Universidade de São Paulo - USP
Instituto de Química De São Carlos – IQSC
Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos - GMEME

"Desenvolvimento e Caracterização de um Biossensor Bienzimático Imobilizado Sobre Monocamadas Auto-Organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos"

Andressa Galli

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

SÃO CARLOS

2009

Andressa Galli

"Desenvolvimento e Caracterização de um Biossensor Bienzimático Imobilizado Sobre Monocamadas Auto-Organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos"

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado

SÃO CARLOS

2009

Dedico este trabalho,

Aos meus pais: Acir e Miriam

A vocês, meus maiores incentivadores, que abriram as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais intensa que encontraram: o estudo.

"Há homens que lutam um dia e são bons
Há outros que lutam um ano e são melhores
Há aqueles que lutam muitos anos e são muito bons
Mas há aqueles que lutam toda a vida, esses são os imprescindíveis."
(Bertold Brecht)

Ao meu irmão Anderson, à minha cunhada Silvana, aos meus sobrinhos Vinícius e Júlia e à minha avó Rosa

Pelo imenso amor, alegria, e apoio nas etapas da minha vida

"Minha família, minha vida
Jamais os deixarei sozinhos
Pois sempre estarão comigo
Esteja onde estiver
De vocês sempre lembrarei
Choros, risos, tudo jamais esquecerei
O tempo passa na vida e na memória
Logo percebo que os laços são reais agora
Meu amor é eterno
O vento não leva
O fogo não queima
A água não carrega
Sempre que estou só, sinto-os em meu coração
Família feliz
Família matriz
Família que amo."
(DALS)

AGRADECIMENTOS

Ao bondoso Deus, presença constante em toda minha existência.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Sergio Antonio Spinola Machado, pela orientação e por estar sempre presente: presente pelo conhecimento que transmitiu, pela amizade que conquistou e pelo exemplo que legou.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Avaca por ter me aceito no grupo de materiais eletroquímicos e métodos eletroanalíticos – GMEME.

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo pelo conhecimento acerca dos métodos eletroanalíticos.

Ao Sr. João Tiengo por toda a ajuda, dedicação e paciência, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

Ao Marcelo Calegaro pela grande amizade, apoio e ajuda técnica, especialmente com os computadores.

À minha amiga Dra. Djenaine de Souza, por todo o incentivo, conhecimento, paciência e afeto a mim dedicados.

À Juliana Cancino, amiga, companheira de todas as horas, irmã de coração e futura comadre por todo apoio, pelos laços de amizade, carinho e imensa paciência. Obrigada por estar sempre presente nesta jornada e, a partir de agora, em minha vida.

À Claudia Razzino pela amizade e ajuda incondicionais e pelas discussões acerca dos grandes dilemas enzimáticos.

À Eliana Valle, pelo carinho, amizade, apoio e por estar sempre ao meu lado.

Às sempre "meninas superpoderosas": Josiane e Inês, por estarem sempre comigo, apesar da distância.

Às amigas especiais: Raquel, Claudia Breda, Marcelina, Michele e Renata por me mostrarem o verdadeiro valor da amizade.

Ao amigo Rafael, pela ajuda imprescindível.

Aos amigos e colegas que foram ou ainda são do GMEME: Alexandra, Kelly, Sonia, Milena, Murilo, Gustavo, Fabiano, Kathlin, Giancarlo, Lívia, Hugo, Lucia, Valber, Deborah, Robson, Solange e Osmair pela alegria contagiante.

A Sílvia e Andréia da secretaria da pós-graduação pelo bom atendimento.

Às funcionárias da biblioteca pela pronta ajuda sempre que necessário.

Ao Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos do IQSC/USP, pela infra-estrutura e oportunidade concedidas.

A todos os meus familiares, pela confiança e motivação.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos (processo 05/00294-8).

"Qualquer trabalho científico, qualquer descoberta, qualquer invenção é um trabalho universal. Ele está condicionado, em parte pela cooperação de contemporâneos, em parte pela utilização do trabalho de seus predecessores."

(Karl Marx)

A PEDRA

O distraído nela tropeçou.

O bruto a usou como projétil.

O empreendedor, usando-a, construiu.

O camponês cansado da lida, dela fez assento.

Para meninos, foi brinquedo.

Drummond a poetizou.

Já, David matou Golias.

Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura.

E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no homem!

Não existe "pedra" no seu caminho que você não possa aproveitá-la para seu próprio crescimento. Pense nisso...

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---- **1**

1.1 Considerações Gerais ---- ***1***

1.2 Biossensores ---- ***2***

1.2.1 Aspectos e Definições dos Biossensores ---- **3**

1.2.2 Desenvolvimento dos Biossensores: Aspectos Históricos ---- **5**

1.2.3 Classificação dos Biossensores ---- **8**

1.2.3.1 Biossensores de Primeira Geração: O Eletrodo de Oxigênio ---- 8

1.2.3.2 Biossensores de Segunda Geração: Mediadores Artificiais ---- 9

1.2.3.3 Biossensores de Terceira Geração: Transferência Direta de Elétrons ---- 9

1.2.4 Escolha do Material Biológico ---- **11**

1.2.5 Formas Usuais para imobilização de Biomoléculas em Substratos Sólidos para Confecção de Biossensores ---- **12**

1.2.6 Desempenho Analítico dos Biossensores ---- **16**

1.2.7 Mediadores ---- **17**

1.2.8 Uma Alternativa Atual para a construção de Biossensores – As Camadas Automontadas (Self-Assembled Monolayers – SAMs) ---- **19**

1.3 Desenvolvimento de Biossensores para a Determinação de Glicose ---- ***33***

1.4 Desenvolvimento de Biossensores para a Determinação de Frutose ---- ***37***

1.5 O Açúcar Sacarose ---- ***39***

1.6 Substitutos da Sacarose em Alimentos: Os Edulcorantes ---- ***40***

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS ---- **43**

2.1 Cronoamperometria ---- ***43***

2.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ---- ***44***

2.3 Microbalança de Cristal de Quartzo ---- ***44***

3 OBJETIVO ---- **46**

4 PARTE EXPERIMENTAL ---- **47**

4.1 Materiais e Métodos ---- ***47***

4.1.1 Soluções ---- **47**

4.1.2 Reagentes ---- **47**

4.1.2.1 Solução de Cistamina (CYS) ---- 48

4.1.2.2 Solução Piranha ---- 48

4.1.2.3 Solução de Ácido Sulfúrico ---- 49
4.1.2.4 Solução de Ferricianeto de potássio ---- 49
4.1.2.5 Solução Tampão Fosfato de Sódio ---- 49
4.1.2.6 Solução Tampão McIlvaine ---- 49
4.1.2.7 Solução de D-Glicose ---- 49
4.1.2.8 Solução de D-Frutose ---- 50
4.1.2.9 Solução equimolar de D-Glicose e D-Frutose ---- 50
4.1.2.10 Solução da Enzima Glicose Oxidase (GOx) ---- 50
4.1.2.11 Solução da Enzima Frutose 5-Dehidrogenase (FDH) ---- 50
4.1.2.12 Solução do Mediador Tetratiafulvaleno (TTF) ---- 51
4.1.2.13 Solução de Glutaraldeído ---- 51
4.2 Instrumentação ---- ***51***
4.2.1 Ajustes de pH ---- **51**
4.2.2 Pesagens dos Reagentes Utilizados ---- **51**
4.2.3 Medidas Eletroquímicas ---- **51**
4.2.4 Medidas Espectrofotométricas ---- **52**
4.3 Eletrodos ---- ***52***
4.3.1 Eletrodos de Trabalho ---- **52**
4.3.2 Eletrodo de Referência ---- **53**
4.3.3 Eletrodo Auxiliar ---- **53**
4.4 Células Eletroquímica ---- ***53***
4.5 Metodologia ---- ***56***
4.5.1 Procedimentos de Pré-Tratamento para a Superfície Eletródica ---- **56**
4.5.1.1 Solvente Utilizado: ---- 57
4.5.1.2 Concentração e Tempo de Imersão: ---- 57
4.5.1.3 Limpeza do Substrato: ---- 58
4.5.2 Determinação da Área Eletroquímica do eletrodo de Ouro ---- **59**
4.5.3 Formação das Monocamadas Auto-Organizadas sobre a Superfície Eletródica --- **60**
4.5.4 Remoção das Monocamadas Auto-Organizadas da Superfície Eletródica ---- **60**
4.5.5 Estudos Voltamétricos ---- **60**
4.5.6 Estudos Amperométricos ---- **61**
4.5.7 Estudos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica ---- **61**
4.5.8 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) ---- **62**

4.5.9 Preparação dos Biossensores ---------- **64**

4.5.10 Avaliação do Desempenho Analítico dos Biossensores a Base de GOx e FDH ----- **65**

4.5.10.1 Influência da Concentração Enzimática ---------- 65

4.5.10.2 Estabilidade da Enzima GOx em Solução ---------- 65

4.5.10.3 Estudo da Concentração do Mediador Redox ---------- 66

4.5.10.4 Efeito da Porcentagem de Glutaraldeído ---------- 66

4.5.10.5 Efeito da Temperatura ---------- 66

4.5.10.6 Efeito da Concentração Hidrogeniônica ---------- 66

4.5.10.7 Estudo da Reprodutibilidade de Preparação do Biossensor Bienzimático ---- 67

4.5.10.8 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do Biossensor Bienzimático ---------- 67

4.5.10.9 Estudo da Estabilidade do Biossensor Bienzimático ---------- 67

4.5.10.10 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para os Biossensores ---------- 68

4.5.10.11 Aplicação do Biossensor Bienzimático em Amostras de Alimentos --------- 68

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO ---------- **69**

5.1 O Tiol Cistamina (CYS) ---------- ***69***

5.2 Caracterização dos Eletrodos de Ouro com SAM de Cistamina (SAM-CYS) ---------- ***70***

5.2.1 Efeito do Tempo na Formação da SAM-CYS ---------- **70**

5.2.2 Dessorção Eletroquímica ---------- **72**

5.3 Construção dos Biossensores a Base das enzimas GOx e FDH ---------- ***79***

5.3.1 ------ Modificação das Camadas Auto-Organizadas com as Enzimas Glicose Oxidase (GOx) e Frutose Dehidrogenase (FDH): Otimização e Aplicação ---------- **79**

5.3.1.1 Influência da Concentração Enzimática ---------- 79

5.3.1.2 Estabilidade da Enzima GOx em Solução ---------- 80

5.3.1.3 Determinação do Potencial de Trabalho ---------- 81

5.3.1.4 Estudo da Concentração do Mediador Redox ---------- 82

5.3.1.5 Efeito da Porcentagem de Glutaraldeído ---------- 83

5.3.1.6 Efeito da Temperatura ---------- 84

5.3.1.7 Efeito da Concentração Hidrogeniônica ---------- 86

5.3.1.8 Efeito do Eletrólito Suporte para a enzima Frutose Dehidrogenase ---------- 87

5.3.1.9 Estudo da Reprodutibilidade de Preparação dos Biossensores Bienzimáticos - 88

5.3.1.10 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do Biossensor Bienzimático ---------- 89

5.3.1.11 Estudo da Estabilidade do Biossensor Bienzimático ---------- 89

5.3.1.12 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU ---------- 90

5.3.1.13 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-FDH--GLU ---------- 92

5.3.1.14 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-FDH--GLU ---------- 94

5.3.1.15 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Bienzimático94

5.3.1.16 Aplicação do Biossensor Bienzimático em Amostras de Alimentos ---------- 95

5.3.1.17 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)---------- 99

5.3.1.18 Análise de Interferentes ----------106

5.3.1.19 Nanobalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ) ----------106

6 CONCLUSÕES---------- 109

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ---------- 111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de funcionamento de um biossensor. ---------- 5

Figura 2. Esquema da montagem (A) e representação esquemática do funcionamento (B) do biossensor de glicose desenvolvido por Clark e Lyons[18] ---------- 6

Figura 3. Representação dos diferentes funcionamentos de um biossensor. ---------- 10

Figura 4. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico[40].-------- 13

Figura 5. Esquema do emparelhamento entre os alcanotióis e o retículo do ouro numa camada auto-organizada. Átomos de enxofre representados em amarelo e átomos de ouro representados em dourado. ---------- 23

Figura 6. Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por monocamadas auto-organizadas (c)[50]. ---------- 28

Figura 7. Representação esquemática de uma monocamada auto-organizada de tióis funcionalizados com o grupo viologênio sobre um eletrodo de ouro. ---------- 29

Figura 8. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) eletrodo de trabalho, (2) eletrodo de referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada de N_2. ---------- 54

Figura 9. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com microbalança eletroquímica de cristal de quartzo. ---------- 55

Figura 10. Esquema representativo do circuito de Randles. ---------- 62

Figura 11. Estrutura da molécula de cistamina.---------- 70

Figura 12. Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ na concentração de $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) para: eletrodo de ouro liso (—) e eletrodo de ouro modificado com cistamina nos tempos de: 2 (—); 6 (—); 12 (—) e 24 (—) horas com velocidade de varreura v = 50 mV s^{-1}. ---------- 72

Figura 13. Voltamograma cíclico obtido para o tempo de 2 horas de deposição da SAM-CYS em solução de KOH 0,1 mol L^{-1}. Potencial: +0,10 V a -1,30 V com f = 100 s^{-1}, $\triangle E_s$ = 2 mV e a = 50 mV. ---------- 73

Figura 14. Variação do excesso superficial, Γ, para o eletrodo de ouro recoberto com diferentes tempos de formação da SAM-CYS. ---------- 75

Figura 15. Gráfico de Nyquist para o eletrodos de ouro liso em $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ em tampão fosfato pH = 6,5. Intervalo de freqüência: 100 mHz a 10 kHz. As medidas foram realizadas em potencial fixo igual a 0,200 V vs Ag/AgCl.---------- 77

Figura 16. Gráfico de Nyquist para os eletrodos de ouro recobertos com diferentes tempos de cistamina, em $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ em tampão fosfato pH = 6,5. Intervalo de freqüência: 100 mHz e 10 kHz. As medidas foram realizadas em potencial fixo igual a 0,180 V vs Ag/AgCl. ---------- 78

Figura 17. Efeito da quantidade de enzima na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 3,70x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. ---------- 80

Figura 18. Espectro de absorção da enzima GOx (132,40 mg mL^{-1}) com o tempo de estocagem da solução: (—) 1, (—) 2, (—) 6, (—) 15 (—); 29 (—); 40 (—) dias (espectros sobrepostos).---------- 81

Figura 19. Efeito do tempo de estocagem da solução da enzima GOx (132,40 mg mL^{-1}) em relação à absorbância (λ = 276 nm).---------- 81

Figura 20. Voltamogramas cíclicos obtidos para a adição de D-glicose (100 U de GOx) em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) onde: branco (—) e adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose (—). ---------- 82

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos para a adição de D-frutose (20,6 U FDH) em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) onde: branco (—) e adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-frutose (—).---------- 82

Figura 22. Representação da molécula de tetratiafulvaleno. ---------- 82

Figura 23. Cronoamperogramas obtidos para a variação na concentração do mediador TTF com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 0,01 (—); 0,05 (—) e 0,1 (—) mol L^{-1} de TTF. ---------- 83

Figura 24. Influência da concentração do mediador TTF na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl.---------- 83

Figura 25. Cronoamperogramas obtidos para a variação na porcentagem de glutaraldeído com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 0,1% (—); 0,5% (—); 1,00% (—); 5,00% (—) e 10,00% (—) de glutaraldeído. ------ 84

Figura 26. Efeito da quantidade de glutaraldeído na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. ---------- 84

Figura 27. Cronoamperogramas obtidos para a variação de temperatura com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 15°C (—); 25°C (—); 30°C (—); 35°C (—); 40°C; (—); 45°C (—) e 50°C (—).---------- 85

Figura 28. Dependência da resposta do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU em função da temperatura em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. ---------- 85

Figura 29. Cronoamperogramas obtidos para a variação de temperatura com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 25°C (—); 30°C (—); 35°C (—) e 40°C (—).---------- 86

Figura 30. Dependência da resposta do biossensor Au-CYS-TTF-FDH-GLU em função da temperatura em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH=6,5), contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-frutose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. ---------- 86

Figura 31. Dependência da resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em função do pH em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1}, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. ---------- 87

Figura 32. Cronoamperogramas obtidos para a FDH em diferentes eletrólitos suporte, onde: solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5 (—) e solução de tampão McIlvaine pH = 6,5 (—). Concentração de D-frutose de 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. ---------- 88

Figura 33. Efeito do tempo de estocagem do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU para análise diária em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. ---------- 90

Figura 34. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração de D-glicose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. Inserido: Média da dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose. Faixa linear de concentração de D-glicose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}.---------- 91

Figura 35. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração de D-frutose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. Inserido: Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-frutose. Faixa linear de concentração de D-frutose: 0,98x10^{-3} a 3,70x10^{-3} mol L^{-1}. ---------- 93

Figura 36. Voltamogramas obtidos para a adição de D-glicose e D-frutose, em soluções separadas de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: branco (—); D-glicose (—) e D-frutose (—). Concentração de D-glicose e D-frutose: 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. T=35ºC (100 U GOx).---------- 94

Figura 37. Voltamogramas obtidos para a adição de D-glicose e D-frutose, em soluções separadas de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: branco (—); D-glicose (—) e D-frutose (—). (—) Voltamograma para a D-glicose e D-frutose juntas na mesma solução. Concentração de D-glicose e D-frutose: 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. T=35ºC. (20,6 U FDH). -------- 94

Figura 38. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. Inserido: Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração da mistura D-glicose+D-frutose. Faixa linear de concentração: 0,98x10^{-3} a x10^{-3} mol L^{-1}. ---------- 95

Figura 39. Cronoamperogramas obtidos para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de refrigerante à base de cola onde: refrigerante não dietético (—); refrigerante light (—) e refrigerante dietético (—). Faixa de concentração de D-glicose+Dfrutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC. ---------- 97

Figura 40. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola dietético. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}.-------- 98

Figura 41. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola light. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}.------- 98

Figura 42. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para amostra de refrigerante não dietético.---------- 98

Figura 43. Cronoamperogramas obtidos para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: adoçante 1 (—) e adoçante 2 (—). Faixa de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC.---------- 105

Figura 44. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra 1 de adoçante. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3}a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}.---------- 105

Figura 45. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra 2 de adoçante. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}. ---------- 105

Figura 46. Cronoamperograma obtido do biossensor bienzimático para adições da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose com concentração de 0,1 µmol L^{-1} e de possíveis interferentes orgânicos na concentração de 0,25 µmol L^{-1} em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH=6,5. E aplicado: 0,200 V vs Ag/AgCl. T=35ºC ---------- 106

Figura 47. Variação da freqüência com acréscimo de massa.---------- 108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características relevantes dos materiais utilizados como elemento de reconhecimento na construção de biossensores[18]. ---------- 12

Tabela 2. Procedimentos de imobilização de biomoléculas na superfície de sensores[40].------ 16

Tabela 3. Procedência e pureza dos reagentes utilizados. ---------- 48

Tabela 4. Valores de potencial de pico dos voltamogramas cíclicos para os diferentes tempos de formação da SAM-CYS. ---------- 72

Tabela 5. Valores dos excessos superficiais, Γ, obtidos a partir da primeira varredura redutiva, do eletrodo de ouro recoberto com diferentes tempos de formação da SAM-CYS. ---------- 75

Tabela 6. Valores referentes às quantidades de D-glicose e D-frutose obtidos para as amostras de refrigerante à base de guaraná, para os tipos: dietético, light e não dietético.---------- 99

Tabela 7. Valores referentes às quantidades de D-glicose e D-frutose obtidos para as amostras de refrigerante à base de suco de laranja, para os tipos: dietético, light e não dietético. ------ 99

Tabela 8. Valores de concentração (g L^{-1}) das soluções estoque de carboidratos e suas respectivas diluições empregadas na avaliação da célula eletroquímica desenvolvida e aplicada na quantificação em refrigerantes a base de cola.---------- 100

Tabela 9. Parâmetros da forma de onda utilizada na detecção dos carboidratos.---------- 102

Tabela 10. Linearidade, coeficiente de correlação e limite de detecção (LD) obtidos para os carboidratos utilizando detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD). ---------- 103

Tabela 11. Concentrações de glicose e frutose encontradas em refrigerantes à base de cola.103

RESUMO

Este trabalho descreve a preparação, a caracterização e o uso de um biossensor bienzimático confeccionado com as enzimas glicose oxidase e frutose dehidrogenase imobilizadas em camadas auto-organizadas ou *self-assembled monolayers (SAMs)* de cistamina para a quantificação de açúcares em alimentos.

Após o preparo do eletrodo de ouro com a SAM de cistamina, biossensores foram construídos e para obtenção de melhores respostas, condições foram otimizadas, tais como: concentração do mediador tetratiafulvaleno (TTF), porcentagem de glutaraldeído, temperatura e tempo de vida do biossensor.

Com as condições estabelecidas, fez-se então, a determinação analítica da D-glicose e da D-frutose em eletrólito puro pelo método da adição de padrão e os resultados foram obtidos por voltametria cíclica e cronoamperometria. A corrente de pico de oxidação do mediador de elétrons (TTF) aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração e não ocorreram deslocamentos nos potenciais de pico. Os limites de detecção (LD) foram encontrados por meio do desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas do branco no potencial equivalente aos dos picos de oxidação do mediador de elétrons TTF, juntamente com o valor do coeficiente angular da curva analítica. Após a obtenção da curva analítica o biossensor foi aplicado diretamente em amostras de refrigerante dietético e não dietético, bem como em amostras de adoçantes comerciais, onde foram realizados testes comparativos da resposta dos biossensores.

Para o eletrólito puro e amostras de refrigerante dietético e de adoçantes, ou seja, onde não há presença de D-glicose e D-frutose, notou-se a ausência de corrente de pico,

enquanto que para as amostras de refrigerante não dietético, houve um valor significativo de resposta de corrente, indicando a presença dos açúcares em estudo.

