J., MULATO, M., OLIVEIRA JR., O. N. Bioactive Layer-by-Layer Films of Liposomes and Natural Rubber-Angiogenic Fraction In: 4st International Symposium on Macromolecules, Rio de Janeiro.
7. MORAES, M. L., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N., FERREIRA, M. Detection of phosphate ions using phytase amperometric biosensors In: Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais, 2006, Florianópolis.
8. MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., OLIVEIRA JR., O. N., RODRIGUES-FILHO, U. P., FERREIRA, M. Immobilization of the phytase on modified eletrodes for amperometric biosensors In: Instituto Multidisciplinar de Materais Poliméricos - Instituto do Milênio, Atibaia.
9. MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., ARAUJO, A. P. U., OLIVEIRA JR., O. N., Bianconi, M. L., BELTRAMINI, L. M. Interactions of peptide rp24-3 from HIV-1 p24 protein with phospholipid vesicles and monolayers In: Workshop on Biocalorimetry and Biological Thermodynamics, Rio de Janeiro.
10. GERALDO, V. P. N., MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., OLIVEIRA JR., O. N. Nanostructured films containing liposomes for controlled release of ibuprofen In: Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais, 2006, Florianópolis.
11. OLIVATI, C., MORAES, M. L., GIACOMETTI, J. A., BALOGH, D. T., OLIVEIRA JR., O. N. Optical characterization of GFP/OC1OC6-PPV films In: Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais, 2006, Florianópolis.
12. CASELI, L., MORAES, M. L., ZANIQUELLI, M. E. D., ZUCOLOTTTO, V., FERREIRA, M., NOBRE, T. M., Zaniqueli, M. E. D., RODRIGUES-FILHO, U. P., OLIVEIRA JR., O. N. Study of the interaction of phytase with nanostructured lipid films by harmonic oscillation and axisymmetric drop shape analysis In: Sociedade Brasileira de Pesquisas em Materiais, 2006, Florianópolis.
13. MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., PINTO, A. P.A., ARAUJO, A. P. U., ITRI, R., BELTRAMINI, L. M., OLIVEIRA JR., O. N., RODRIGUES-FILHO, U. P. Interação e incorporação do peptídeo rp24-3 do HIV-1 em modelos de membrana In: Instituto Multidisciplinar de Materais Poliméricos - Instituto do Milênio, Atibaia.
14. MORAES, M. L., ZUCOLOTTTO, V., OLIVEIRA JR., O. N., RODRIGUES-FILHO, U. P., FERREIRA, M. Modified electrodes incorporating phytase for amperometric

- biosensors In: IV Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - SBPMat, 2005, Recife.
15. MORAES, M. L., ZUCOLOTTI, V., PINTO, A. P.A., ARAUJO, A. P. U., ITRI, R., BELTRAMINI, L. M., OLIVEIRA JR., O. N., RODRIGUES-FILHO, U. P. Nanostructured polymer films for immobilization of peptides in lipid vesicles In: 1st French-Brazilian Meeting on Polymers, 2005, Florianópolis.
  16. MORAES, M. L., ZUCOLOTTI, V., OLIVEIRA JR., O. N. Immobilization of lipid vesicles in nanostructured polymer films In: III Encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais - SBPMat, 2004, Foz do Iguaçu.
  17. MORAES, M. L., CAMPANA, P. T., GARCIA, A. F., TONARELLI, G., LOTTERSBERGER, J., MENDONCA, C. R., BELTRAMINI, L. M., CASTILHO, P. V., ARAUJO, A. P. U., OLIVEIRA JR., O. N. Interaction between peptides from p24 protein from hiv-1 with biomimetic systems of phospholipids In: 2nd International Workshop on Spectroscopy for Biology, 2004, Rio de Janeiro.
  18. MORAES, M. L., CAMPANA, P. T., LOTTERSBERGER, J., TONARELLI, G., BONARDI, C., OLIVEIRA JR., O. N., BELTRAMINI, L. M. Interactions between peptide sequences of HIV-1 p24 protein with DPPC monolayers and multilamellar vesicles In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular- SBBq, 2003, Caxambu.
  19. MORAES, M. L., OLIVEIRA JR., O. N., BELTRAMINI, L. M. Interação de seqüências peptídicas da proteína p24 do hiv com monocamadas de fosfolipídios In: VI Workshop de Pós-graduação em Física, 2002, São Carlos.
  20. MORAES, M. L., TONARELLI, G., BONARDI, C., OLIVEIRA JR., O. N., BELTRAMINI, L. M. Interaction between peptides sequences of p24 HIV protein with phospholipid monolayers In: Inter-American Workshop on the Use of Synchrotron Radiation: Applications to Macromolecules and Biological Systems, 2002, Campinas.