Com o propósito de verificar a influência de interferentes e o efeito de matriz, foi construída uma curva analítica para a D-glicose e para a D-frutose, em amostras de refrigerante dietético e adoçantes, onde foram obtidas as menores quantidade destes açúcares. Para o refrigerante não dietético, foi determinado o valor inicial dos açúcares presentes nas amostras.

Pode-se afirmar que a utilização dos biossensores baseados nas enzimas GOx e FDH mostraram-se eficientes para a determinação dos açúcares D-glicose e D-frutose nas amostras analisadas (com diferença significativa nos valores de corrente), apresentando uma resposta rápida, além da eliminação do efeito da matriz.

A utilização do mediador de elétrons (TTF) possibilitou a reação em potencial próximo de zero, diminuindo o efeito de interferentes e evitando a desnaturação das enzimas.

Palavras-chave: glicose oxidase, frutose dehidrogenase, camadas auto-organizadas, biossensor, açúcares, enzimas

ABSTRACT

This work describes the preparation, characterization and application of a bienzymatic biosensor based in the glucose oxidaze and fructose dehydrogenase immobilized on self-assembled monolayer of cystamine for sugar quantification in foodstuff.

After the modification of the gold electrode with cystamine, the biosensors were developed and optimized for best responses. Optimization parameters were: mediator tetrathiafulvalene (TTF) concentration, glutaraldehyde percentage, temperature and life time of the biosensor.

With the best conditions established, the analytical determinations of d-glucose and d-fructose in pure phosphate buffer were conducted by the standard additions method and the results obtained by cyclic voltammetry and chronoamperometry. The oxidation peak current related to the TTF voltammetric behavior raised proportionally to the increasing concentration of d-glucose or d-fructose, in a given and constant peak potential. The methodology detection limits were found using the standard deviation of ten chronoamperograms of the blank solution, in the potential value corresponding to that of TTF oxidation, and the slope of the analytical curve. After the analytical curve acquirement the biosensor was directly applied in samples of diet or non-diet softdrinks, as well as in commercial sweeteners samples, with comparative tests of the biosensor responses.

For pure electrolyte and for diet foodstuff samples, i.e., were there is not expectation for d-glucose or d-fructose existence, it was detected the lack of the voltammetric peak associated with the mediator oxidation. In non-diet samples, a pronounced voltammetric peak was obtained, testifying the presence of sugar in the electrolytes under study.

The matrix effect was verified by means of an analytical curve obtained for both analytes (d-glucose and d-fructose), in diet and sweeteners samples, properly spiked with known amounts of each analyte.

It can be concluded that the utilization of the biosensor based in GOx and FDH showed to be efficient for d-glucose and d-fructose determinations in the analysed samples, with a fast response time and elimination of the matrix effect. The mediator promoted the electrochemical reaction to occur in potentials very close to zero, minimizing the interferences or the enzyme denaturation.

1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo inicial são abordados alguns trabalhos envolvendo o uso de monocamadas auto-organizadas ou *self-assembled monolayers* (SAMs) na construção de biossensores. Aspectos como confecção, propriedades e aplicação de biossensores destinam-se a mostrar a boa funcionalidade destes dispositivos, como tempo de vida, tempo de resposta, limites de detecção, dentre outros. Propriedades importantes envolvendo as enzimas glicose oxidase (GOx) e frutose dehidrogenase (FDH) para construção de biossensores são apresentadas de maneira que sejam mostradas suas características principais.

1.1 Considerações Gerais

A simplificação de uma metodologia analítica que permita um teste rápido, barato, e preferivelmente sem nenhum pré-tratamento da amostra a ser analisada, é ainda um grande desafio e continua sendo o foco de atenção de inúmeros trabalhos dentro da Química Analítica. Neste sentido, os sensores químicos têm um papel fundamental, uma vez que possuem elevada sensibilidade e são fáceis de produzir e utilizar. Dessa forma, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento na área de Química Analítica[1].

Buscando minimizar problemas encontrados com a utilização de sensores eletroquímicos, como a passivação gradual de sua superfície, que é conseqüência principalmente da adsorção dos produtos da própria reação redox utilizada na detecção, ou ainda, dos sub-produtos destas reações que podem se polimerizar e se depositar sobre a superfície dos eletrodos, surgem os eletrodos quimicamente modificados (EQM), os quais proporcionam uma variedade de efeitos atrativos, levando a superfícies com características

que podem diminuir muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais[1].

Dentro deste contexto, os biossensores se destacam devido à sua aplicação em um grande número de procedimentos analíticos e como sensores específicos que permitem a monitoração e o controle de processos bioquímicos[2].

1.2 Biossensores

A construção de biossensores tem sido uma alternativa na preparação de sensores seletivos que tem propiciado bons resultados na aplicação em análises de alimentos, clínicas e controle ambiental. Recentemente, o interesse no desenvolvimento de biossensores se dá pela versatilidade, simplicidade, seletividade, relativo baixo custo de construção para análise e detecção de compostos dos mais diversos interesses, potencial para miniaturização, facilidade de automação de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento *in situ* rápido. Estas características fazem dos biossensores dispositivos promissores para aplicações eletroanalíticas[3].

Um passo fundamental para o desenvolvimento de biossensores relaciona-se à maneira pela qual o derivado biológico é imobilizado na superfície do eletrodo. Existem alguns passos no processo de imobilização amplamente empregados como o uso de membranas lipídicas[4,5,6], Náfion[7], polímeros condutores[8], monocamadas auto-organizadas - "self-assembled monolayers" (SAMs)[9,10], matriz de sol-gel[11,12], dentre outros.

1.2.1 Aspectos e Definições dos Biossensores

A ciência dos biossensores é uma área multidisciplinar para a qual não existe uma forma de delineação. A rápida proliferação dos biossensores e sua diversidade podem justificar as várias formas de definição de um biossensor que se encontram na literatura.

Biossensores podem ser considerados um subgrupo dos sensores químicos e estes apresentam definição e classificação estabelecidas[13], por isso, de alguma forma, muitas das definições de biossensor propostas estão relacionadas com a de um sensor químico.

Uma característica dos biossensores que os diferencia dos sensores químicos é a especificidade da análise. As divisões de Química Analítica e Físico-Química da IUPAC propuseram uma definição para biossensor que, apesar de não ser ainda definitiva, é bastante representativa: "Um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica "específica", quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico o qual está em contato espacial direto com elemento de transdução"[14,15]. Então, da mesma forma que um sensor químico, um biossensor é formado de duas partes: o componente de reconhecimento, neste caso biológico e o transdutor. No caso do biossensor enzimático, o componente biológico faz o reconhecimento da substância procurada por meio de uma reação química, gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável tais como: corrente, potencial, variação de temperatura, etc. Diferentes componentes biológicos podem ser usados para construir biossensores, como: organismos, tecidos, células, organelas, membranas, enzimas, componentes de enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucléicos, moléculas orgânicas, dentre outros. Em princípio, qualquer componente biológico pode ser

combinado com algum transdutor adequado para produzir um biossensor operacional. Dessa forma, a definição de um biossensor evolui do conceito clássico de um eletrodo associado a uma biomolécula para uma variedade de métodos analíticos e dispositivos baseados em biocatálise[16,17].

Geralmente, os biossensores, assim como os sensores, podem ser classificados conforme a natureza do transdutor[14]: potenciométrico, amperométrico, condutométrico, piezolétrico, óptico ou térmico. Dentre estes, os potenciométricos e amperométricos têm sido os mais utilizados, uma vez que são mais rápidos, sensíveis e precisos.

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma função principalmente do componente biológico, por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores[18].

Um biossensor enzimático é composto de maneira geral de uma fase sensora (material biológico) que converte uma substância de interesse (analito) em outra, que possa ser monitorada por um sistema de transdução, como esquematizado na Figura 1. Dessa forma, imobiliza-se o material biológico em uma membrana adequada, acoplada à superfície do transdutor, e este monitora o desaparecimento de algum reagente ou a aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse.

A maior proporção de trabalhos reportados na literatura utilizando biossensores até o momento, indica sistemas que utilizam enzimas como material biológico[19-32]. Isto se deve ao fato destas biomoléculas catalisarem reações somente para um determinado substrato específico. Desta forma, o fundamento para sensores enzimáticos é a conversão do analito de interesse em um produto detectável.

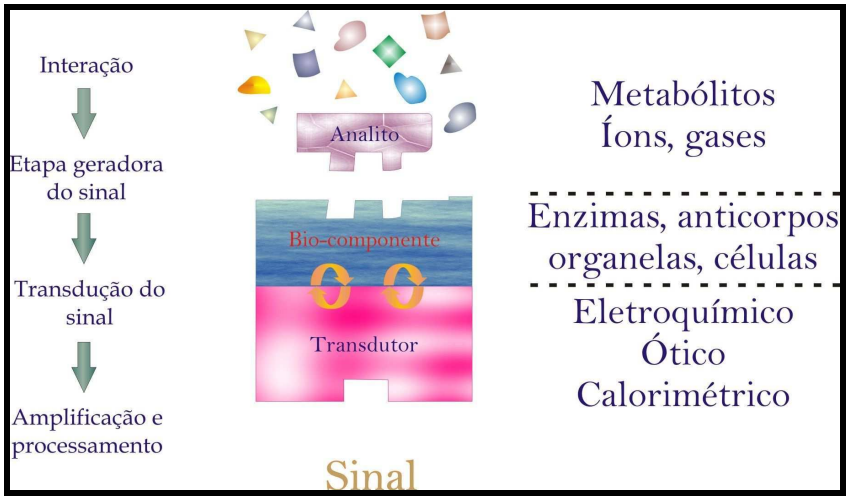

Figura 1. Esquema de funcionamento de um biossensor[33].

Quando um biossensor enzimático é imerso em solução, o substrato difunde-se para o interior da membrana, onde se encontra o material biológico imobilizado, o qual catalisa a reação, formando-se os produtos ou consumindo os reagentes, como apresentado na Equação (1)[34].

$$\text{Substrato} + \text{Reagente} \xrightarrow{\textit{MaterialBiológico}} \text{Produtos} \qquad (1)$$

1.2.2 Desenvolvimento dos Biossensores: Aspectos Históricos

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor para medidas de glicose no sangue, descrito por Clark e Lyons em 1962[35] (que constituiu da junção do sensor de oxigênio descrito por Clark, responsável pela transdução do sinal, com um biocatalizador, a glicose oxidase, o elemento sensível à glicose), iniciou-se uma corrida ao desenvolvimento dos mais variados tipos de sensores. Dessa forma, o primeiro biossensor consistia na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) entre duas membranas dispostas sobre um eletrodo de Clark (Figura 2A). O analito (glicose) e o oxigênio podem atravessar a primeira membrana para reagir com a enzima. Depois, o oxigênio remanescente pode penetrar na segunda membrana e difundir

até o eletrodo (Figura 2B). Uma diferença de potencial de -0,7 V é aplicada entre o cátodo de platina e o ânodo de prata, favorecendo a redução do oxigênio sobre o cátodo de platina. A concentração de glicose será proporcional à diminuição da quantidade de oxigênio (uma vez que é consumido pela reação enzimática), monitorada pela diminuição da corrente de redução.

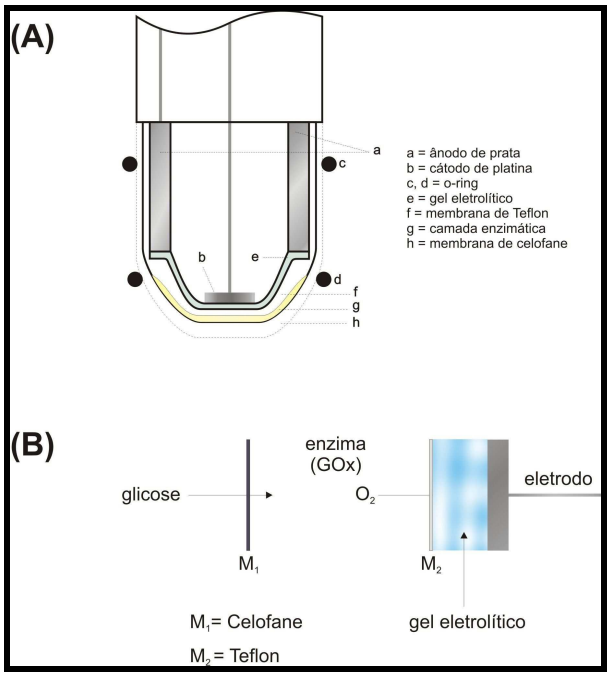

Figura 2. Esquema da montagem (A) e representação esquemática do funcionamento (B) do biossensor de glicose desenvolvido por Clark e Lyons[18]

O elemento de reconhecimento molecular utilizado é a enzima glicose oxidase, a qual catalisa a oxidação de β-D-glicose pelo oxigênio molecular, produzindo gluconolactona e peróxido de hidrogênio. Durante o processo de oxidação da glicose, o cofator flavina adenina dinucleotídio (FAD) é reduzido a $FADH_2$ seguida pela oxidação do cofator enzimático pelo oxigênio molecular, com a formação de H_2O_2. O H_2O_2 difunde através da membrana interna, para a superfície do eletrodo, onde é oxidado para formar O_2. Como há presença de glicose no sangue, esta é oxidada pela GOx que está imobilizada no sensor.

A reação ocorre como mostrado nas reações abaixo:

$$\beta - D - glicose + GOx(FAD) \rightarrow gliconolactona + GOx(FADH_2) \quad (2)$$

$$GOx(FADH_2) + O_2 \rightarrow GOx(FAD) + H_2O_2 \quad (3)$$

Em 1967 Updike e Hicks[36] retomaram a idéia do biossensor amperométrico, melhorando o sensor de Clark e Lyons, fazendo a troca do suporte de imobilização por gel de poliacrilamida com a enzima imobilizada por aprisionamento.

O primeiro eletrodo enzimático potenciométrico veio logo em seguida (1969) para a determinação de uréia[37], fazendo-se a imobilização de urease em uma matriz apropriada e acoplada a um eletrodo de vidro sensível a cátions amônio.

A partir desses três sensores com transdutores elétricos, abriu-se um campo vasto para a pesquisa dos mais variados biossensores aplicados em medicina, química ambiental, na pesquisa da química em geral e na indústria. Em termos de popularização dos biossensores pode-se destacar aqueles comercializados para medida de glicose, empregando a glicose oxidase imobilizada em tiras descartáveis, conhecidos como glicosímetros. O funcionamento de um glicosímetro consiste em um eletrodo de trabalho constituído por três camadas. A camada externa é um filme de policarbonato que é permeável à glicose, mas impermeável a proteínas e outros constituintes do sangue; a camada intermediária é constituída de uma enzima imobilizada, a GOx; a camada interna é uma membrana de acetato de celulose que é permeável a moléculas pequenas, tais como peróxido de hidrogênio. Quando este dispositivo é imerso em uma solução contendo glicose, esta se difunde através da membrana externa para a enzima imobilizada onde ocorre a reação, formando ácido glicônico e H_2O_2. A caneta medidora de glicose é um exemplo interessante e prático em termos de sensores existentes e comercializados para determinação de glicose em pessoas diabéticas, pois permite o automonitoramento de glicose no sangue em 30 segundos, com baixo custo. Este sensor

possui uma ponta trocável com glicose oxidase imobilizada que é utilizada para receber uma gota de sangue da pessoa e a concentração de glicose é lida diretamente em um visor digital na outra extremidade da caneta[34].

1.2.3 Classificação dos Biossensores

O acoplamento eletrônico entre o material biológico e o eletrodo nos biossensores pode ser realizado por meio de diferentes mecanismos. Dependendo do mecanismo utilizado na transferência de elétrons, os biossensores podem ser classificados em três grupos: de primeira, de segunda e de terceira geração.

1.2.3.1 Biossensores de Primeira Geração: O Eletrodo de Oxigênio

Quando o acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo é baseado na eletroatividade do substrato da enzima ou no produto gerado da reação enzimática, como pode ser visto na Figura 3 (A), tem-se um biossensor de primeira geração, onde o sinal amperométrico é produzido pela oxidação ou redução do substrato sobre a superfície do eletrodo. Várias enzimas, dentre elas a enzima glicose oxidase (GOx), foram utilizadas nesta classe de biossensores, monitorando-se o consumo de O_2 ou a produção de H_2O_2. O biossensor de glicose descrito por Clark e Lyons é um sensor de primeira geração, uma vez que o sinal amperométrico é gerado pela redução do O_2. Este método apresenta uma série de desvantagens, tais como: o nível de O_2 do meio onde o sensor opera deve ser cuidadosamente controlado, de outro modo, a resposta do eletrodo à diminuição de O_2 não será proporcional à concentração de glicose.

Os sensores baseados na detecção amperométrica do H_2O_2 gerado na reação enzimática também são de primeira geração. Essa detecção pode ser feita ajustando o potencial do eletrodo a +0,65 V e medindo a corrente de oxidação do H_2O_2.

Este tipo de configuração também apresenta problemas de interferentes, uma vez que, devido ao elevado potencial de trabalho (+0,65 V) podem-se oxidar, diretamente sobre o eletrodo, outras espécies presentes na solução. Além disso, o sinal final também é dependente da concentração de O_2 no meio de trabalho[33].

1.2.3.2 Biossensores de Segunda Geração: Mediadores Artificiais

Quando a eletroatividade é medida pelo auxílio de mediadores livre em solução ou imobilizado juntamente com a enzima, tem-se um biossensor de segunda geração, mostrado na Figura 3 (B). O mediador tem a finalidade de diminuir o potencial de detecção, de modo a reduzir a interferência causada por outros compostos que possam se oxidar diretamente sobre o eletrodo.

1.2.3.3 Biossensores de Terceira Geração: Transferência Direta de Elétrons

Nesta classe de biossensores existe a transferência direta de elétrons entre a superfície do eletrodo (transdutor) e o centro ativo da enzima, evitando etapas intermediárias, visto no Figura 3 (C).

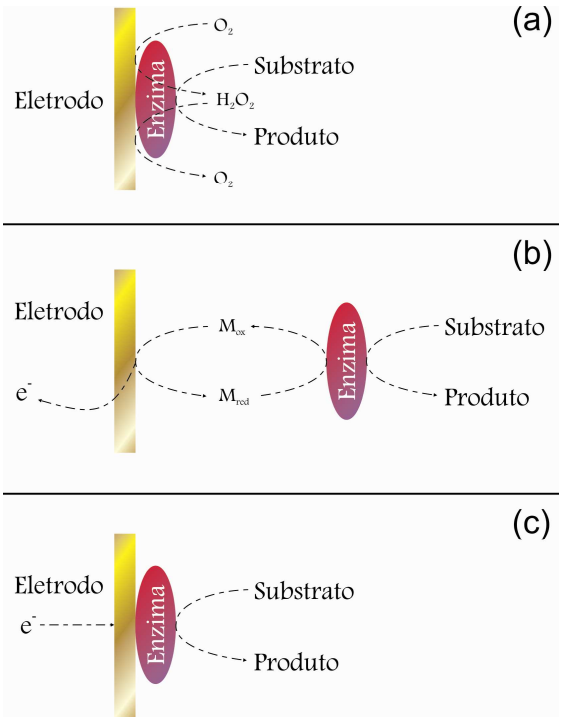

Figura 3. Representação dos diferentes funcionamentos de um biossensor.

Para permitir a transferência direta de elétrons entre a proteína e o eletrodo, a distância entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo deve ser a de maior aproximação. A transferência direta só é possível quando as moléculas de enzima formam uma monocamada sobre o eletrodo. O grande inconveniente é que as enzimas tendem a desnaturar quando em contato com o eletrodo, levando ao envenenamento do mesmo. Uma alternativa para prevenir a desnaturação da enzima é a modificação da superfície onde esta se adsorverá, promovendo uma imobilização com orientação preferencial da enzima. Quando essa orientação ocorre com o centro ativo dirigido à solução, portanto disponível, pode-se incrementar drasticamente a corrente, uma vez que todas as biomoléculas podem contribuir com o sinal, enquanto que no caso de moléculas adsorvidas de maneira não-específica algumas poucas contribuirão.

São vários os métodos de modificação da superfície eletródica para promover uma imobilização adequada do material biológico[38] garantindo assim, a funcionalidade do biossensor, com um tempo de vida maior. A seguir são apresentados a importância da escolha

do material biológico e os meios utilizados para a ancoragem das biomoléculas para a construção dos biossensores.

1.2.4 Escolha do Material Biológico

A escolha do material biológico é a primeira etapa para a confecção de biossensores. O elemento biológico deverá reagir seletivamente com o analito a ser determinado[34].

O sistema de reconhecimento biológico transforma as informações do domínio bioquímico, gerando sinais químicos ou físicos com sensibilidade definida. O principal propósito deste sistema é permitir ao sensor um elevado grau de seletividade para uma determinada espécie de interesse analítico. Os elementos biológicos mais regularmente empregados são as enzimas, que podem ser utilizadas na sua forma purificada, estarem presentes em microorganismos ou em porções de tecido animal ou vegetal. As enzimas são catalisadores biológicos usados em reações com um substrato específico, com maior reversibilidade do complexo enzima-substrato formado. Os anticorpos são a segunda classe de elementos biológicos mais utilizados no desenvolvimento de biossensores. Porém, seu modo de ação é diferente daquele encontrado nas enzimas, pois eles se ligam especificadamente e mais fortemente com o antígeno específico, mas, na maioria das vezes, sem nenhum efeito catalítico. Por este motivo, são capazes de proporcionar alta sensibilidade para seus biossensores. Os ácidos nucléicos também são utilizados como elementos de reconhecimento, mas em menor freqüência, por serem difíceis de isolar. Eles podem operar seletivamente devido às características dos pares de bases nitrogenadas. E, bem menos utilizados, existem os chamados receptores, que são proteínas que se situam na membrana plasmática de bicamadas lipídicas e possuem propriedades específicas de reconhecimento. Alguns materiais abióticos

são atualmente classificados como elementos de reconhecimento, pois possuem a capacidade de mimetizar os sistemas biológicos molecularmente[39]

As vantagens e desvantagens de cada elemento de reconhecimento estão melhores descritas na Tabela 1[18,40].

Tabela 1. Características relevantes dos materiais utilizados como elemento de reconhecimento na construção de biossensores[18].

Elemento de Reconhecimento	***Vantagens***	***Desvantagens***
Enzimas	-formam complexos estáveis com a espécie de interesse -são bastante seletivas -possuem resposta rápida	-podem perder a atividade após imobilização -são estáveis por um período relativamente curto de tempo
Anticorpos	-são altamente seletivos -são bastante sensíveis -a ligação com o anticorpo é muito estável	-não possuem efeito catalítico -o imunocomplexo antígeno-anticorpo formado é irreversível na maioria das vezes
Ácidos Nucléicos	-são bastante específicos	-por gerarem baixa corrente, na maioria das vezes, há necessidade do uso de marcadores
Receptores	-muito utilizados em análises específicas	-biossensores difíceis de construir -possuem custo muito elevado -são difíceis de isolar

1.2.5 Formas Usuais para imobilização de Biomoléculas em Substratos Sólidos para Confecção de Biossensores

Para permitir a construção e o uso contínuo de biossensores mais sensíveis, robustos e de maior confiabilidade, é essencial uma incorporação estável dos elementos de reconhecimento com uma comunicação direta entre biomoléculas e a superfície do eletrodo[41,42], e esta tem sido uma etapa crítica no desenvolvimento destes dispositivos analíticos. Isso porque os biocomponentes, quando imobilizados, precisam reter a maior parte de sua atividade biológica, para que o biossensor possa apresentar sensibilidade significativa

para o composto alvo. Existem várias técnicas para a imobilização das biomoléculas, porém as mais comuns são a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, o encapsulamento em géis ou membranas e a adsorção física. Todos esses métodos possuem numerosas variantes e se faz necessário selecionar o método mais apropriado para cada caso em particular, considerando-se o tipo de aplicação que será realizada e o transdutor utilizado.

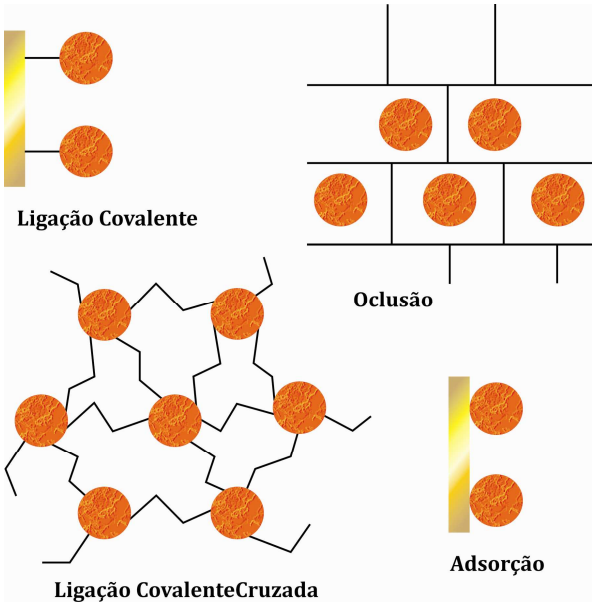

Figura 4. Esquema dos principais métodos de imobilização do elemento biológico[40].

As formas mais comuns de imobilização de enzimas podem ser descritas como:

- **Ligação covalente:** este tipo de imobilização é realizado por ligações de grupos funcionais não ativos das biomoléculas (não essencial para sua atividade catalítica) e grupos reativos (hidroxila, carboxila, amino, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel. O ataque covalente geralmente envolve três etapas: (i) a ativação da superfície do sensor, (ii) o acoplamento do elemento de reconhecimento e (iii) remoção das moléculas fracamente ligadas. Este método resulta em elevado tempo de vida do biossensor devido ao fato de que não se produz perda da biomolécula durante a sua utilização; por outro lado, a modificação de enzimas, por exemplo, pode levar a uma queda na atividade catalítica da mesma. Dessa

forma, é importante que os sítios ativos nas biomoléculas não sejam afetados pelo processo de imobilização, para que não se perca sua atividade.

- **Ligação covalente cruzada:** esta imobilização baseia-se também na formação de ligações químicas cruzadas entre os grupos amino do suporte com os grupos amino das biomoléculas, empregando-se reagentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído; 2-isocianato-4-isotiocianato tolueno; 2,4, biscloreto sulfonil fenol; etc.). Porém, apesar de ser um método bastante simples, nem sempre é fácil controlar as condições experimentais e a integridade do elemento biológico pode não ser totalmente controlada.

- **Oclusão em gel:** este método consiste no confinamento do material biológico na grade de uma matriz polimérica (agar, poliacrilamida, álcool polivinílico) ou em membranas semipermeáveis, usando condições moderadas. Neste processo uma ampla variedade de materiais pode ser avaliada e altas concentrações de biomoléculas ativas são imobilizadas. As matrizes mais comumente empregadas são as gelatinas, poliacrilamida, colágeno, triacetato de celulose, alginato e outros. Teoricamente este tipo de imobilização pode ser aplicado a qualquer biocomposto, porém podem ocorrer problemas relacionados à lixiviação dos elementos de reconhecimento para a solução devido aos diferentes tamanhos dos poros dos polímeros ou membranas, além de impedimentos estéricos para o substrato interagir com a biomolécula, quando os poros das matrizes são menores que as moléculas.

- **Microencapsulamento**: neste método, o biomaterial é confinado entre membranas. Uma configuração muito utilizada para a construção de biossensores enzimáticos amperométricos é imobilizar uma enzima (geralmente uma oxidase) sobre um eletrodo e entre duas membranas.

- **Adsorção física:** envolve a adsorção de enzimas em suportes insolúveis que resulta geralmente em interações de tipo iônica, polar, pontes de hidrogênio ou hidrofóbicas. Esses suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca iônica, bentonita, grafite, vidro, etc. A adsorção de biomoléculas é o método mais simples de preparação de biossensores, embora a união seja muito fraca, resultando na perda de material e tempos de vida muito curtos, pois as biomoléculas podem ser facilmente lixiviadas para a solução por fatores como variação da força iônica, solvente e pH do meio. Em geral, este tipo de procedimento de imobilização é raramente utilizado na construção de biossensores, devido ao fato de proporcionar aparatos poucos sensíveis[43].

Na Tabela 2 é mostrado um resumo de todos os tipos de imobilização tratados anteriormente, apresentando-se as vantagens e desvantagens dos métodos. Os procedimentos citados, apesar de serem os métodos de imobilização do elemento de reconhecimento mais amplamente empregados, são artifícios que normalmente produzem uma superfície altamente desorganizada, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo. Assim, cabe ressaltar novamente que somente uma pequena porcentagem das biomoléculas na superfície do eletrodo permanece ativa e mantém sua capacidade de interagir seletivamente com as moléculas do analito[44].

Tabela 2. Procedimentos de imobilização de biomoléculas na superfície de sensores[40].

Tipo de Imobilização	***Vantagens***	***Desvantagens***
Adsorção	-simples -realizados em condições brandas -menos destrutiva para o material biológico	-ligações das biomoléculas são dependentes do pH, solvente e temperatura -alta taxa de lixiviação para a solução, comprometendo a estabilidade do sistema
Ligação Covalente	-complexo estável biomolécula-substrato -lixiviação das moléculas é minimizada -maior sensibilidade	-procedimentos mais laboriosos com consumo de tempo -possibilidade de perda da atividade biológica do material
Ligação Covalente Cruzada	-procedimentos simples -forte ligação química das moléculas	-dificuldade de controle da reação -pode ocorrer falta de rigidez da superfície
Oclusão	-podem ser utilizados diversos materiais -preservação da atividade biológica	-o efeito do tamanho dos poros dos materiais pode comprometer a adsorção, havendo lixiviação

1.2.6 Desempenho Analítico dos Biossensores

Para garantir uma boa funcionalidade em análises químicas, o biossensor deve possuir algumas propriedades, tais como[34]:

- **Excelente estabilidade:** está diretamente relacionada com o tipo de imobilização da camada do material biológico.

- **Bom tempo de resposta:** para se obter uma resposta o substrato deve: (1) se difundir do seio da solução até a superfície do biossensor; (2) difundir através da membrana externa e reagir com o sítio ativo do material biológico (3) os produtos formados devem difundir-se até a base do sensor para serem detectados. Dessa forma, o tempo de resposta de um biossensor geralmente é controlado pela espessura da camada do material biológico imobilizado.O tempo de resposta de um biossensor pode ser afetado por vários fatores, como: pH da solução,

concentração do substrato, disponibilidade de cofatores, ativadores e inibidores enzimáticos, temperatura, tempo de resposta do transdutor, dentre outros.

- **Boa seletividade e exatidão**: a seletividade de um biossensor será tanto maior quanto menor for o efeito dos interferentes. As interferências são devidas a duas categorias: (a) interferência na reação do biocatalisador e (b) interferência no transdutor.

Para conseguir um biossensor com as propriedades mencionadas acima, diversos parâmetros devem ser otimizados, tais como: pH de trabalho, solução tampão, concentração do material biológico imobilizado, espessura e tipo de imobilização da camada biológica, temperatura, inibidores e interferentes.

1.2.7 Mediadores

O reconhecimento molecular se dá por meio da catálise enzimática na superfície do sensor, que promove a ocorrência de reações não eletródicas no sítio ativo da enzima, liberando ou consumindo substâncias eletroativas na superfície do eletrodo. A resposta analítica do biossensor ou é proveniente da medição eletroquímica destas espécies eletroativas, cuja concentração é função da concentração da espécie de interesse, ou sinal de oxidação (ou redução) direta do sítio ativo da enzima a seu estado fundamental. Como os sítios ativos de diversas enzimas oxidorredutases são situados muito internamente em suas estruturas tridimensionais, tais enzimas não podem entrar em contato elétrico direto com a camada inerte do sensor, mesmo estando em contato físico com esta camada. Este contato elétrico pode ser estabelecido por meio de mediadores de elétrons.

O papel do mediador é estabelecer uma espécie de contato elétrico entre o sítio ativo da enzima e a camada inerte do sensor, por meio do seguinte mecanismo: o mediador sofre um processo redox no sítio ativo da enzima, reconduzindo-a a seu estado fundamental, para

em seguida sofrer um processo redox inverso na superfície do eletrodo, sendo também reconduzido a seu estado fundamental, completando um ciclo que restaura a enzima e o mediador.

O mediador se comporta como uma espécie de mensageiro "que conta ao eletrodo inerte" o que se passou no interior da enzima.

Assim, o uso de mediadores tem sido de extrema importância para viabilizar ou otimizar o desenvolvimento de diversos biossensores. E mais, a dopagem do eletrodo com mediadores de elétrons, é um recurso amplamente usado para aumentar a seletividade em biossensores amperométricos, uma vez que a presença do mediador possibilita um potencial de trabalho numa região mais próxima a zero volts, mais imune a interferências de outras espécies eletroativas[45,34].

Sendo assim, mediadores artificiais são utilizados para substituir os co-substratos naturais no processo de transferência de elétrons, com a finalidade de evitar a dependência com o O_2 (pode-se trabalhar em meios anaeróbicos) e diminuir o potencial de detecção, de modo a reduzir a interferência causada por outros compostos que possam oxidar-se diretamente sobre o eletrodo.

Para serem utilizados como mediadores redox, os compostos devem possuir as seguintes características[33]:

- Reagir rapidamente com a enzima;
- Apresentar cinética de transferência de elétrons reversível;
- Baixo potencial de regeneração;
- Propriedades eletroquímicas independentes do pH;
- Ser estável tanto na forma oxidada como na reduzida;
- Não reagir com oxigênio;

- Não ser tóxico.

1.2.8 Uma Alternativa Atual para a construção de Biossensores – As Camadas Automontadas (Self-Assembled Monolayers – SAMs)

Atualmente, se buscam soluções para minimizar problemas geralmente encontrados com a utilização de eletrodos sólidos como: a passivação da superfície eletródica, podendo assim, aumentar a aplicabilidade e eficiência dos sensores eletroquímicos. Nesta direção, uma alternativa que vem sendo estudada recentemente é a modificação dos eletrodos com a formação de SAM[46,47,48]. Uma variedade de materiais (por exemplo, superfícies de Pt, Au, Ag, Cu etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis etc.) tem sido empregada na confecção de sistemas organizados[49].

Estudos experimentais, suportados pela teoria, têm mostrado que a velocidade de transferência de elétrons pode ser sensivelmente afetada em função da modificação da superfície dos eletrodos. A classificação das reações do eletrodo pode ser feita com base no grau de interação entre os reagentes e a superfície do eletrodo, ocorrida durante o estado de transição da transferência de elétrons. Os processos de transferência de elétrons onde as interações entre as espécies reagentes e a superfície do eletrodo são fracas e não específicas, geralmente são definidos como sobreposições fracas. Neste caso, a energia livre de ativação para a transferência de elétrons não é afetada pela proximidade das espécies eletroativas e o eletrodo. Em contraste, sobreposições fortes nos processos de transferência de elétrons envolvem interações fortes entre os centros de reação. Estas interações são extremamente importantes para reduzir a energia de ativação e, assim, determinar a cinética de transferência eletrônica[50].

Muitos processos eletroquímicos pertencem a esta última classe, e suas velocidades de transferência de elétrons podem ser significativamente afetadas e controladas alterando-se as superfícies dos eletrodos, isto é, modificando-as. Assim, muitos esforços têm sido direcionados para desenvolver diferentes abordagens de modificação das superfícies dos eletrodos.

Existem muitos métodos para formar camadas funcionais finas sobre estas superfícies. A utilização de polímeros é um exemplo, e tem sido muito utilizado[50,51,52]. Contudo, as estruturas dos polímeros geralmente apresentam uma grande variação em suas massas molares, desse modo, é difícil realizar o controle das funções e das propriedades da camada modificadora em nível molecular. Além disso, é praticamente impossível discutir quantitativamente o mecanismo de transferência de elétrons e suas propriedades. Estruturas mais ordenadas podem ser melhor controladas se a superfície for modificada por deposição seqüencial de monocamadas de moléculas funcionais. Neste caso, é muito mais fácil discutir a relação entre a estrutura e a função da superfície modificada[50].

A formação de monocamadas espontaneamente adsorvidas, ou SAM, de tióis sobre superfície metálica constitui um método bastante interessante de obtenção de uma superfície com alto grau de ordenação controlada quimicamente[53,54]. Dessa forma, uma alternativa que tem sido bastante estudada, nas últimas décadas, para a imobilização de diferentes moléculas sobre um substrato sólido, envolve a formação das SAM[55-58]. Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como conseqüência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras. Enquanto que a adsorção deste tipo de molécula é um resultado da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato, a força motriz para a organização

origina-se a partir de interações hidrofóbicas (por exemplo, do tipo Van der Waals) das cadeias longas ligadas ao grupo funcional. Uma variedade de materiais (por exemplo, superfícies de Pt, Au, Ag, Cu etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis etc.) tem sido empregada na confecção de sistemas organizados.

Os tióis apresentam uma forte afinidade com os metais de transição[59]. Isto se deve, provavelmente, à possibilidade desses compostos formarem múltiplas ligações com a superfície metálica[60]. Experimentalmente, observa-se que essas interações existentes entre o adsorbato e o substrato são bastante fortes. Sabe-se que estes compostos formam ligações bastante estáveis com superfícies como Au[53], Ag[61], Cu[62], Pt[63].

Existem basicamente três abordagens por meio das quais as SAMs têm sido desenvolvidas e aplicadas em eletroquímica. Elas são classificadas de acordo com o mecanismo de fixação da monocamada sobre superfícies sólidas. As SAMs podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de fixação da monocamada sobre o eletrodo sólido[50]. O primeiro tipo de SAM fixado sobre eletrodos sólidos foi descrito por Maoz *et al.*[64], que realizou a formação de monocamadas organizadas via o processo de silanização[65,66]. Os autores demonstraram que alquiltriclorosilanos sobre superfícies polares (por exemplo, possuindo grupos hidroxilas) levavam à formação de monocamadas organizadas quimicamente ligadas à superfície. A silanização tem sido largamente usada como um meio de modificação de superfícies de eletrodos[67].

O segundo método para a confecção de SAM é por meio da técnica de Langmuir-Blodgett (LB)[68] e envolve a formação de membranas lipídicas sobre os eletrodos sólidos, ou seja, utiliza moléculas como ácidos graxos, quais são dissolvidos em solvente orgânico volátil apropriado e dispersas sobre a superfície da água contida em uma cuba, denominada cuba de Langmuir, e com a compressão do filme formado, as moléculas tomam a conformação mais

estável, ou seja, a porção hidrofílica interage com a superfície da água e sua parte hidrofóbica é projetada acima, as moléculas são pressionadas horizontalmente até a formação de uma camada, que apresenta uma espessura igual ao comprimento da molécula dispersa[67]. A adsorção, neste caso, é geralmente fraca e a organização das moléculas é estabilizada devido a forças intermoleculares[50].

A terceira categoria de monocamadas auto-organizadas e a usada neste trabalho, utiliza a adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre superfícies metálicas[69,70], sendo que os sistemas mais comumente usados têm sido os tióis sobre superfícies de ouro[53], devido à estabilidade da ligação RS-Au, resultando na obtenção de uma estrutura molecular ordenada, especificadamente orientada. Adicionalmente, a capacidade do uso de tióis com diferentes grupos funcionais torna possível o desenvolvimento de superfícies com propriedades e funções distintas, viabilizando interações quase específicas entre a superfície eletródica e o material biológico, com alto grau de controle sobre sua arquitetura molecular[50]. Um emparelhamento perfeito entre os alcanotióis (geralmente com uma inclinação de 20 a 30 graus em relação à normal da superfície) e o retículo do ouro resulta numa estrutura altamente ordenada, como mostra a Figura 5, e tem feito deste sistema objeto de um grande número de estudos por meios espectroscópicos, microscópicos e eletroquímicos[50].

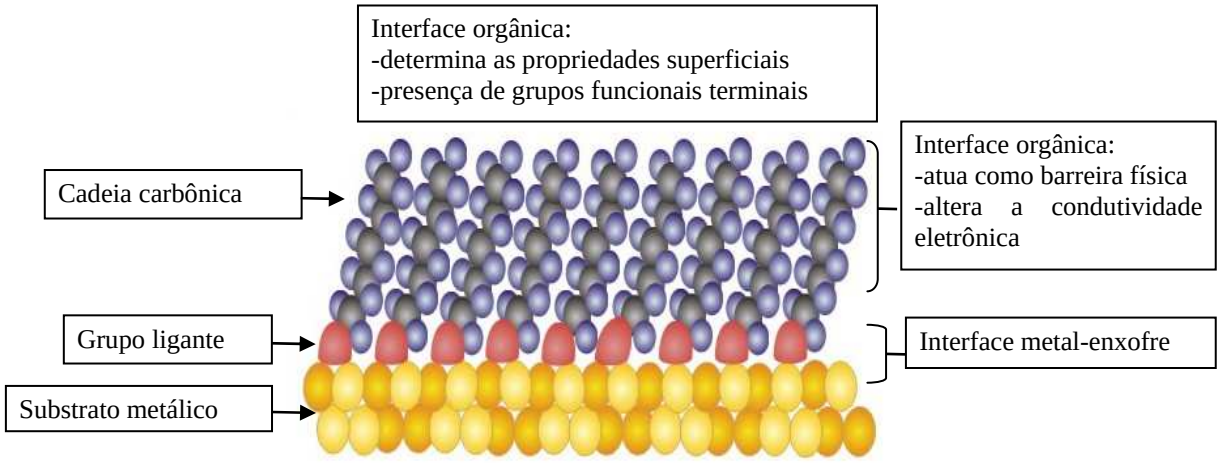

Figura 5. Esquema do emparelhamento entre os alcanotióis e o retículo do ouro numa camada auto-organizada. Átomos de enxofre representados em amarelo e átomos de ouro representados em dourado.

Essas características têm levado a um uso extensivo de eletrodos modificados com esta última abordagem de formação de SAMs, incluindo estudos fundamentais da interação de proteínas com superfícies metálicas, no contato elétrico direto entre proteínas redox e eletrodos, bem como na fabricação de biossensores enzimáticos[46]. Além disto, a dimensão da monocamada, que se situa em escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies eletroativas para a superfície, principalmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos ou por compósitos. As SAMs, ainda, reduzem as correntes capacitivas e, também, a acumulação de espécies indesejadas sobre a superfície do eletrodo, evitando assim a passivação da superfície do eletrodo.

Entretanto, a preparação da monocamada exerce um papel fundamental no desempenho do eletrodo modificado. A estrutura da monocamada depende fortemente do substrato e de sua morfologia, da natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas do adsorbato. Considerando-se que a espessura final da monocamada é de dimensão molecular e que, em muitos casos, o substrato não é atomicamente plano sobre toda a superfície do eletrodo, a existência de defeitos na monocamada é inevitável. Tais defeitos

podem ter um efeito pronunciado no comportamento eletroquímico do eletrodo, que se pode assemelhar a um arranjo de ultramicroeletrodos. Assim, o pré-tratamento das superfícies dos eletrodos é um pré-requisito importante antes da montagem da monocamada. Uma grande variedade de procedimentos têm sido reportados e incluem tratamentos térmicos e químicos, ou ainda pré-tratamentos eletroquímicos, todos objetivando produzir superfícies limpas, homogêneas, relativamente planas e reprodutivas[50]. Quanto à formação de monocamadas, na maior parte dos casos, é aceito que o acoplamento do adsorbato é uma etapa relativamente rápida, que é seguida por um processo de organização muito mais lento. Estas etapas são usualmente realizadas em solventes orgânicos e a temperatura ambiente, por períodos de tempo que variam desde poucos minutos até muitos dias[50].

A caracterização da organização final da monocamada pode ser examinada empregando-se diferentes técnicas macroscópicas e microscópicas de superfície, principalmente espectroscópicas (espectroscopia de infravermelho, raios-X), microscopia e eletroquímicas (voltametria, impedância etc.). Estes métodos podem fornecer muitas informações detalhadas sobre a interface eletrodo-monocamada e também sobre a estrutura e orientação das monocamadas[50].

Devido às vantagens apresentadas pela modificação de eletrodos sólidos por meio de SAM, é crescente a aplicação destes eletrodos em eletroanalítica para a determinação de compostos de interesse[71-77]. Um dos primeiros exemplos da utilização de eletrodos de ouro modificados com monocamadas auto-organizadas para o reconhecimento seletivo de íons metálicos foi descrito por Rubinstein *et al.*[78]. Eles observaram que uma monocamada mista composta por 2,2'-tiobisetilacetoacetato (TBEA) e n-octadecil mercaptana (OM) sobre uma superfície de ouro reconhecia seletivamente Cu^{2+} na presença de outros íons, tais como Fe^{3+}. Esta seletividade foi obtida através de interações específicas entre os íons Cu^{2+} e o TBEA, ao

passo que o OM serviu essencialmente para bloquear a difusão de outras espécies indesejáveis. Num trabalho posterior, Rubinstein *et al.*[79] utilizaram no lugar da OM, outro agente bloqueador, o noctadecil triclorosilano (OTS). Este sistema produziu uma monocamada mais estável em relação àquela obtida empregando-se OM, tornando o sistema mais adequado para fins analíticos. Este eletrodo modificado possibilitou a determinação de Cu^{2+} (10^{-7} mol L^{-1}), Pb^{2+} (10^{-5} mol L^{-1}) e Zn^{2+} (10^{-9} mol L^{-1}, determinado por método indireto) com alta seletividade e mínima interferência de Fe^{3+}.

Tióis de cadeias carbônicas com tamanhos diferentes e contendo grupo terminal COOH foram usados por Mendes *et al.*[80] para formar monocamadas auto-organizadas sobre a superfície de eletrodos de ouro. A transferência de elétrons do par $Fe(CN)^{3-/4-}$ para o eletrodo foi estudada em diferentes pHs utilizando as técnicas de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica. Mudanças no pH da solução resultaram em variações na carga do grupo terminal das monocamadas auto-organizadas, e consequentemente, em alterações na interação eletrostática da SAM com as espécies eletroativas em solução.

Zerulla *et al.*[81] investigaram as propriedades de diferentes moléculas de tióis em superfícies de ouro, por meio de uma mistura contendo filmes de tiol, constituídos de duas espécies diferentes química e estruturalmente. Utilizaram a estrutura alifática do hexadecanetiol e o aromático 2-mercapto-benzotiazol (MBT). A interação de ambas as espécies depois de adsorvidas sucessivamente na superfície de ouro, foi investigada utilizando XPS. Os autores perceberam que o hexadecanetiol deslocou o MBT da superfície de ouro. A criação de filmes mistos teve início com a cobertura parcial de hexadecanetiol, seguida por MBT, com nova possibilidade de camadas organizadas.

Liu *et al.*[82] verificaram a formação de SAM por meio de nonopartículas de ouro sobre a superficie de nanotubos de carbono solubilizada por molécula bi-funcional (PHT) com terminação pirenil em uma das extremidades e com grupo tiol no final da outra extremidade. Enquanto a fluorescência do PHT foi moderadamente apagada pelos nanotubos de carbono, a fluorescência foi quase totalmente apagada pela nova estrutura de nanopartículas de ouro. O aumento das respostas das nanopartículas de ouro por Raman foi também observado. Estes resultados implicaram na transferência de carga entre nanotubos e nanopartículas de ouro.

Lin *et al.*[83] estudaram as interações existentes entre sistemas biológicos e superfícies modificadas quimicamente por misturas de alcanotióis de cadeias longas, tais como, $HS(CH_2)_{11}NH_2$ e $HS(CH_2)_{10}COOH$. A adição de trietilamina na solução do alcanotiol durante o processo de formação da SAM e a imersão dos eletrodos em uma solução de SAM com 10% CH_3COOH ou 1% HCl na solução etanólica foram os dois protocolos utilizados de preparação. Os ângulos de contato, isto é, a medida da interação entre uma superfície e um determinado líquido em relação as suas características hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, da mistura das SAMs com terminações $-NH_2$ e -COOH apresentaram valores intermediários comparados aos valores das SAMs formadas individualmente, indicando que não há diferenças na hidrofílicidade da superfície modificada. Análises de espectroscopia de foto elétrons excitados por raio-X (XPS), mostraram que as misturas eram mais ricas em grupos $–NH_2$, fato associado à adsorção preferencial da molécula com grupos terminais $–NH_2$ na competição adsortiva. Porém a adsorção de mais moléculas com grupo funcional $–NH_2$ provocou uma menor adesão do material biológico, implicando na incompatibilidade entre os materiais.

Bertotti *et al.*[84] prepararam e caracterizaram SAMs formadas pela adsorção de cistina (cistina-SAM) sobre a superfície de ouro. O efeito da transferência eletrônica por meio do

eletrodo modificado foi avaliado utilizando $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ como espécie redox em diferentes valores de pH, por meio de técnicas como a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica. As respostas obtidas no voltamograma reversível da superfície com cistina-SAMs, indicaram que a transferência eletrônica não foi afetada pelo bloqueio da superfície. As medidas de impedância mostraram que há uma dependência entre a transferência eletrônica e a protonação dos grupos ácidos e básicos da molécula de alcanotiol. Um aumento na resistência de 600 a 1700 Ω cm^2 devido às soluções com valores de pH entre 4,9 a 8,0, foi observado, este comportamento foi associado à repulsão entre os grupos negativamente carregados. Com as medidas de microbalança de cristal de quartzo foi possível calcular a área recoberta pela adsorção de $1x10^{-3}$ mol L^{-1} da solução de cistina na superfície do cristal, obtendo uma massa de 58 ng cm^{-2} correspondendo a $1,4x10^{14}$ moléculas/cm^2.

Chaki e Vijayamohanan[57] apontaram as seguintes vantagens na utilização de camadas automontadas para a imobilização de biomoléculas:

- São fáceis de serem formadas;
- Formam estruturas ordenadas;
- A versatilidade na variação, por meio de grupos funcionais diferentes, permite que se obtenham superfícies com características hidrofóbicas ou hidrofílicas e ainda permitindo reações de imobilização;
- Apresentam razoável estabilidade por um período longo de tempo, permitindo que sejam utilizadas para a realização de um grande número de medidas;
- Podem formar membranas que lembram ambientes celulares, tornando-se adequadas para a imobilização de biomoléculas;
- É necessária uma quantidade mínima de biomolécula para a imobilização na monocamada, diminuindo custos com reagentes.

Devido às características apresentadas pelas SAMs, estas estão sendo cada vez mais utilizadas para a construção de biossensores enzimáticos[85,86,87], pois um dos grandes desafios para a construção de biossensores mais sensíveis, robustos e de maior confiabilidade é a imobilização das biomoléculas sobre superfícies condutoras, em sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades biológicas de reconhecimento. Dessa forma, o método de construção de biossensores utilizando SAM é muito promissor, pois permite orientar as enzimas sobre a superfície do eletrodo sem desnaturação, além de viabilizar a transferência eletrônica direta das enzimas para a superfície dos eletrodos[88].

A utilização de SAM no desenvolvimento de biossensores apresenta potencialidade para aumentar o desempenho analítico dos três diferentes tipos de biossensores (primeira, segunda e terceira geração). A sensibilidade dos biossensores de primeira geração pode ser muito incrementada, pois este método de imobilização possui um efeito positivo na densidade, ambiente e disposição dos elementos biologicamente ativos. Estas características estão evidenciadas na Figura 6, que mostra esquematicamente a imobilização de uma biomolécula sobre a superfície de um eletrodo através dos métodos de adsorção, encapsulamento por ligação cruzada e por SAM. Este tipo de biossensor tem sido muito empregado na determinação, principalmente, de glicose[50,89,90].

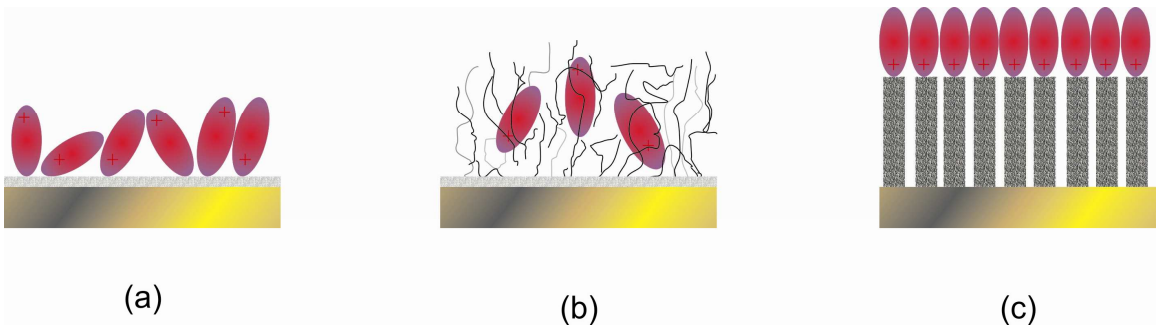

Figura 6. Representação esquemática dos processos de imobilização de biomoléculas por adsorção física (a), encapsulamento por ligação cruzada (b) e acoplamento orientado por monocamadas auto-organizadas (c)[50].

Em relação aos biossensores de segunda geração, monocamadas contendo grupos eletroativos (mediador) fornecem uma possibilidade para estudar a transferência eletrônica a "longa distância" via o contato elétrico entre o elemento biocatalítico, o mediador e a superfície do eletrodo, conforme é exemplificado na Figura 7, onde o grupo viologênio foi utilizado como mediador eletrônico após a funcionalização de um composto tiol[50].

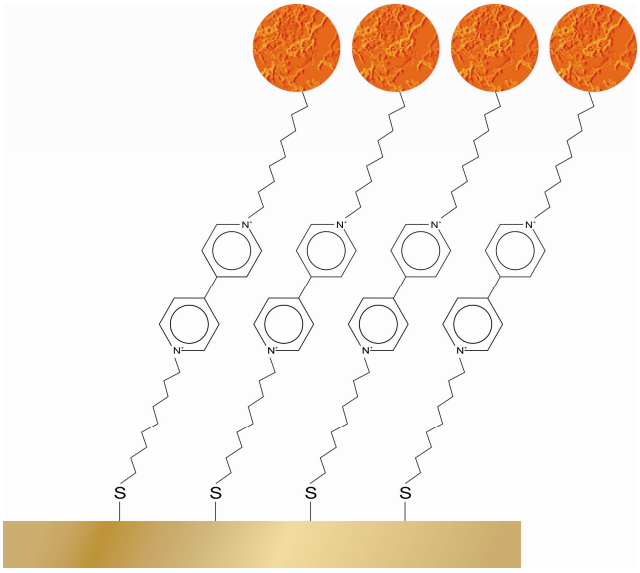

Figura 7. Representação esquemática de uma monocamada auto-organizada de tióis funcionalizados com o grupo viologênio sobre um eletrodo de ouro.

Um dos maiores desafios para a obtenção de biossensores de segunda geração baseados em monocamadas auto-organizadas está justamente na obtenção de uma completa integração entre eletrodo, mediador e enzima[50]. O contato elétrico entre a proteína redox e o eletrodo pode ser obtido pela ligação covalente do mediador à estrutura da enzima. Katz *et al.*[91], confeccionaram um eletrodo enzimático baseado na enzima glutationa redutase acoplada a uma SAM de um ácido carboxílico sobre eletrodo de ouro, o contato elétrico entre a enzima e o eletrodo foi estabelecido através da ligação covalente do N-metil- N'-carboxialquil-4,4-bipiridínio à estrutura da enzima. O eletrodo resultante eletrocatalisou a redução da glutationa oxidada. Foi observado que a velocidade de formação do produto

aumentava à medida que o tamanho da cadeia ligada aos grupos bipiridínios aumentava, sendo este comportamento atribuído à melhora na comunicação elétrica com o sítio ativo da enzima[92].

Um pré-requisito fundamental para o desenvolvimento de biossensores de terceira geração é o controle do processo de transferência de elétrons entre o sistema biocatalítico de reconhecimento e a superfície dos eletrodos. Esta transferência eletrônica depende, dentre vários fatores, da natureza do elemento biológico (somente um grupo reduzido de enzimas e proteínas apresenta esta propriedade) e da distância e orientação do centro de óxido-redução em relação à superfície do eletrodo. A imobilização empregando-se SAM permite um maior controle sobre estas duas últimas variáveis, facilitando a confecção deste tipo de sensor[50].

Em função das vantagens apresentadas pela modificação de eletrodos sólidos por meio de SAM, é crescente dentro da comunidade científica, a aplicação destes eletrodos para a determinação de diversos compostos, fato comprovado pela quantidade crescente de trabalhos disponíveis na literatura.

Willner *et al.*[93], relataram o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para ácido málico utilizando uma enzima $NAD(P)^+$-. Para tanto, o mediador pirroloquinolinaquinona (PQQ) foi primeiramente imobilizado sobre uma monocamada automontada de cistamina (CYS) sobre eletrodo de ouro e, posteriormente, a enzima foi covalentemente imobilizada utilizando-se a carbodiimida (EDC). Neste caso, para que o biossensor respondesse ao substrato foi necessária a adição do cofator $NAD(P)^+$ à cela eletroquímica.

Gorton *et al.*[94,95] também estudaram a transferência de elétrons da enzima celubiosedesidrogenase (CDH) sobre uma camada automontada. A CDH é uma enzima que contém dois sítios ativos, um grupo flavina (FAD) e um grupo heme (citocromo b). Por meio

da técnica de voltametria cíclica, foi observado que, sobre eletrodos de ouro modificados com SAM de cistamina (CYS), a parte heme da enzima CDH apresentava uma transferência de elétrons direta quase-reversível, diferentemente do observado para esta mesma enzima sobre eletrodos de grafite. Estes resultados mostraram claramente a importância da orientação da enzima sobre a superfície, uma vez que sobre a superfície de grafite é esperada uma orientação randômica, enquanto que sobre o eletrodo de ouro a enzima é capaz de se orientar de maneira a minimizar a distância entre o seu sítio ativo e a superfície do eletrodo facilitando, assim, a transferência de elétrons.

Campuzano *et al.*[96] desenvolveram um biossensor amperométrico com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP) em eletrodo de ouro, utilizando a enzima peroxidase (HRP, do inglês horseradish peroxidase) para a determinação de peróxido de hidrogênio por meio de análise por injeção de fluxo em amostras de tintura de cabelo e de leite. O dispositivo baseou-se na imobilização da enzima peroxidase e do mediador de elétrons tetratiafulvaleno (TTF) na SAM por meio de ligação covalente cruzada com glutaraldeído, de acordo com a seguinte ordem: Au-AMP-TTF-HRP. O biossensor amperométrico permitiu repostas reprodutíveis em um potencial de 0,00 V em meio de tampão fosfato pH=7,0. Para determinação analítica obteve-se uma faixa linear entre $2{,}00\times10^{-7}$ e $1{,}00\times10^{-4}$ mol L^{-1}, com limite de detecção de $6{,}90\times10^{-8}$ mol L^{-1}. O método de imobilização mostrou boa reprodutibilidade para cinco eletrodos diferentes. Além disso, a vida útil de um único biossensor foi de 13 dias, com perda de 20% de sua resposta original após 17 dias de uso. Segundo os autores, o peróxido de hidrogênio é utilizado na limpeza de instrumentos e equipamentos empregados para resfriar o leite e em alguns países é também utilizado na pasteurização em concentrações bem definidas e deve ser eliminado antes do consumo devido a seus efeitos adversos. A porcentagem de recuperação nestas amostras foi de 99,00±2%,

demonstrando uma boa precisão do método, sem qualquer tratamento prévio da amostra. Na indústria cosmética o peróxido de hidrogênio é usado em soluções para descolorir cabelos, daí a importância em determiná-lo nestas amostras. Os resultados de recuperação obtidos ficaram em torno de 92,00±2%.

Lee *et al.*[97] construíram um sensor por meio da mistura dos tióis ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP) e ácido 11-mercaptoundecanóico (11-AMU). Foram avaliadas misturas dos respectivos tióis nas seguintes quantidades: 20:1 relação de 3-AMP para 11-AMU (SAM 1), 10:1 relação de 3-AMP para 11-AMU (SAM 2), 1:1 relação de 3-AMP para 11-AMU (SAM 3) e somente solução de 11-AMU (SAM 4). Para avaliação das características desses filmes foram realizadas medidas de parâmetros cinéticos a fim de avaliar qual a melhor quantidade de cada tiol para a ancoragem de anticorpos. Foi verificado que as moléculas de anticorpos formaram um complexo mais estável com a SAM 2, embora a SAM 1 tenha apresentado menor impedimento estérico, e desse modo, permitindo que mais biomoléculas possam ancorar nas extremidades da SAM. Os autores citam que misturas de tióis com tamanhos de cadeias diferentes são mais eficazes na imobilização de proteínas do que soluções homogêneas de tiocompostos. Os autores estimaram a aplicação deste biossensor em trabalhos futuros.

Mena *et al.*[98] utilizaram eletrodo de ouro modificado com o ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA) para fixar o N-hydrosulfosuccinimida para a detecção de lacase. O eletrodo mostrou-se estável com boa reprodutibilidade e obtiveram um limite de detecção da ordem de 0,05 mmol L^{-1}. Já Chen *et al.*[99] também utilizaram o 3-MPA para fixar leveduras sobre a superfície do eletrodo de ouro na fabricação do biossensor, o qual foi utilizado para determinação de Saccharomyces cerevisiae. Estudaram a transferência eletrônica entre a enzima e monocamada e caracterizaram a superfície do eletrodo utilizando

Voltametria Cíclica (VC), Impedância Eletroquímica (IE) e Microscopia de Força Atômica (AFM). O biossensor obtido mostrou-se estável e reprodutivo.

Campuzano *et al.*[100] confeccionaram um biossensor amperométrico para a determinação de ácido glicônico, utilizando um eletrodo de ouro modificado com SAM do ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP), a enzima gliconato dehidrogenase (GADH, 0,84 U) e o tetratiafulvaleno (TTF) como mediador. Os autores constataram um tempo de vida longo para o biossensor. Depois de 53 dias de uso contínuo, o biossensor exibiu 86% de sua sensibilidade inicial. O limite de detecção encontrado foi de $1{,}90 \times 10^{-7}$ mol L^{-1} para uma faixa linear de concentração de $6{,}00 \times 10^{-7}$ a $2{,}00 \times 10^{-5}$ mol L^{-1}. O efeito de interferentes na resposta do biossensor foi avaliado, determinando-se o ácido glicônico em amostras de vinho.

Da revisão bibliográfica apresentada, pode-se concluir que a utilização das SAMs para a imobilização de enzimas permite otimizar, de maneira inigualável, a distribuição geométrica da superfície do biossensor, por meio do planejamento adequado das terminações dos tióis, favorecendo, tanto a transferência de elétrons, quanto a imobilização das enzimas com os respectivos sítios ativos totalmente disponíveis para a interação com os substratos, minimizando assim, o efeito negativo da imobilização sobre a atividade enzimática[48].

1.3 Desenvolvimento de Biossensores para a Determinação de Glicose

A glicose oxidase (GOx) é uma das enzimas mais empregadas em Química Analítica, apresentando características importantes, como boa estabilidade quando comparada a outras enzimas, ser disponível com alto grau de pureza a preço acessível, e apresentar alta seletividade ao substrato β-D-glicose[101]. Esta enzima catalisa a oxidação de β-D-glicose pelo oxigênio molecular, produzindo gluconolactona e peróxido de hidrogênio. Durante o processo de oxidação da glicose, o cofator flavina adenina dinucleotídio (FAD) é reduzido a $FADH_2$

seguida pela oxidação do cofator enzimático pelo oxigênio molecular, com a formação de H_2O_2.

A GOx é uma proteína dímera. A forma nativa contém duas moléculas do cofator adenina flavina dinucleotídeo (FAD) fortemente ligado como cofator[102], que é responsável pelas propriedades redox da enzima; o sistema de detecção ocorre por meio do consumo de oxigênio pela oxidação direta do peróxido de hidrogênio ou oxidação do mediador.

FADs são cofatores hidrossolúveis que sofrem oxidações e reduções reversíveis em muitas das reações de transferência de elétrons do metabolismo.

A GOx é amplamente utilizada para determinação de glicose em fluídos biológicos e em alimentos e bebidas[102].

Atualmente, muita atenção tem sido dedicada à determinação de compostos alimentares utilizando biossensores específicos[103,104]. Assim, em muitos processos alimentares, como combinações de açúcares, especialmente glicose, são particularmente importantes, e medidas destas espécies são necessárias para controle de produtos com propósito nutricional. O interesse alternativo para métodos clássicos de análises de diferentes sacarídeos seria o desenvolvimento de um biossensor para determinação desses analitos. Este biossensor permite o uso de determinações específicas de cada açúcar e a fácil automação destes processos[105-108].

Entretanto, a determinação de glicose não é somente de interesse na área de alimentos. É utilizada no controle do nível de glicose no sangue, sendo que baixas concentrações de glicose estão presentes no sangue e urina de indivíduos saudáveis. Contudo, altas concentrações de glicose podem ser encontradas no sangue, bem como em excreções, de pacientes afetados por diabetes.

A sacarose quando ingerida por uma pessoa normal resulta no final da digestão, em parte na glicose que é absorvida rapidamente para a corrente sanguínea. No sistema circulatório, a glicose com ajuda da insulina é absorvida pelas células para lhe fornecer energia, sendo o excesso estocado pelo fígado sob a forma de glicogênio. Este será depois devolvido sob a forma de glicose assim que as células dela necessitarem.

O *diabetes mellitus* é produzido por uma deficiência na secreção ou na ação do hormônio pancreático, insulina, que por sua vez produz profundas anormalidades no metabolismo.

Desse modo, o desenvolvimento de dispositivos para a determinação do açúcar D-glicose em alimentos torna-se um importante procedimento em controle de qualidade, quando se considera os alimentos ditos “diet”, que são utilizados em regimes e por diabéticos.

Florescu *et al.*[109] avaliaram e caracterizaram biossensores enzimáticos de glicose utilizando eletrodos de filme de carbono. A enzima glicose oxidase foi imobilizada na superfície do carbono com glutaraldeído, juntamente com albumina de soro bovino, com e sem nafion. Os limites de detecção encontrados foram de 60 μM.

Shervedani *et al.*[110] desenvolveram um método para a determinação quantitativa de glicose por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS, do inglês electrochemical impedance spectroscopy). O dispositivo foi baseado na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) em monocamada auto-organizada de ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP), utilizando substrato de ouro (Au-AMP-GOx). A reação foi mediada por meio de parabenzoquinona (PBQ), a qual foi reduzida a hidroquinona (H_2Q), voltando a se oxidar na superfície do eletrodo de ouro. Um aumento na concentração da glicose resultou em um aumento na densidade da corrente de difusão da oxidação da H_2Q,

correspondendo a uma diminuição na resistência de carga da corrente faradaica (Rct) de acordo com medidas de EIS.

Creager *et al.*[111] utilizaram SAMs de 6-mercaptohexanol e 11-mercaptoundecanol para a imobilização da GOx, na presença de um mediador redox solúvel em solução aquosa. Os autores discutem que a transferência de elétrons foi diminuída com o emprego de SAMs de cadeia longa, entretanto, o uso do mediador redox, no caso o hidróximetilferroceno, possibilitou a transferência de elétrons do sítio ativo da enzima até a superfície do eletrodo. Desse modo, SAMs dos tióis 6-mercaptohexanol e 11-mercaptoundecanol apresentaram baixas correntes faradaicas para a espécie eletroativa em solução. Já com o auxílio do mediador, a reação foi facilitada em potenciais próximos de 0,00 V.

Cecchet *et al.*[112] estudaram quantitativamente por meio de técnicas voltamétricas (VC), espectroscópicas (EIE) e simulações digitais o mecanismo de transferência eletrônica de monocamadas formadas por ácido 11-mercaptoundecanóico (11-AMU) e pela modificação do 11-AMU pela adsorção física da enzima glicose oxidase (GOx). A presença do mediador de elétrons ferrocenilmetanol (FcMeOH) acelerou a cinética de transferência eletrônica dos dois sistemas. As medidas revelaram que a transferência eletrônica do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ é controlado por difusão, e a conversão eletroquímica enzimática da glicose em gliconolactona foi efetivado pela molécula de FcMeOH. As análises das correntes catalíticas geradas pelo eletrodo SAM/GOx na presença de glicose e FcMeOH mostraram um recobrimento amplo da superfície pela proteína, confirmada por medidas de espectroscopia de foto elétrons excitados por raio-x (XPS).

1.4 Desenvolvimento de Biossensores para a Determinação de Frutose

A enzima D-frutose 5-dehidrogenase foi primeiramente descoberta em 1966[113], a partir do *Gluconobacter Cerius*. Os autores confirmaram o efeito catalítico da enzima na oxidação da D-frutose para a 5-ceto-D-frutose. Ameyama *et al.*[114], relataram a purificação e as propriedades catalíticas e moleculares da FDH a partir do *Gluconobacter industrius* e a possibilidade do uso desta enzima na quantificação de D-frutose.

$$\mathrm{D-frutose} + M_{ox} \xrightarrow{\mathrm{FDH}} 5-\mathrm{ceto-D-frutose} + \mathrm{M_{red}} \qquad (4)$$

onde M_{ox} e M_{red} são os aceptores de elétrons (mediadores) nas suas formas oxidada e reduzida, respectivamente[115].

Existe o problema da intolerância à frutose, que é um distúrbio hereditário no qual o organismo não consegue utilizar a frutose porque a enzima fosfofrutoaldolase está ausente. Como conseqüência, a frutose 1-fosfato, um subproduto da frutose, acumula-se no organismo, impedindo a formação de glicogênio e a sua conversão em glicose para ser utilizada como energia. A ingestão de quantidades superiores à quantidade mínima de frutose ou sacarose (açúcar comum), a qual é convertida em frutose no organismo, acarreta *hipoglicemia* (concentração baixa de glicose) acompanhada de sudorese, tremores involuntários, confusão mental, náusea, vômito, dores abdominais e, algumas vezes, convulsões e coma. Podem ocorrer lesões renais e hepáticas e deterioração mental quando a pessoa continua a consumir alimentos contendo frutose.

A frutosúria é uma condição inofensiva na qual ocorre a excreção de frutose na urina e é causada por uma deficiência hereditária da enzima frutocinase. Aproximadamente 1 em cada 130.000 pessoas na população geral apresenta frutosúria. Ela não causa sintomas, mas a

alta concentração de frutose no sangue e urina pode levar a um diagnóstico errôneo do *diabetes mellitus*[116].

Assim como para a glicose, métodos seletivos e rápidos têm sido desenvolvidos usando enzimas imobilizadas para a confecção de biossensores amperométricos[117]. A primeira descrição de D-frutose 5-dehidrogenase (FDH) foi feita por Yamada *et al.*[118], que confirmaram que a enzima catalisa a oxidação da frutose para 5-ceto-D-frutose, com a concomitante redução da ligação covalente do grupo pirrol. Um novo biossensor amperométrico mediado por pasta de nanotubo de carbono para a frutose foi descrito por Antiochia *et al.*[117].

Garcia *et al.*[119] desenvolveram biossensores amperométricos para detecção de frutose por imobilização de D-frutose-5-dehidrogenase (FDH) por meio de dois processos de imobilização. O primeiro por imobilização de oclusão enzimática em um filme de polipirrol, sobre um eletrodo de platina contendo ferrocianeto de sódio como mediador. O segundo foi construído utilizando o método de ligação covalente cruzada, e a enzima sendo imobilizada em um filme de polipirrol dopado com hexacianoferrato. Observou-se um intervalo de resposta linear para ambos os biossensores de $0{,}8 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} com um r.s.d. de 0,68%.

Campuzano *et al.*[120] construíram um biossensor amperométrico para a frutose utilizando a enzima frutose 5-dehidrogenase (FDH) sobre eletrodo de ouro modificado com SAM de ácido 3-mercaptopropiônico (3-AMP) e tetratiafulvaleno (TTF) como mediador de elétrons igualmente ancorado na superfície do eletrodo. A imobilização da FDH na superfície do eletrodo foi realizada por meio de ligação covalente cruzada com o glutaraldeído (agente bifuncional). O esquema de montagem deste biossensor ficou na seguinte ordem: Au/AMP/FDH/TTF. O tempo de vida deste dispositivo foi de aproximadamente 30 dias, exibindo cerca de 93% da sua resposta inicial no 33° dia. O limite de detecção encontrado foi

de 2,40x10^{-6} mol L^{-1} para uma curva de calibração linear entre 1,00x10^{-5} e 1,0x10^{-3} mol L^{-1}. Adicionalmente, o biossensor foi aplicado em várias amostras como mel e sucos, as quais passaram por etapas mínimas de pré-tratamento. O sensor para frutose apresentou bom tempo de resposta e boa reprodutibilidade, sendo livre de interferentes.

Pela descrição dos trabalhos mencionados pode-se verificar o crescente aumento na utilização de SAMs na construção de biossensores, uma vez que as monocamadas auto-organizadas oferecem uma série de vantagens frente a construção e aplicabilidade destes dispositivos em diversos setores da pesquisa. Entretanto, dentro do exposto, a escassez de informações sobre a enzima FDH em camadas auto-organizadas, bem como trabalhos utilizando a FDH e a GOx simultaneamente, para a construção de biossensores bienzimáticos, visando maior automação, serve de incentivo para o desenvolvimento de uma metodologia adequada para este fim.

1.5 O Açúcar Sacarose

A sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), também conhecida como açúcar de mesa, é formada por uma molécula de glicose e uma de frutose e é produzida pela planta durante o processo de fotossíntese.

A sacarose é hidrolisada com grande facilidade por ácidos diluídos, dando origem ao açúcar invertido, isso é, uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose. A inversão da sacarose pode ser efetuada também enzimaticamente por meio da enzima invertase, a qual catalisa a sua hidrólise, cindindo a molécula e liberando a D-glicose e a D-frutose[121].

1.6 Substitutos da Sacarose em Alimentos: Os Edulcorantes

No desenvolvimento de um produto alimentício onde é eliminada ou reduzida a quantidade de açúcar é necessário a utilização de ingredientes que tragam as funções que o açúcar forneceria ao produto, tais como: doçura, textura, cremosidade, entre outras. Estes aditivos são comumente chamados de substitutos de açúcar e dentre estes substitutos encontram-se os edulcorantes.

São vários os edulcorantes utilizados pela indústria alimentícia, entretanto os mais freqüentemente empregados são[122]:

- **Sacarina**: Primeira substância adoçante sintética a ser descoberta (1878), tem poder adoçante 500 vezes maior do que a sacarose. Em altas concentrações deixa sabor residual amargo, e não é metabolizado pelo organismo. É de fácil solubilidade e estável em altas temperaturas. Em 1986 foi comprovada sua segurança para a saúde através de diversos trabalhos técnicos-científicos.

- **Aspartame**: edulcorante artificial descoberto em 1965. Possui sabor agradável e semelhante ao açúcar branco, só que com potencial adoçante 200 vezes maior, permitindo o uso de pequenas quantidades. Seu valor energético corresponde a 4 calorias/grama. Muito usado pela indústria alimentícia, principalmente nos refrigerantes diet. Sensível ao calor, perde o seu poder de adoçamento em altas temperaturas. A doçura também poderá diminuir quando muito tempo armazenado. É contra-indicado a portadores de fenilcetonúria, uma doença genética rara que provoca o acúmulo da fenilalanina no organismo, causando retardo mental.

- **Ciclamato de sódio**: descoberto em 1939, só entrou no mercado a partir da década de 50. Como a sacarina, é outro edulcorante artificial largamente usado no setor alimentício,

sendo aplicado em adoçantes de mesa, bebidas dietéticas, geléias, sorvetes, gelatinas etc. Já foi liberado nos EUA da suspeita de ser cancerígeno. Com o menor poder adoçante, é 40 vezes mais doce que a sacarose, não calórico e possui sabor agradável e semelhante ao açúcar refinado (apresentando um leve gosto residual). Não é metabolizado pelo organismo, nem perde a doçura quando submetido a altas/baixas temperaturas e meios ácidos.

- **Sorbitol**: substância natural presente em algumas frutas, algas marinhas etc. Tem o poder edulcorante igual ao da sacarose e similar ao da glicose, não sendo aconselhável a pacientes obesos e diabéticos mal controlados. Calórico, fornece 4 calorias/grama e ao ser absorvido se transforma em frutose no organismo. A frutose é transformada em glicose no fígado, mas como o processo é lento, não altera significativamente a glicemia. Não provoca cáries, não é tóxico e apresenta boa estabilidade. Resiste, sem perder seu potencial adoçante, a processos de aquecimento, evaporação e cozimento.

- **Stevia Rebaudiana**: descoberta em 1905 e muito difundida no Japão, esta planta é originária da fronteira do Brasil com o Paraguai. Das suas folhas se extrai o steviosídeo, edulcorante natural de sabor doce retardado com poder adoçante 300 vezes maior do que a sacarose. Tem boa estabilidade em altas ou baixas temperaturas. Pode ser consumida sem nenhuma contra-indicação por qualquer pessoa. Não produz cáries, nem é calórica, tóxica, fermentável ou metabolizada pelo organismo.

Cabe ressaltar que existe uma importante diferença entre produtos “diet” e os produtos “light”. Os primeiros são destinados às pessoas que não podem ingerir açúcares (glicose, frutose, sacarose) ou grandes quantidades de carboidratos que quando metabolizados se quebram em açúcares até a forma de monossacarídeos, assim, os edulcorantes cumprem o papel do açúcar nestes alimentos. Já os produtos denominados “light” são aqueles que

apresentam, em seu valor calórico, uma diferença relativa mínima de 25%, obtida reduzindo a quantidade de açúcares, os quais são substituídos por edulcorantes.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Este capítulo é destinado a apresentar as características fundamentais, das técnicas utilizadas neste trabalho.

2.1 Cronoamperometria

As técnicas eletroquímicas a potencial controlado, baseiam-se em situações dinâmicas (fluxo de corrente). Neste caso, o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho é empregado para "forçar" uma mudança nas concentrações das espécies eletroativas na superfície do eletrodo por meio de um processo de oxidação ou redução eletroquímica. A corrente resultante desse processo redox é medida como uma função do tempo ou dos potenciais aplicados. O objetivo é obter informações termodinâmicas, cinéticas e analíticas, dentre outras[123].

A cronoamperometria, como o próprio nome sugere, é uma técnica eletroquímica que determina a corrente que flui através do eletrodo de trabalho, como função do tempo, em um potencial constante. Dentre as técnicas coulométricas a cronoamperometria é uma das mais importantes para utilização com biossensores (chamado de biossensor amperométrico), onde o potencial aplicado ao biossensor promove a reação eletroquímica com o produto da reação enzimática, quantificando-o.

Dessa forma, neste trabalho, utilizou-se a cronoamperometria para avaliar a resposta do biossensor bienzimático desenvolvido, por meio das respostas de corrente limite de difusão obtidas a partir do mediador de elétrons utilizado neste sistema em estudo.

2.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) pode fornecer informações com respeito à cinética e o mecanismo de reações eletroquímicas utilizando uma variedade de técnicas e sistemas acoplados. Por esta razão, a EIE vem sendo utilizada como uma ferramenta importante no estudo de corrosão, semicondutores, baterias, eletrodeposição e sínteses eletro-orgânicas.

Em função dos experimentos envolvendo EIE estarem relacionados com a capacitância do eletrodo e a cinética da transferência de carga, é viável a utilização da impedância eletroquímica em estudos mecanísticos[124].

Teoricamente, as vantagens da EIE podem ser associadas à representação elétrica de circuitos equivalentes de uma célula eletroquímica, onde a interface do eletrodo e as reações eletroquímicas são correlacionadas com um circuito eletrônico[125].

Sendo assim, a técnica de EIE foi utilizada para avaliar o comportamento da formação das monocamadas do tiol cistamina em superfície de ouro policristalino.

2.3 Microbalança de Cristal de Quartzo

Os princípios de operação da microbalança de cristal de quartzo (MCQ) estão relacionados com o efeito piezelétrico, que por sua vez está ligado às propriedades específicas dos materiais de gerarem um campo elétrico quando submetidos a pressões externas. E o seu funcionamento baseia-se no monitoramento da freqüência de oscilação do cristal de quartzo, no momento em que uma massa é depositada sobre o mesmo ou quando o meio no qual este se encontra é modificado quanto à sua viscoelasticidade.

A oscilação do quartzo é feita por meio de um circuito oscilador. O circuito determina a estabilidade do instrumento e os tipos de experimentos que podem ser realizados.

Para a oscilação do cristal de quartzo com um circuito oscilador utiliza-se um circuito eletrônico que faz com que o cristal oscile na freqüência fundamental. O cristal de quartzo é um componente ativo, pois é o responsável pela freqüência de oscilação do circuito[126]

Dependendo do circuito oscilador empregado, deve-se utilizar um conversor de freqüência-voltagem ou, diretamente, um frequencímetro.

A forma como o cristal de quartzo é montado na célula é de fundamental importância, podendo chegar a ser um fator limite entre o cristal oscilar ou não.

Todo o sistema é conectado a um computador, permitindo, assim, a obtenção dos dados e o controle do experimento.

Como é um detector sensível em solução, a nanobalança de cristal de quartzo pode ser aplicada a problemas analíticos, como por exemplo, para a detecção e a determinação de microconcentrações de substâncias que se adsorvem sobre o eletrodo. A NCQ é acoplada a um potenciostato/galvanostato permitindo a realização de experimentos com potencial/corrente controlados, sendo que nesta combinação a microbalança é normalmente referida como microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)[126].

Neste trabalho o objetivo da utilização da microbalançca eletroquímica de cristal de quartzo foi conhecer a variação de massa, correspondente à adsorção da enzima glicose oxidase (GOx) sobre a SAM de cistamina (CYS), estabelecendo um paralelo entre o processo de modificação do eletrodo de ouro pela CYS e a ancoragem da GOx sobre esta superfície de ouro modificada pelo respectivo tiol.

3 OBJETIVO

Desenvolver, caracterizar e aplicar um biossensor bienzimático amperométrico, baseado na imobilização das enzimas glicose oxidase e frutose dehidrogenase sobre camadas auto-organizadas de cistamina, por ligações cruzadas com glutaraldeído, para a detecção de glicose e frutose em amostras de refrigerantes dietéticos, light e não-dietéticos e em amostras de adoçantes naturais e sintéticos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentadas as condições em que os experimentos foram realizadas, os equipamentos e materiais utilizados para análise e estudo da enzima glicose oxidase (GOx) e frutose dehidrogenase (FDH) imobilizadas sobre camada auto-organizada (SAM) de cistamina (CYS).

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Soluções

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, etc), passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas medidas. Para, isto foi utilizada uma solução sulfonítrica [H_2SO_4 + HNO_3 1:1 (v/v)], com posterior lavagem exaustiva com água destilada, deixando ferver por 1 hora também em água destilada.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, originadas de uma unidade de purificação Milli-Q, procedência Millipore Corporation.

Para as diluições foram utilizadas micropipetas automáticas com volume variável Eppendorf Research®, todas com ponteiras volumétricas descartáveis de polietileno.

Para uma das etapas de limpeza dos eletrodos de ouro foram utilizados o equipamento de Ultrasom MaxiClean 1450 da Unique, freqüência de 25 KHz.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de pureza analítica (PA), e a origem destes encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Procedência e pureza dos reagentes utilizados.

Reagentes	***Fórmula Química***	***Procedência***	***Pureza %***
Glicose Oxidase	_____	Sigma	_____
D-glicose	$C_6H_{12}O_6$	Synth	99,00
Frutose Dehidrogenase	_____	Sigma	_____
Frutose	$C_6H_{12}O_6$	Baker	99,00
Cistamina	$C_4H_{12}N_2S_2$	Sigma	98,00
Álcool Etílico	C_2H_6O	Baker	99,90
Fosfato dissódico 12-hidratado	$Na_2HPO_4.12H_2O$	Merck	99,00
Ácido Fosfórico	H_3PO_4	Merck	85,00
Ácido Clorídrico	HCl	Merck	37,00
Ácido Sulfúrico	H_2SO_4	Sigma	99,00
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7.\ H_2O$	Merck	99,50
Cloreto de Potássio	KCl	Mallinckrodt	99,60
Nitrato de Prata	$AgNO_3$	Merck	99,80
Acetona	C_3H_6O	Merck	99,00
Tetratiafulvaleno	$C_6H_4S_4$	Sigma	97,00
Glutaraldeído	$C_5H_8O_2$	Sigma	25,00

4.1.2.1 Solução de Cistamina (CYS)

Foi preparada solução de cistamina na concentração de $1x10^{-3}$ mol L^{-1} em 100% de álcool etílico para construção da SAM.

4.1.2.2 Solução Piranha

Para a limpeza dos eletrodos de ouro, preparou-se uma solução piranha [3 H_2SO_4: 1 H_2O_2 30% (v/v)], onde os eletrodos ficaram imersos por um tempo de 10 min.

4.1.2.3 Solução de Ácido Sulfúrico

Com o objetivo de condicionar os eletrodos de ouro liso para assegurar a boa formação da SAM, preparou-se uma solução 0,10 mol L^{-1} de H_2SO_4.

4.1.2.4 Solução de Ferricianeto de potássio

Para caracterização eletroquímica dos eletrodos de ouro modificados com a SAM de cistamina, preparou-se uma solução de $K_4Fe(CN)_6$ na concentração de $1x10^{-3}$ mol L^{-1}.

4.1.2.5 Solução Tampão Fosfato de Sódio

A solução de tampão fosfato de sódio, 0,10 mol L^{-1}, utilizada como eletrólito suporte, foi preparada a partir do sal monohidrogeno fosfato dissódico anidro. Os valores de pH utilizados foram ajustados com NaOH 0,10 mol L^{-1} e H_3PO_4 0,10 mol L^{-1}, de acordo com cada valor de pH desejado.

4.1.2.6 Solução Tampão McIlvaine

A solução de tampão McIlvaine, foi preparada a partir do ácido cítrico $1,00x10^{-4}$ mol L^{-1} e do sal monohidrogeno fosfato dissódico anidro $2x10^{-4}$ mol L^{-1}. Os valores de pH utilizados foram ajustados de acordo com cada valor desejado.

4.1.2.7 Solução de D-Glicose

A solução estoque do substrato D-glicose para as análises eletroquímicas, foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH = 6,5 com uma concentração de $5,00x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para realização das medidas as amostras foram diluídas a partir desta solução diretamente no tampão fosfato.

4.1.2.8 Solução de D-Frutose

A solução estoque do substrato D-frutose para as análises eletroquímicas, foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH = 6,5 com uma concentração de $5{,}00x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para realização das medidas as amostras foram diluídas a partir desta solução diretamente no tampão fosfato.

4.1.2.9 Solução equimolar de D-Glicose e D-Frutose

A solução estoque equimolar dos substratos D-glicose e D-frutose para as análises eletroquímicas, foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH = 6,5 com uma concentração de $5{,}00x10^{-2}$ mol L^{-1}. Para realização das medidas as amostras foram diluídas a partir desta solução diretamente no tampão fosfato.

4.1.2.10 Solução da Enzima Glicose Oxidase (GOx)

Para as análises da reação enzimática com a GOx (proveniente do fungo *Aspergillus Níger*), preparou-se uma solução contendo 20.000 U da enzima GOx em 1,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH = 5,5. Desta quantidade, utilizou-se 5,00 μL contendo 100 U ou 20,6 U para construção dos biossensores, exceto para os estudo da variação da quantidade da enzima no eletrodo.

4.1.2.11 Solução da Enzima Frutose 5-Dehidrogenase (FDH)

Para as análises da reação enzimática com a FDH (proveniente da bactéria G*luconobacter Industrius*), preparou-se uma solução contendo 82,40 U da enzima FDH em 20 μL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} em pH = 4,5. Os biossensores foram construídos com 5,00 μL, ou seja, 20,60 U da FDH sobre os eletrodos.

4.1.2.12 Solução do Mediador Tetratiafulvaleno (TTF)

Como mediador para as reações enzimáticas, foram utilizadas soluções de tetratiafulvaleno (TTF) nas concentrações de 0,01 mol L^{-1}, 0,05 mol L^{-1} e 0,1 mol L^{-1}, preparadas em meio de acetona.

4.1.2.13 Solução de Glutaraldeído

Para ancoragem das enzimas sobre a superfície do eletrodo foi utilizada uma solução estoque de glutaraldeído (25%) e as demais preparadas a partir desta.

4.2 Instrumentação

4.2.1 Ajustes de pH

As soluções tiveram seus valores de pH ajustados por um pH-metro Qualxtron modelo 8010. A calibração do aparelho foi realizada diariamente, utilizando-se uma solução tampão de citrato-ácido clorídrico pH = 4,0 e uma solução tampão fosfato pH = 7,0, ambas comerciais da Metrohm.

4.2.2 Pesagens dos Reagentes Utilizados

As pesagens dos reagentes utilizados foram feitas em uma balança analítica Mettler Toledo da Micronal S/A modelo AL 204.

4.2.3 Medidas Eletroquímicas

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado o potenciostato/galvanostato AUTOLAB® PGSTAT 30 (ECO CHEMIE, Holanda). A aquisição dos dados e o

gerenciamento do potenciostato foram realizados por um microcomputador e mediante software (GPES).

Para as medidas eletroquímicas de impedância eletroquímica foi utilizado o Potenciostato/Galvanostato, Radiometer Voltalb PGZ 402, acoplado a um microcomputador dotado com o programa Voltamaster 4.0 também da Radiometer. Os espectros de impedância foram tratados com o auxílio do software Electrochemistry-ZView2.

Os experimentos da microbalançca eletroquímica de cristal de quartzo foram realizados utilizando o aparelho da Maxtek.inc® modelo RQCM, conectado a um circuito oscilatório e um computador para aquisição dos dados.

4.2.4 Medidas Espectrofotométricas

As medidas de estabilidade da enzima GOx foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro HITACHI U-2001 acoplado a um microcomputador IBM-PC contendo o software Spectracalc (Galactia Ind. Co.). As cubetas de quartzo utilizadas nos experimentos possuíam caminho óptico igual a 1,00 cm.

4.3 Eletrodos

4.3.1 Eletrodos de Trabalho

Os eletrodos de trabalho utilizados foram eletrodos de ouro policristalino embutidos em Teflon® com 0,2 cm^2 de área geométrica, limpos e modificados por SAM de cistamina.

Além dos eletrodos de ouro convencionais, foram utilizados para a MECQ, eletrodos de cristal de quartzo com filme de ouro policristalino ($A_{g\ face\ externa}$ = 1,37 cm^2 / $A_{g\ face\ interna}$ = 0,39 cm^2), para os estudos de deposição da SAM e da enzima.

4.3.2 Eletrodo de Referência

O eletrodo de referência utilizado nos experimentos constitui-se de um fio de prata anodizado imerso em solução saturada de AgCl e KCl 3,00 mol L^{-1} em meio aquoso (Ag/AgCl/KCl), cujo valor de potencial é de aproximadamente 0,222 V em relação ao eletrodo reversível de hidrogênio.

4.3.3 Eletrodo Auxiliar

Como eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo utilizou-se uma placa de platina com área geométrica de 0,48 cm^2.

4.4 Células Eletroquímica

Para a realização dos experimentos eletroquímicos utilizou-se uma célula de vidro Pyrex® de compartimento único e com camisa para o controle de temperatura, equipada com uma tampa em Teflon®, contendo orifícios para desoxigenação da solução com nitrogênio, e para posicionamento dos eletrodos, sendo um de referência (Ag/AgCl), um de trabalho e um contra-eletrodo, como mostra como mostra a Figura 8.

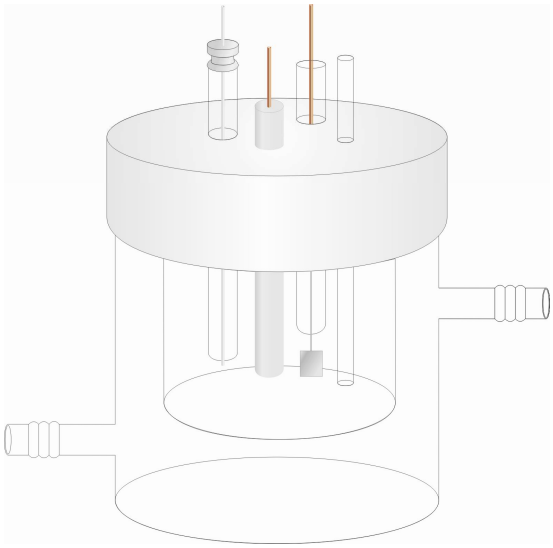

Figura 8. Representação esquemática da célula eletroquímica utilizada nos experimentos. (1) eletrodo de trabalho, (2) eletrodo de referência Ag/AgCl, (3) eletrodo auxiliar, (4) entrada de N_2.

Para a realização dos experimentos eletroquímicos com a MECQ utilizou-se uma célula de vidro Pyrex®, apresentada na Figura 9, com capacidade de 40 mL, equipada com uma tampa em Teflon® contendo orifícios, para desoxigenação da solução com nitrogênio, e para posicionamento dos eletrodos, sendo um de referência, um de trabalho e um contra eletrodo. A Figura 9 mostra um desenho esquemático da célula eletroquímica especial foi projetada para o desenvolvimento dos estudos eletroquímicos utilizando a MECQ.

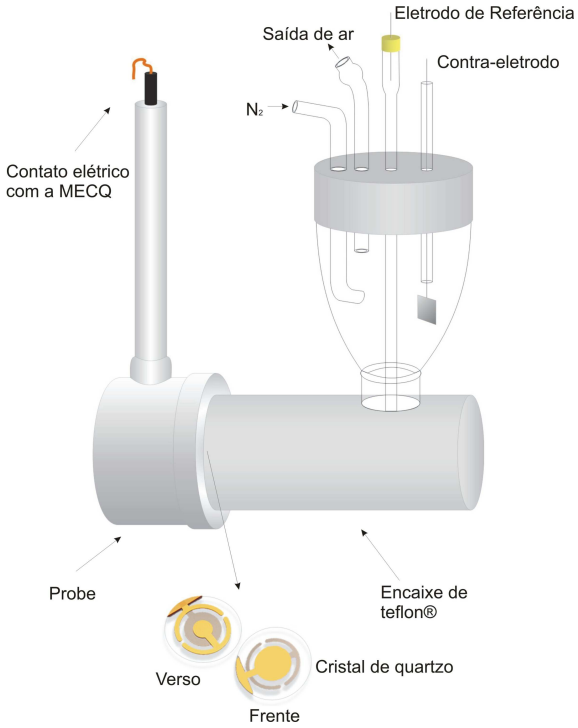

Figura 9. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos com microbalança eletroquímica de cristal de quartzo.

A remoção prévia do oxigênio por meio do fluxo de nitrogênio faz-se necessária devido à reação de redução do O_2 na superfície do eletrodo de trabalho. O oxigênio é reduzido em duas etapas consecutivas de dois elétrons ou em uma única etapa de quatro elétrons que variam entre -0,05 V e -0,90 V *vs* SCE, dependendo do pH e do material do eletrodo. Em solução ácida:

$$\mathbf{O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2}$$

$$\mathbf{H_2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2H_2O}$$

e em solução alcalina:

$$\mathbf{O_2 + 2H_2O + 2e^- \rightarrow 2OH^- + H_2O_2}$$

$$\mathbf{H_2O_2 + 2e^- \rightarrow 2OH^-}$$

Estas reações contribuem para a corrente medida e também para a oxidação da superfície do eletrodo. Além disso, o oxigênio, radicais como HO_2• e o peróxido de hidrogênio podem reagir com os reagentes e/ou produtos da reação eletroquímica a ser estudada. Assim, a remoção do oxigênio da solução é, em geral, de grande importância, especialmente para estudos feitos na região de potenciais negativos.

4.5 Metodologia

4.5.1 Procedimentos de Pré-Tratamento para a Superfície Eletródica

A maior parte dos trabalhos envolvendo a formação de monocamadas enfatiza a adsorção de tiocompostos em substratos metálicos, devido ao fato de serem mais fáceis de preparar[40]. O processo adsortivo geralmente ocorre pela imersão do substrato sólido em uma solução com as moléculas de interesse. Adicionalmente, o uso de tióis em solução é uma metodologia mais simples e conveniente de se preparar em laboratórios sendo, portanto, a mais amplamente empregada. Os tióis adsorvem espontaneamente em uma variedade de metais, e dentre eles, o ouro é o mais utilizado. Isto é devido ao fato de que o ouro forma monocamadas bastante estáveis, o que não prejudica a estabilidade do sistema, além de ser um metal inerte (não reage com o oxigênio atmosférico), podendo ser usado em técnicas espectroscópicas e analíticas.

Alguns fatores são importantes para a formação das SAMs. Tais propriedades podem afetar a estrutura da monocamada obtida, promovendo a formação de defeitos estruturais. Algumas aplicações das SAMs exigem o aparecimento dessas irregularidades, já outras exigem a formação de uma monocamada compacta. Desse modo, algumas condições devem

ser levadas em consideração a fim de proporcionar SAMs adequadas. Tais parâmetros são: solvente, concentração e tempo de imersão e limpeza do substrato.

4.5.1.1 Solvente Utilizado:

Para dissolver os tiocompostos foi utilizado como solvente o etanol. Este solvente é o mais aplicado por dissolver uma variedade de tiocompostos com diferentes polaridades e tamanhos de cadeias carbônicas.

O parâmetro mais importante que governa a adsorção do tiol está relacionado a interações solvente-substrato e solvente-adsorbato. Se as moléculas tioladas possuírem mais afinidade pelo solvente do que pela superfície metálica, a taxa de formação da SAM será altamente afetada. E se o solvente possuir grande afinidade pelo substrato, pode ocorrer um impedimento da troca das moléculas do solvente pelas do adsorbato, dificultando a adsorção do tiol[40]. Sendo assim, a escolha do solvente influencia na qualidade da SAM depositada por meio de soluções.

4.5.1.2 Concentração e Tempo de Imersão:

Para a formação da SAM foram avaliados parâmetros como concentração da solução do tiol cistamina e tempo de imersão, a fim de se avaliar as melhores condições para garantir o empacotamento da monocamada. Estes dois parâmetros são inversamente proporcionais, ou seja, baixas concentrações de tióis em solução requerem tempos maiores de imersão[127]. Entretanto, com a solução de cistamina, não foi possível aumentar a concentração para valores maiores que $1{,}00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}, uma vez que acima disto o tiol é insolúvel em meio alcoólico.

Muitos trabalhos indicam que a SAM se forma com tempos curtos de imersão. Outros estudos sugerem que a SAM é formada a partir de tempos longos de imersão (acima

de 18 horas), levando a uma melhor cobertura da superfície, diminuindo o número de defeitos[128].

4.5.1.3 Limpeza do Substrato:

O pré-tratamento da superfície de ouro é uma das etapas mais importantes na formação de monocamadas auto-organizadas de alta qualidade.

Superfícies contendo impurezas diminuem a adsorção dos tióis que ocorre por meio de um processo de troca. As impurezas presentes na superfície são dessorvidas e trocadas pelas moléculas de tiol e, conseqüentemente, esta taxa de dessorção dos contaminantes afeta a cinética de formação da SAM[40]. Dessa forma, a limpeza da superfície é, provavelmente, o fator mais crítico para a obtenção de SAM reprodutível e com minimização de defeitos.

O método mais empregado para a limpeza de superfícies eletródicas para a preparação da SAM envolve a imersão de eletrodos, após polimento, por alguns minutos em solução “piranha”, a qual deve ser utilizada imediatamente após ter sido preparada e consiste de [3 H_2SO_4: 1 H_2O_2 30% (v/v)][129]. A formação das SAMs deve ocorrer imediatamente após a etapa de limpeza da superfície, uma vez que a exposição prolongada das superfícies limpas às condições ambientes pode promover novamente a adsorção de impurezas nos eletrodos.

Sendo assim, neste trabalho, as monocamadas auto-organizadas foram obtidas após etapas de limpeza e caracterização dos eletrodos de ouro. O procedimento de pré-tratamento mecânico consistiu no polimento manual dos eletrodos de ouro, com solução de alumina 0,01 µm e filtro, até que a superfície polida apresentasse um aspecto espelhado. Posteriormente, os eletrodos foram enxaguados e sonicados em etanol durante 5 minutos para a remoção de partículas residuais de alumina da superfície eletródica.

Após esta etapa, os eletrodos de ouro foram imersos em solução "piranha" durante 10 minutos e, em seguida, enxaguados com água destilada. A mistura de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico é extremamente exotérmica e atinge temperaturas próximas a 80 ºC nas condições experimentais utilizadas.

O tratamento eletroquímico foi realizado por meio de 100 varreduras cíclicas sucessivas em intervalo de potenciais de 0,00 a 1,8 V *vs* Ag/AgCl em solução aquosa de H_2SO_4 0,10 mol L^{-1} com velocidade de varredura de 500 mV s^{-1} e, posteriormente, foram realizadas 25 varreduras nas mesmas condições, porém com velocidade de 100 mV s^{-1}. Este processo foi efetuado até a obtenção do perfil voltamétrico característico do ouro.

De acordo com Carvalhal *et al.*[129] se somente o tratamento eletroquímico é utilizado, a limpeza da superfície não é efetiva. Sendo assim, este procedimento foi aplicado após as etapas de tratamento mecânico e químico, a fim de garantir superfícies livres de possíveis interferentes.

4.5.2 Determinação da Área Eletroquímica do eletrodo de Ouro

A determinação da área eletroativa do eletrodo de ouro, tanto do eletrodo de trabalho das medidas eletroquímicas quanto do cristal de quartzo, foi realizada pela integração do pico de redução do voltamograma cíclico do eletrodo de ouro, entre 1,8 e 0,0 V, obtido à velocidade de varredura de 100 mV s^{-1}, em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1}. A carga necessária para a redução de uma camada de óxido quimioadsorvido sobre a superfície do ouro policristalino foi considerada como sendo 390 μC cm^{-2} para os cálculos da área eletroativa do eletrodo.

4.5.3 Formação das Monocamadas Auto-Organizadas sobre a Superfície Eletródica

Para a obtenção da SAM o eletrodo de ouro previamente tratado foi imerso em solução etanólica contendo $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de cistamina. Exceto se diferentemente descrito, o eletrodo foi mergulhado nesta solução durante 2 horas. Posteriormente, foi removido da solução de tiol, enxaguado com etanol absoluto e água ultrapura antes de ser utilizado, com a finalidade de remover moléculas de tiol fisicamente adsorvidas sobre a superfície eletródica. O eletrodo modificado foi caracterizado por voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Foram obtidos voltamogramas cíclicos antes e durante a modificação em $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} para a observação do comportamento do eletrodo de ouro em função da modificação.

4.5.4 Remoção das Monocamadas Auto-Organizadas da Superfície Eletródica

Neste trabalho, o excesso superficial (Γ) da SAM de cistamina foi estimado a partir da área do pico de redução da SAM, considerando que o átomo de enxofre é reduzido através do mecanismo monoeletrônico. A dessorção redutiva foi realizada por meio da técnica de voltametria cíclica. O eletrólito suporte utilizado foi o KOH na concentração 0,1 mol L^{-1}. As condições experimentais foram: potencial inicial de +0,10 V, potencial final de -1,30 V e velocidade de varredura de 25 mV.

4.5.5 Estudos Voltamétricos

Para os estudos de caracterização dos eletrodos pela SAM de cistamina (CYS), foram realizados voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro liso e modificado pela CYS. As medidas foram realizadas adicionando-se à célula eletroquímica 10,00 mL do eletrólito suporte (tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5), juntamente com $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de

$K_4[Fe(CN)_6]$ purgando-se esta solução durante 2 minutos com nitrogênio. Os experimentos de voltametria cíclica foram realizados com potencial inicial em -0,10 V e final em 0,60 V a 50 mV s^{-1} para a caracterização do eletrodo de ouro modificado com a SAM.

Medidas de voltametria cíclica foram realizadas para o estudo das reações enzimáticas. O potencial inicial utilizado foi de -0,10 V e o final de 0,30 V a 50 mV s^{-1}em meio de fosfato 0,10 mol L^{-1}, exceto se diferentemente, em pH=6,5.

4.5.6 Estudos Amperométricos

Os biossensores construídos foram também analisados por medidas amperométricas. As medidas de cronoamperometria foram realizadas com potencial fixo de 0,20 V durante 300 segundos em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1}, em pH=6,5.

Cada experimento foi iniciado com o registro da corrente em função do tempo, no potencial aplicado e na presença dos substratos D-glicose e D-frutose em meio da solução tampão. Com o auxílio de um agitador magnético, fez-se a homogeneização da solução por 10 segundos após cada adição do substrato e, após este tempo, registrou-se a variação da corrente obtida com o passar do tempo.

4.5.7 Estudos de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Para os estudos de impedância eletroquímica foi aplicado ao eletrodo de trabalho uma onda senoidal com 10 mV de amplitude a um potencial de 220 mV (vs Ag/AgCl/KCl saturado) em uma faixa de freqüência de 100 kHz a 10 MHz em solução de $K_4[Fe(CN)_6]$ 1,00x10^{-3} mol L^{-1} em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. O modelo de circuito equivalente utilizado neste trabalho foi o circuito de Randles $R_s(C[R_{ct}W])$ como mostra a Figura 10:

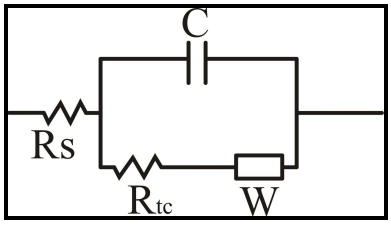

Figura 10. Esquema representativo do circuito de Randles.

onde, R_s é a resistência da solução, R_{ct} é a resistência de transferência de carga, W é a impedância de Warburg e C é a capacitância da dupla camada. Os espectros de impedância foram tratados com o auxílio do software Electrochemistry-ZView2.

4.5.8 Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)

Para limpeza, o eletrodo de ouro da MECQ foi colocado em uma solução de H_2SO_4 1,00 mol L^{-1} até a obtenção do perfil voltamétrico característico do ouro, em intervalo de 0 a 1,75 V com velocidades de varredura de 1,0; 0,5; e 0,05 V.

Assim, os estudos cinéticos de adsorção/organização das monocamadas auto-organizadas de cistamina, bem como da enzima foram monitorados por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo (MECQ), medindo-se a variação de freqüência em função do tempo, em circuito aberto.

Dessa forma, as medidas de MECQ para o estudo da cinética de adsorção/organização da SAM-CYS juntamente com a enzima GOx foram realizadas por meio da variação de freqüência em função da massa, em um equipamento Maxtek, Inc® acoplado a um Potenciostato/galvanostato PGSTAT da Autolab®. Após a estabilização da variação de freqüência, adicionou-se, com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 1,00 mL de solução de CYS na concentração de $1{,}00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1}. A solução estoque era suficientemente concentrada para que a alíquota introduzida no sistema provocasse o mínimo de distorção mecânica, porém distorções pequenas ainda foram observadas nos experimentos.

Após a deposição para a CYS, foi adicionado 100,00 μL da GOx (132,40 mg mL^{-1}) correspondendo a 2000 U de enzima.

Na técnica de MECQ ocorre uma diminuição na freqüência de vibração do cristal de quartzo, devido ao acréscimo de massa nesse cristal, que é detectado por um freqüêncímetro e convertido em unidades de massa incorporada ao eletrodo. Um monitoramento eletroquímico pode ser acoplado a este sistema para determinar o transporte de massa associado ao eletrodo. Dessa forma, torna-se possível o monitoramento de diversos processos, como a adsorção de ânions.

A variação de freqüência em função da massa é relacionada pela equação de Sauerbrey:

$$\Delta f = -K\,\Delta m \qquad (5)$$

onde Δf é a variação de freqüência de ressonância em Hz; K é o coeficiente de sensibilidade da microbalança e Δm é a variação de massa por unidade de área.

Na equação de Sauerbrey[126] supõe-se que o cristal tenha um diâmetro infinito, e a sensibilidade integral tem um valor médio, que só deverá ser utilizado quando as variações de massa forem homogêneas em toda a superfície ativa do eletrodo. A amplitude de oscilação mecânica depende das variações de massa sobre o eletrodo. Essa magnitude é máxima no centro e zero nas bordas da área ativa. Devido a este efeito, a determinação do coeficiente de sensibilidade é de extrema relevância, uma vez que, a sensibilidade integral da MECQ é um fator intrínseco de cada microbalança.

O coeficiente de sensibilidade, 0,060 Hz/ng cm^{-2}, para a microbalança utilizada nos experimentos deste trabalho, foi calculado pelo método da eletrodeposição de Ag, em um cristal de quartzo de corte AT otimizado para 25°C com freqüência de 5 MHz[130].

4.5.9 Preparação dos Biossensores

A construção dos biossensores utilizando-se as enzimas GOx e FDH, foi realizado de acordo com o seguinte procedimento:

Etapa 1: o eletrodo de ouro, previamente limpo, foi mergulhado em solução de cistamina durante 2 horas para a formação da SAM.

Etapa 2: gotejou-se 5,00 μL da solução do mediador de elétrons tetratiafulvaleno (TTF) sobre o eletrodo modificado com a cistamina, deixando-se secar à temperatura ambiente.

Etapa 3: foram gotejados, então, 5,00 μL da solução da enzima GOx ou FDH na superfície do eletrodo modificado com a cistamina e com a camada de TTF. Em seguida, o eletrodo foi seco à temperatura ambiente.

Etapa 4: posteriormente à secagem do eletrodo, foram gotejados 5,00 μL da solução de glutaraldeído (GLU) sobre a superfície do eletrodo modificado, deixando-se secar naturalmente.

Foi construído um biossensor bienzimático utilizando as enzimas GOx e FDH, simultaneamente. O procedimento adotado foi o descrito anteriormente, entretanto, na *etapa 3* foram gotejados, 5,00 μL da solução da enzima GOx, deixando-se secar à temperatura ambiente, posteriormente foram gotejados 5,00 μL da solução da enzima FDH e o eletrodo foi novamente seco à temperatura ambiente e, finalmente, foi adicionado 5,00 μL da solução de glutaraldeído (GLU), deixando-se secar naturalmente.

Cabe ressaltar que, a co-imobilização de enzimas está longe de ser um procedimento rotineiro, uma vez que fatores como a quantidade de sítios ativos sobre a superfície do eletrodo e as respectivas atividades enzimáticas são determinantes para se obter uma boa

funcionalidade do dispositivo. Contudo, determinou-se a melhor quantidade de unidades para cada enzima em estudo, visando alcançar o melhor desempenho e adequada funcionalidade tanto para a GOx quanto para a FDH. Como a FDH possui um número de unidades menor por mg do sólido liofilizado em relação à GOx, foi diminuída a quantidade de unidades utilizada de GOx para a construção do biossensor bienzimático.

4.5.10 Avaliação do Desempenho Analítico dos Biossensores a Base de GOx e FDH

4.5.10.1 Influência da Concentração Enzimática

A avaliação da influência da concentração da enzima GOx no processo de imobilização foi verificada em função da resposta amperométrica do biossensor. Para isso, foram registrados cronoamperogramas dos eletrodos fixando-se o potencial em 0,200 V, em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 3,70x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose. As concentrações avaliadas da enzima foram: 2,00; 4,00; 8,00; 15,00; 132,40 e 170,00 mg mL^{-1}. Estas concentrações corresponderam a 1,50; 3,02; 6,04; 11,32; 100 e 128,00 unidades (U) de enzima para um volume de 5,00 µl adicionado no eletrodo.

Para a frutose dehidrogenase foi utilizada uma concentração de 2,00 mg mL^{-1}, correspondendo a 20,60 U de enzima em 5,00 µl para a construção dos biossensores.

4.5.10.2 Estabilidade da Enzima GOx em Solução

A estabilidade da enzima GOx em solução foi avaliada, a fim de saber quanto tempo uma mesma solução poderia ser estocada sem que houvesse perda significativa da atividade enzimática. Para este estudo, foi preparada uma solução da GOx contendo 100 U de enzima e

medidas de estabilidade por absorção na região do UV-vis foram realizadas em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5.

4.5.10.3 Estudo da Concentração do Mediador Redox

A influência da concentração do mediador na resposta amperométrica do biossensor à base de GOx e FDH foi investigada em solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de $6,89x10^{-3}$ mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose, respectivamente. A concentração do mediador tetratiafulvaleno (TTF) foi variada nos valores de 0,01; 0,05 e 0,1 mol L^{-1}.

4.5.10.4 Efeito da Porcentagem de Glutaraldeído

O efeito da quantidade de glutaraldeído na resposta amperométrica do biossensor à base de GOx e FDH foi avaliado em solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de $6,89x10^{-3}$ mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose, respectivamente. As porcentagens de glutaraldeído utilizadas para este estudo foram 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0%.

4.5.10.5 Efeito da Temperatura

Pode-se promover o aumento na velocidade de reação enzimática aumentando-se a temperatura. Sendo assim, o efeito da temperatura na resposta amperométrica dos biossensores à base de GOx e FDH foi avaliada em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de $6,89x10^{-3}$ mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose, respectivamente.

4.5.10.6 Efeito da Concentração Hidrogeniônica

A dependência da resposta amperométrica com a concentração hidrogeniônica na resposta eletródica do biossensor à base de GOx e FDH foi verificada em meio de tampão

fosfato 0,10 mol L^{-1} na presença de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose, variando-se o pH destas soluções.

4.5.10.7 Estudo da Reprodutibilidade de Preparação do Biossensor Bienzimático

A reprodutibilidade de preparação do biossensor à base de GOx e FDH foi avaliada por meio da resposta amperométrica destes dispositivos em solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose, respectivamente.

4.5.10.8 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do Biossensor Bienzimático

As medidas de repetibilidade de medida do biossensor à base de GOx e FDH foram realizadas em uma série de 5 medidas (n = 5) amperométricas, numa mesma solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose, respectivamente.

Já para os testes de reprodutibilidade de medida foram efetuadas 5 medidas (n = 5) em soluções diferentes de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose, respectivamente.

4.5.10.9 Estudo da Estabilidade do Biossensor Bienzimático

Para a determinação do tempo de vida útil do biossensor à base de GOx e FDH, realizou-se o monitoramento da resposta dos dispositivos, dia após dia, usando o mesmo eletrodo de trabalho.

Durante a avaliação do tempo de vida do biossensor, a estocagem foi feita em geladeira, a 4°C, em solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5.

4.5.10.10 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para os Biossensores

Estabelecidas as melhores condições para o desenvolvimento dos biossensores a base de GOx e FDH, construiu-se, então, as curvas analíticas em eletrólito puro pelo método da adição de padrão, em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Foram construídas curvas analíticas para a determinação de D-glicose e D-frutose, separadamente, e utilizando mistura equimolar destes dois carboidratos. As adições foram feitas em triplicata e a curva analítica construída por meio da média das correntes amperométricas de cada adição *vs* a concentração de D-glicose e D-frutose, respectivamente ou da mistura equimolar.

Foram calculados os limites de detecção (LD) que é a menor concentração de um analito detectada, mas não quantificada e de quantificação (LQ) que é definido como sendo o menor valor determinado para a metodologia proposta onde se considera que o limite do equipamento ainda não foi atingido, mas a confiabilidade atingida é de 99%.

4.5.10.11 Aplicação do Biossensor Bienzimático em Amostras de Alimentos

A determinação amperométrica simultânea da D-glicose e D-frutose em amostras de alimentos dietéticos e não dietéticos, foi realizada por meio do método de adição padrão, ou seja, além da amostra ainda foram adicionados mais volumes de solução conhecida de padrão de D-glicose juntamente com D-frutose. As amostras foram diluídas em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Para cada adição, foi realizada uma medida amperométrica.

Foram utilizadas amostras de refrigerantes dietéticos, light e não dietéticos e adoçantes, todas obtidas no comércio local.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo destina-se a apresentar os resultados obtidos com a modificação de eletrodos de ouro (Φ = 2 mm) pelo tiol cistamina, por meio da aplicação das técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. Com a caracterização das superfícies destes eletrodos recobertos por camada auto-organizada foram realizadas as imobilizações das enzimas GOx e FDH nestas superfícies e confeccionado o biossensor bienzimático. Os resultados foram obtidos por voltametria cíclica e cronoamperometria.

5.1 O Tiol Cistamina (CYS)

Foram construídos biossensores utilizando o tiol cistamina, uma vez que a ancoragem das enzimas GOx e FDH nesta SAM foi favorecida. Sabe-se que a melhor faixa de pH de trabalho para as enzimas GOx e FDH encontra-se em valores abaixo de pH=7,0. A cistamina, em pH ácido, está levemente protonada (NH^{3+}), adquirindo carga positiva. Já as enzimas GOx e FDH possuem pontos isoelétricos (valor de pH onde a molécula encontra-se neutra) em valores de 4,2 e 4,5, respectivamente. Em pHs acima destes valores ambas as enzimas adquirem carga negativa, promovendo, assim, melhor imobilização destas biomoléculas na SAM de cistamina. Como o meio reacional apresentou um pH levemente ácido (pH=6,5), este favoreceu a atração pelas espécies. Entretanto, para garantir uma imobilização estável das enzimas sobre a CYS, o glutaraldeído tem um papel fundamental. Por ser um agente bifuncional promove as ligações cruzadas entre as macromoléculas da proteína, aumentado a estabilidade das biomoléculas e garantindo maior estabilidade para o biossensor.

A cistamina, um dissulfeto, possui dois átomos de enxofre, ligados entre si e nas outras extremidades grupo amina (Figura 11). Quando imobilizada em substrato de ouro, rompe as ligações S-S, e cada um destes adsorve sobre o eletrodo de ouro[131].

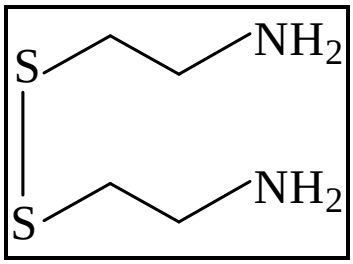

Figura 11. Estrutura da molécula de cistamina.

5.2 Caracterização dos Eletrodos de Ouro com SAM de Cistamina (SAM-CYS)

A caracterização das monocamadas auto-organizadas por diferentes técnicas, tais como, eletroquímicas e espectroscópicas, é uma etapa muito importante na modificação de eletrodos, pois, por meio delas, é possível adquirir informações sobre a transferência eletrônica de espécies redox, o excesso superficial, as irregularidades superficiais após sua formação e outras propriedades como resistência de transferência de carga e capacitância dos filmes.

A estrutura e as propriedades eletroquímicas de monocamadas auto-organizadas constituídas pela cistamina sobre eletrodo de ouro foram investigadas por meio de impedância eletroquímica e voltametria cíclica em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} contendo uma espécie redox, e em KOH 0,1 mol L^{-1}, para avaliar a dessorção redutiva das monocamadas.

5.2.1 Efeito do Tempo na Formação da SAM-CYS

Com o objetivo de se obter informações sobre a estrutura e as propriedades das monocamadas formadas sobre a superfície de ouro policristalino, observou-se o

comportamento da SAM-CYS frente a uma espécie redox. O grau de interação de uma determinada molécula redox com a superfície modificada do eletrodo é controlado por propriedades químicas e físicas desta espécie e pelas características relacionadas à organização e presença de irregularidades na SAM.

Os eletrodos de ouro foram previamente tratados como descrito na parte experimental para a formação da SAM de cistamina. O tempo de formação da SAM-CYS foi avaliado por meio de estudos eletroquímicos. Na literatura, o tempo de 2 horas de formação da SAM é o mais citado para tióis de cadeias curtas[47]. Isto foi comprovado por meio de medidas de voltametria cíclica, uma vez que para tempos de deposição da SAM-CYS acima de 2 horas, não houve mudança significativa nos valores de corrente. Na Figura 12 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo de ouro liso e modificado com cistamina, ambos em $K_4Fe(CN)_6$ 1,00x10^{-3} mol L^{-1} em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5.

Além do efeito do tempo na formação da SAM-CYS, os voltamogramas cíclicos do ouro modificado na presença de $K_4Fe(CN)_6$ mostraram maiores correntes de pico que em relação ao ouro liso,sem modificação significativa no potencial (Tabela 4).O aumento nas correntes de pico pode ser devido a uma maior disponibilidade da superfície modificada para a ocorrência do processo eletroquímico pela inibição da adsorção de impurezas ou interferentes na superfície eletródica.

Adicionalmente, a transferência eletrônica ocorre através das moléculas de alcanotióis de cadeias curtas por tunelamento direto, devido à pequena distância dos íons à superfície metálica[132].

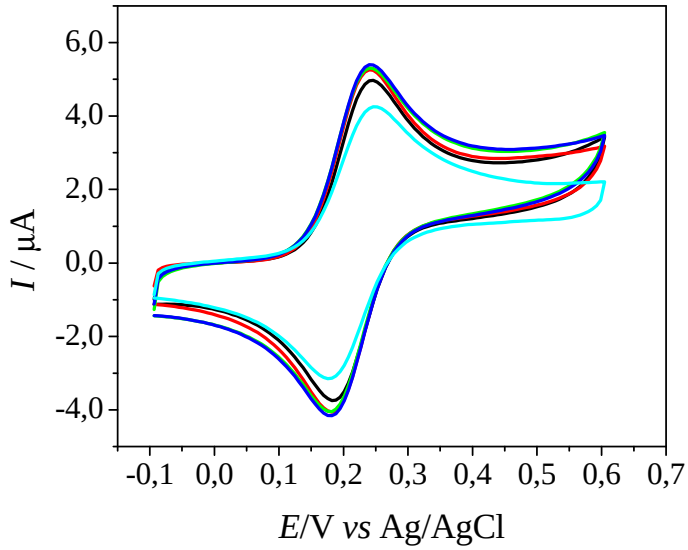

Figura 12. Voltamogramas cíclicos de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ na concentração de $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) para: eletrodo de ouro liso (—) e eletrodo de ouro modificado com cistamina nos tempos de: 2 (—); 6 (—); 12 (—) e 24 (—) horas com velocidade de varreura v = 50 mV s^{-1}.

Tabela 4. Valores de potencial de pico dos voltamogramas cíclicos para os diferentes tempos de formação da SAM-CYS.

Tempos de formação da SAM-CYS / horas	E_{pa} / *mV*	E_{pc} / *mV*
2	49,50	-37,40
6	52,50	-40,60
24	53,10	-40,62
48	54,00	-41,60
*ouro limpo	42,40	-31,50

5.2.2 Dessorção Eletroquímica

Com o propósito de dar continuidade à caracterização da SAM-CYS sobre eletrodo de ouro, foram registrados voltamogramas cíclicos para a dessorção eletroquímica em solução de KOH 0,1 mol L^{-1}, variando-se o potencial de +0,10 V a -1,30 V, com velocidade de varredura de 25 mV. O voltamograma típico obtido para o processo de adsorção por SWV está apresentado na Figura 13.

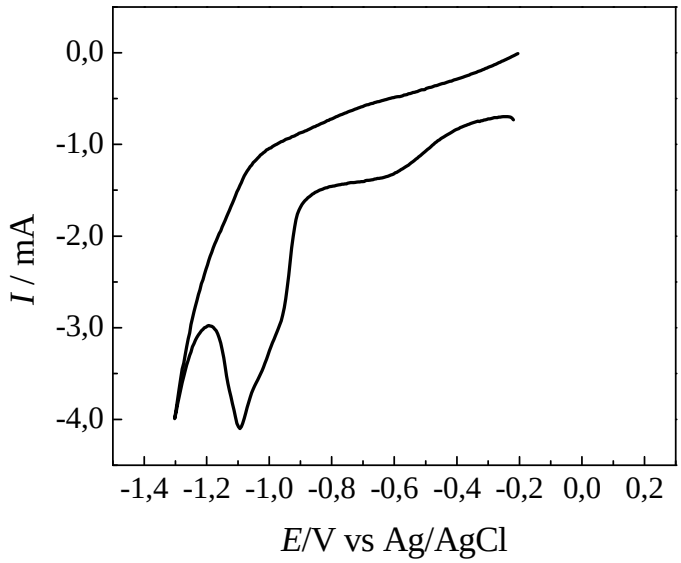

Figura 13. Voltamograma cíclico obtido para o tempo de 2 horas de deposição da SAM-CYS em solução de KOH 0,1 mol L^{-1}. Potencial: +0,10 V a -1,30 V com f = 100 s^{-1}, $\triangle E_s$ = 2 mV e a = 50 mV.

Os tióis sofrem dessorção redutiva quando potenciais mais negativos são aplicados em eletrodos metálicos. Para que ocorra a dessorção eletroquímica, as superfícies recobertas são imersas em solução aquosa ou etanólica (pH neutro ou básico). Após a dessorção, tanto o tiolato como a superfície metálica se solvatam. Parte do tiolato solvatado se difunde da superfície, enquanto parte pode ser readsorvido se o potencial aplicado retornar para valores positivos.

O processo físico-químico envolvido na adsorção (6) e dessorção eletroquímica (7) de tióis está representado nas seguintes reações:

$$Au + HSR \rightarrow Au - SR + H^+ + e^- \quad (6)$$

$$Au - SR + e^- \rightarrow Au + SR^- \quad (7)$$

Os estudos de mecanismo deste processo sugerem que a dessorção ocorre primeiramente nas regiões de defeitos das SAMs para prosseguir para regiões melhores organizadas e mais empacotadas.

A redução eletroquímica de alcanotióis é um fenômeno que pode ser utilizado para a caracterização de suas monocamadas construídas sobre metais e a carga envolvida na dessorção redutiva pode ser empregada para determinação da quantidade de moléculas adsorvidas sobre a superfície metálica.

Quando se observa a Figura 13 percebe-se que a SAM-CYS apresenta mais de um pico de redução. A presença desses picos de dessorção ainda não é bem compreendida, uma vez que, segundo a teoria da redução dessortiva, este fenômeno é realizado via um processo monoeletrônico, o que não explica o aparecimento de mais de um pico de redução. O surgimento de outros picos pode ser atribuído tanto aos diferentes domínios cristalinos na superfície do ouro policristalino, quanto à presença de moléculas de alcanotióis fracamente ligadas à superfície eletródica, presentes nas regiões de irregularidades das SAMs. O comportamento do pico localizado em potenciais mais anódicos é uma forte evidência do rompimento da ligação RS-Au, e pode ser utilizado para o cálculo do excesso superficial da molécula de alcanotiól na superfície do ouro, por ser o pico mais estável.

Baseado nisso, a localização e a intensidades dos picos de dessorção podem ser utilizados na caracterização das monocamadas, com relação ao excesso superficial (Γ) e estabilidade, a partir dos voltamogramas cíclicos para os diferentes tempos de formação, medidos pela integral da carga (*Q*) dos respectivos valores obtidos nestes voltamogramas do pico catódico de dessorção do tiol[133] e por meio da equação:

$$\Gamma = \frac{Q}{nFA} \qquad (8)$$

onde, Γ o excesso superficial (mol cm^{-2}), *Q* a carga (obtida pela integração da área do pico de dessorção) *F* é constante de faraday, *n* é o número de elétrons transferido por molécula de espécie ativa e *A* é a área eletroativa do eletrodo (0,12 cm^2). Os resultados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores dos excessos superficiais, Γ, obtidos a partir da primeira varredura redutiva, do eletrodo de ouro recoberto com diferentes tempos de formação da SAM-CYS.

Tempos	*Γ/mol cm^{-2}*
Au-CYS 2 horas	$10{,}30 \times 10^{-10}$
Au-CYS 6 horas	$10{,}80 \times 10^{-10}$
Au-CYS 12 horas	$10{,}85 \times 10^{-10}$
Au-CYS 24 horas	$10{,}92 \times 10^{-10}$

A Figura 14 mostra a variação de excesso superficial para tempos de SAM-CYS. Nota-se que com o aumento do tempo ocorre um aumento do recobrimento do eletrodo de ouro. Contudo, nota-se também que após um determinado tempo existe uma estabilização do recobrimento da superfície.

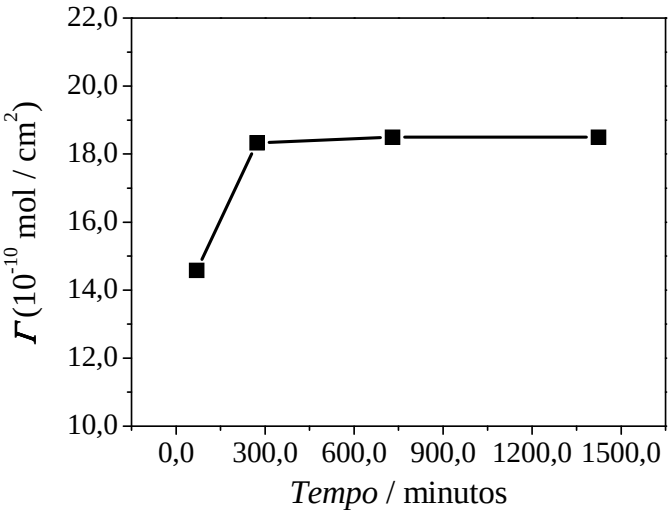

Figura 14. Variação do excesso superficial, Γ, para o eletrodo de ouro recoberto com diferentes tempos de formação da SAM-CYS.

Antes de analisar estes dados é importante recordar a definição de excesso superficial. O excesso superficial é o número de moles, em excesso, na superfície do eletrodo, se comparado com uma referência (o seio da solução, por exemplo). Assim:

$$\eta_i^{\sigma} = \eta_i^{S} - \eta_i^{R} \qquad (9)$$

Onde η_i^{σ} é a quantidade em excesso e η_i^{S} e η_i^{R} são os números de moles da espécie na superfície (S) e no sistema de referência (R).

Para a superfície do eletrodo, podemos definir o excesso superficial como Γ:

$$\Gamma_i = \frac{\eta_i^{\sigma}}{A} \qquad (10)$$

Obviamente, este valor de Γ está diretamente relacionado com a forma com que a espécie adsorvida interage com a superfície do eletrodo. Assim, se uma molécula se adsorve sobre um sítio ativo da superfície, seu excesso superficial será maior que aquela que se adsorve em 2 ou mais. Este comportamento foi analisado por Stolberg *et al.*[134] para a adsorção de piridina sobre Au policristalino. Para a adsorção horizontal da molécula, um valor máximo de $\Gamma_{máx}$ = 3x10^{-10} mol cm^{-2} foi encontrado, enquanto que, para a adsorção vertical $\Gamma_{máx}$ aumentou para 7x10^{-10} mol cm^{-2}.

Shervedani *et al.*[110] avaliaram o grau de recobrimento (Γ) da superfície pela SAM de 3-AMP por meio da integração da corrente de pico catódica associada com o processo de dessorção da SAM em meio de NaOH utilizando voltametria cíclica. A carga da primeira varredura cíclica foi de 53 μC cm^{-2}. Assumindo o envolvimento de 1 elétron no processo de redução (Au-SR+e− → Au+RS−) a carga de 53 μC cm^{-2} foi convertida à uma concentração de 5,55x10^{-10} mol cm^{-2}. Os autores compararam o valor obtido com o valor ideal de 7,68 x10^{-10} mol cm^{-2} em relação ao arranjo do ouro policristalino, o que demonstrou que cerca

de 73,00±2% do eletrodo de ouro foi recoberto pelo 3-AMP. Foi ressaltada a estabilidade da SAM em um intervalo de potenciais entre +0,800 e –0,700 V *vs*. ECS, possibilitando uma janela de potencial satisfatória para estudar boa parte de reações redox envolvendo biomoléculas. Dessa forma, de acordo com dados reportados na literatura[135,136], valores de Γ acima de 10^{-10} comprovam a formação completa de uma monocamada de alcanotiol.

Observando os dados apresentados na Tabela 5, nota-se que o tempo de 24 horas apresentou melhor recobrimento. Entretanto, todas as variações de tempo apresentaram um Γ de mesma grandeza (10^{-10}), enfatizando, novamente, que o tempo de 2 horas foi suficiente para garantir um recobrimento máximo da SAM-CYS sobre o eletrodo de ouro.

Esse fato foi comprovado por meio de medidas de impedância eletroquímica (Figura 16), onde se observou que a reação de transferência eletrônica foi favorecida para o eletrodo de ouro modificado com SAM-CYS, seguida de etapa de difusão. O eletrodo de ouro liso apresentou um perfil de transferência eletrônica para altas freqüências e um comportamento difusional a baixas freqüências (Figura 15).

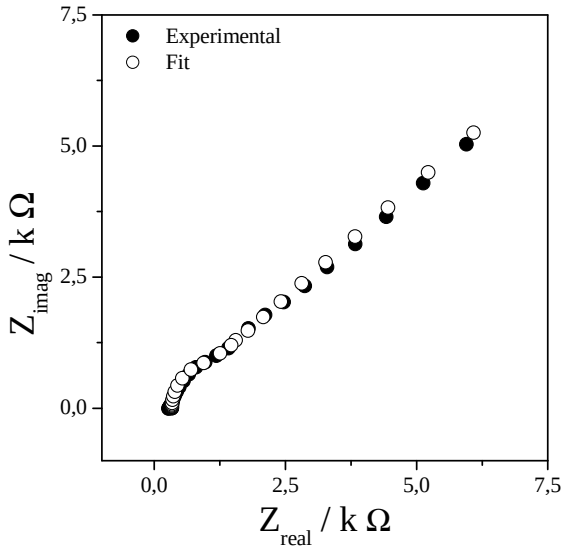

Figura 15. Gráfico de Nyquist para o eletrodos de ouro liso em 1,00x10^{-3} mol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ em tampão fosfato pH = 6,5. Intervalo de freqüência: 100 mHz a 10 kHz. As medidas foram realizadas em potencial fixo igual a 0,200 V *vs* Ag/AgCl**.**

A Figura 16 mostra os gráfico de Nyquist obtidos para o eletrodo modificado pela imersão em diferentes tempos na solução de cistamina, em uma solução contendo $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6$ em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH = 6,5. Foi escolhido um valor de potencial fixo referente ao potencial de transferência de carga de oxidação do ferro no complexo de potássio (0,180 V *vs* Ag/AgCl). Os valores obtidos pela simulação das resistências de transferência de carga para as superfícies de Au modificadas pela cistamina são tão baixos quanto àqueles obtidos para o Au liso. Desta forma, os diagramas de Nyquist abaixo mostram um processo controlado exclusivamente pela difusão dos íons $Fe(CN)_6^{4-}/Fe(CN)_6^{3-}$.

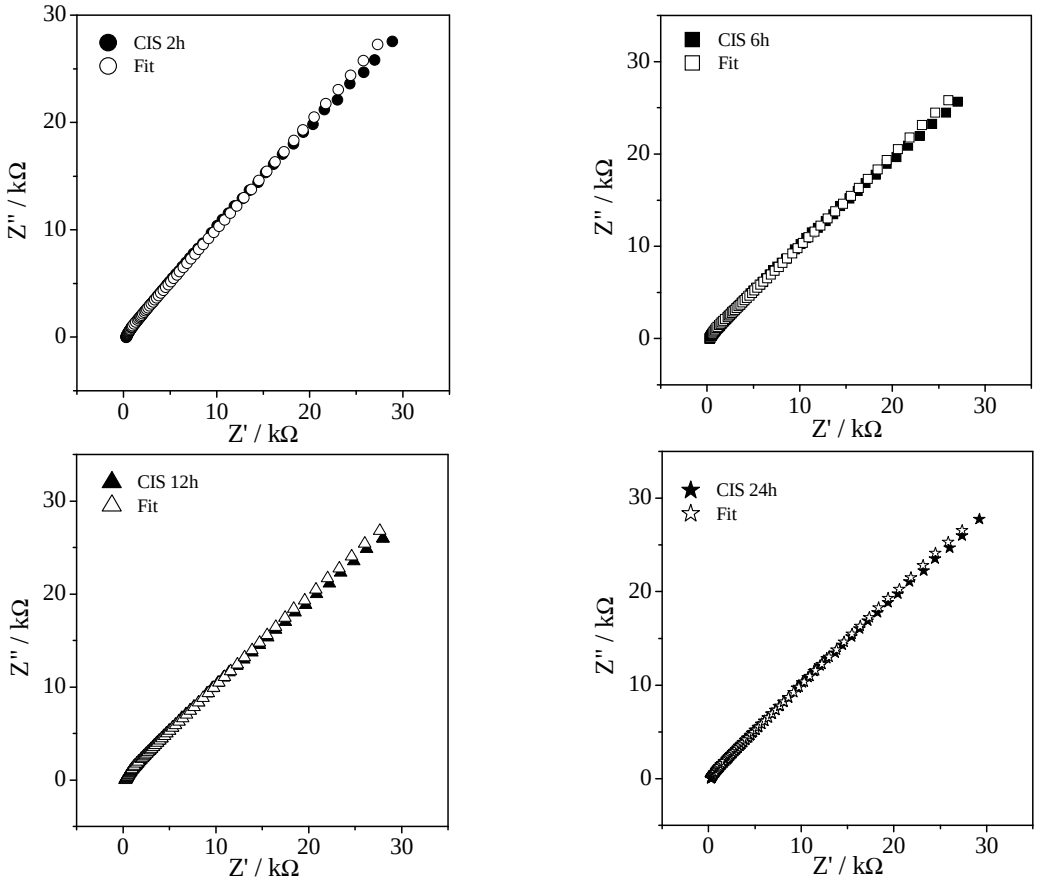

Figura 16. Gráfico de Nyquist para os eletrodos de ouro recobertos com diferentes tempos de cistamina, em $1{,}00x10^{-3}$ mol L^{-1} de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ em tampão fosfato pH = 6,5. Intervalo de freqüência: 100 mHz e 10 kHz. As medidas foram realizadas em potencial fixo igual a 0,180 V *vs* Ag/AgCl**.**

5.3 Construção dos Biossensores a Base das enzimas GOx e FDH

5.3.1 Modificação das Camadas Auto-Organizadas com as Enzimas Glicose Oxidase (GOx) e Frutose Dehidrogenase (FDH): Otimização e Aplicação

Após o estudo da formação da SAM-CYS sobre eletrodo de ouro, iniciou-se o método para a imobilização das enzimas GOx e FDH de acordo com o procedimento descrito na parte experimental.

5.3.1.1 Influência da Concentração Enzimática

Iniciou-se a avaliação do desempenho do biossensor a base da enzima GOx, por meio da resposta amperométrica verificada em função da concentração de enzima no processo de imobilização, enquanto que os volumes dos outros componentes permaneceram constantes. As concentrações da GOx utilizadas 2,00; 4,00; 8,00; 15,00; 132,40 e 170,00 mg mL^{-1} foram convertidas em unidade enzimática, correspondendo a 1,50; 3,02; 6,04; 11,32; 100,00 e 128,00 unidades (U) de enzima para um volume de 5,00 µl adicionado no eletrodo.

A Figura 17 mostra o efeito da quantidade da GOx nos valores de corrente limite de difusão do mediador TTF, em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo $3{,}70 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de D-glicose. É possível constatar que não houve aumento significativo na resposta com a concentração da GOx maior que 132,40 mg mL^{-1} (100 U em 5 µl).

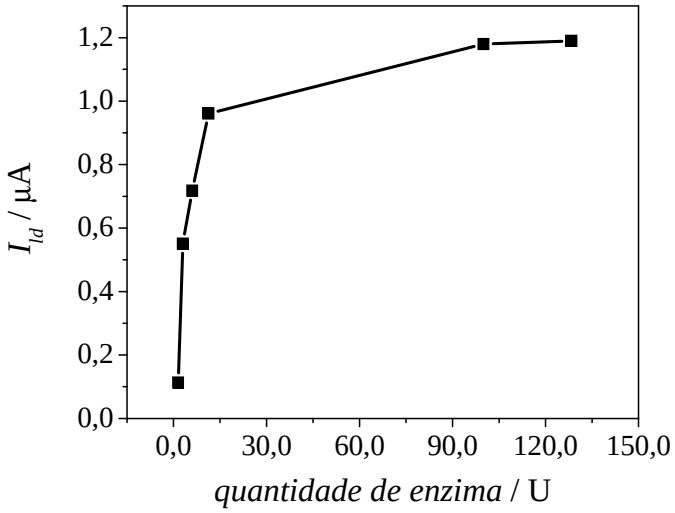

Figura 17. Efeito da quantidade de enzima na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 3,70x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl.

5.3.1.2 Estabilidade da Enzima GOx em Solução

A estabilidade da enzima em solução foi avaliada, a fim de se conhecer o tempo em que essa solução poderia ser estocada sem que houvesse perda significativa da resposta enzimática e, desse modo, garantir que os resultados posteriores não possam ser atribuídos apenas à decomposição da enzima. Durante este estudo a solução da GOx (132,40 mg mL^{-1}) foi armazenada sob refrigeração (aproximadamente -20°C) e foram realizadas medidas diárias de absorção na região do UV-vis, com absorção em comprimentos de onda de aproximadamente 200 nm e 276 nm, respectivamente, como mostrado na Figura 18. Foram analisados os dois picos de absorbância, os quais apresentaram a mesma resposta de acordo com o tempo. Na Figura 19, estão apresentados os resultados referentes ao pico de absorbância em 276 nm, onde observa-se que somente após 40 dias de análise a enzima começa a perder resposta, dessa forma, a mesma pode ser armazenada por esse tempo sem que ocorra perda significativa na resposta do biossensor.

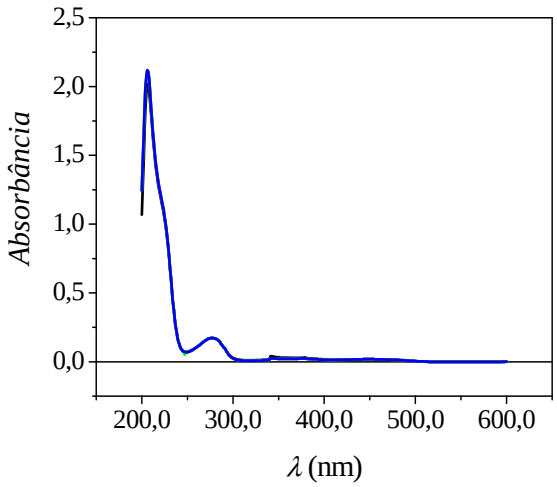

Figura 18. Espectro de absorção da enzima GOx (132,40 mg mL^{-1}) com o tempo de estocagem da solução: (—) 1, (—) 2, (—) 6, (—) 15 (—); 29 (—); 40 (—) dias (espectros sobrepostos).

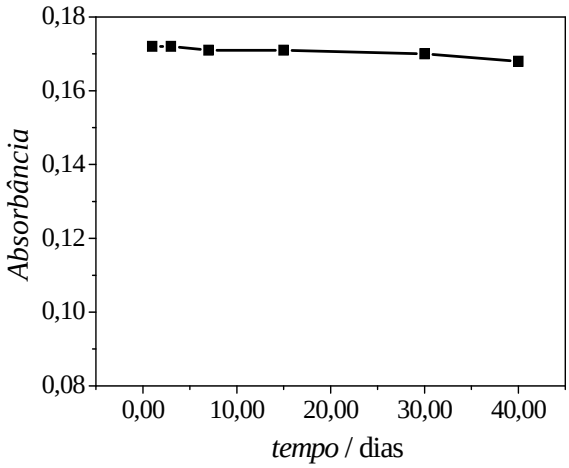

Figura 19. Efeito do tempo de estocagem da solução da enzima GOx (132,40 mg mL^{-1}) em relação à absorbância (λ = 276 nm).

5.3.1.3 Determinação do Potencial de Trabalho

O potencial de trabalho a ser utilizado pelo biossensor no monitoramento do produto de reação enzimática, foi determinado utilizando-se voltametria cíclica, para encontrar o pico de oxidação do mediador de elétrons TTF (Figura 20 e Figura 21), que ocorre somente após a adição do substrato de interesse na célula eletroquímica. O potencial de pico da oxidação do TTF é observado em aproximadamente 200 mV, ou seja, logo após a corrente limite de difusão, garantindo que o máximo de espécie chegue à superfície do eletrodo.

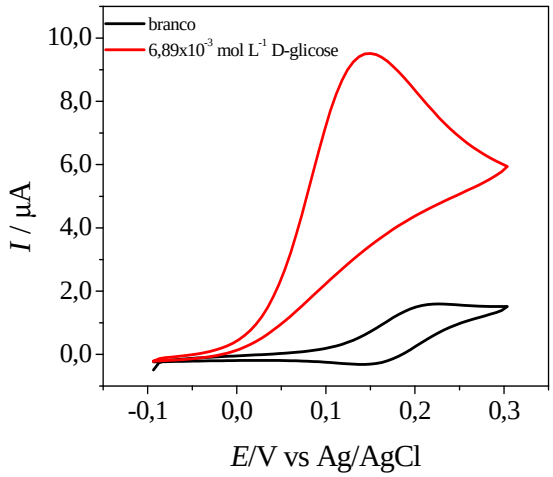

Figura 20. Voltamogramas cíclicos obtidos para a adição de D-glicose (100 U de GOx) em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) onde: branco (—) e adição de 6,89x10^{-3} mol L-1 de D-glicose (—).

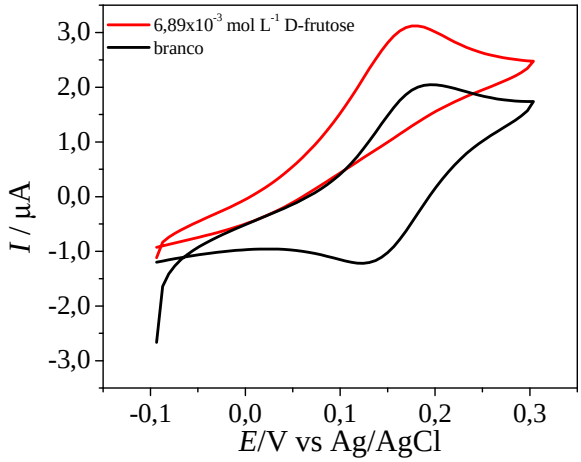

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos para a adição de D-frutose (20,6 U FDH) em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5) onde: branco (—) e adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-frutose (—).

5.3.1.4 Estudo da Concentração do Mediador Redox

O tetratiafulvaleno (TTF), representado na Figura 22, é utilizado como mediador redox, devido ao seu efeito eletrocatalítico na oxidação da D-glicose e D-frutose, aumentando a velocidade da reação de transferência de elétrons.

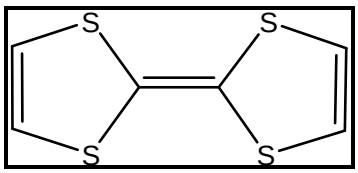

Figura 22. Representação da molécula de tetratiafulvaleno.

A influência da concentração do mediador TTF na resposta cronoamperométrica (corrente limite de difusão da oxidação do TTF) do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU foi investigada na presença de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, como é mostrada na Figura 23 e na Figura 24. O sinal do biossensor aumentou com a concentração de TTF de 0,01 a 0,1 mol L^{-1}, porém acima deste valor, houve dificuldade na preparação do biossensor causando instabilidade nas medidas experimentais, sendo assim, utilizou-se de 0,1 mol L^{-1} de TTF.

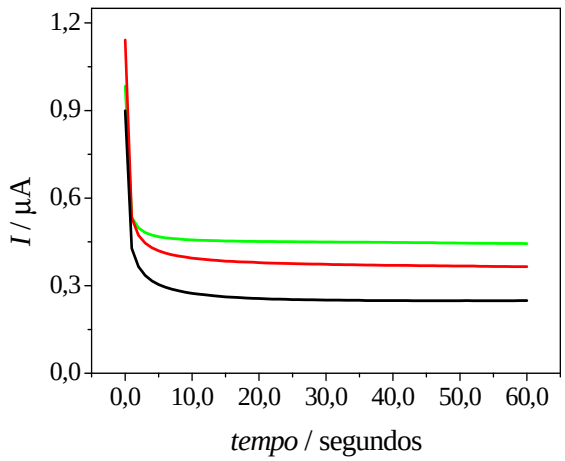

Figura 23. Cronoamperogramas obtidos para a variação na concentração do mediador TTF com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 0,01 (—); 0,05 (—) e 0,1 (—) mol L^{-1} de TTF.

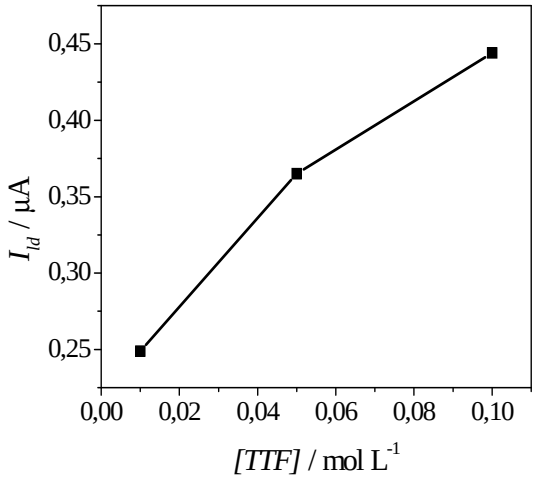

Figura 24. Influência da concentração do mediador TTF na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl.

Como exemplo, a reação que determina a oxidação do substrato D-glicose, na presença do mediador TTF é dada por:

$$\begin{aligned} &D-glicose+GOx+FAD+H^+ \rightarrow gliconolactona+GOx_{red}+FADH \\ &FADH + 2TTF^+ + H^+ \rightarrow FAD + 2TTF + 2H^+ \\ &2TTF \rightarrow 2TTF^+ + 2e^- \end{aligned} \qquad (11)$$

5.3.1.5 Efeito da Porcentagem de Glutaraldeído

Outro parâmetro importante para se avaliar é a porcentagem de glutaraldeído, que é um agente bifuncional responsável pela formação de ligações cruzadas entre as macromoléculas da proteína, aumentando sua estabilidade e fixando-a melhor à superfície do eletrodo. A Figura 25 apresenta os cronoamperogramas para o efeito da porcentagem de glutaraldeído e a Figura 26 e mostram o efeito da quantidade de glutaraldeído (%) na corrente limite de difusão da oxidação do TTF, em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose.

Pode-se observar que o aumento da porcentagem de glutaraldeído além de não melhorar a resposta do eletrodo (não houve aumento da corrente), ainda causa uma instabilidade na medida, desta forma optou-se por trabalhar com uma solução contendo 0,5% de glutaraldeído, para garantir maior estabilidade ao biossensor, visto que para 0,1% de glutaraldeído a resposta foi praticamente a mesma.

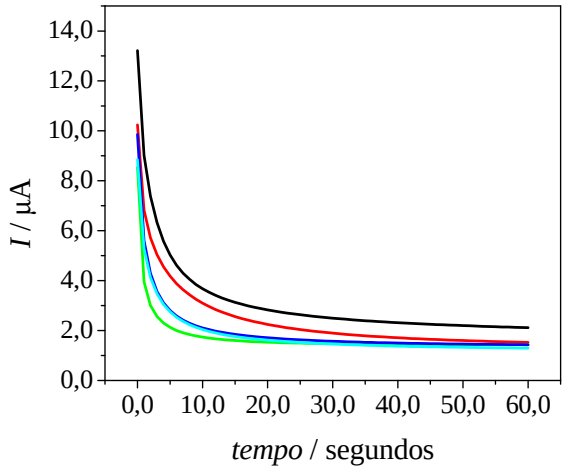

Figura 25. Cronoamperogramas obtidos para a variação na porcentagem de glutaraldeído com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose e D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 0,1% (—); 0,5% (—); 1,00% (—); 5,00% (—) e 10,00% (—) de glutaraldeído.

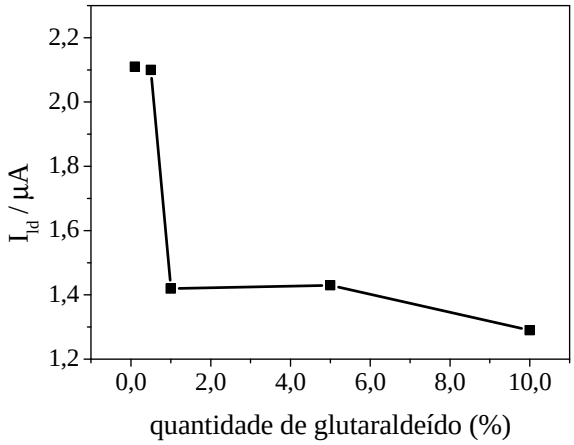

Figura 26. Efeito da quantidade de glutaraldeído na resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl.

5.3.1.6 Efeito da Temperatura

Os experimentos de temperatura, foram realizados no intuito de se avaliar a perda da resposta enzimática com o aumento de temperatura, para as enzimas GOx e FDH, separadamente, em solução contendo o substrato D-glicose e D-frutose, por meio de medidas amperométricas.

Para o biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU As temperaturas variaram de 15 a 50 ºC como pode ser visto na Figura 27 e na Figura 28, respectivamente.

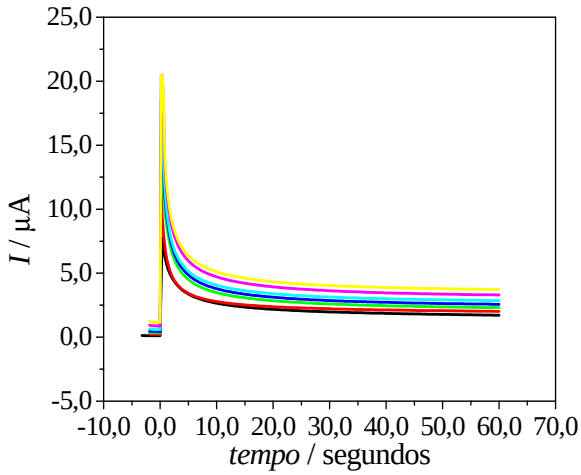

Figura 27. Cronoamperogramas obtidos para a variação de temperatura com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-glicose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 15°C (—); 25°C (—); 30°C (—); 35°C (—); 40°C; (—); 45°C (—) e 50°C (—).

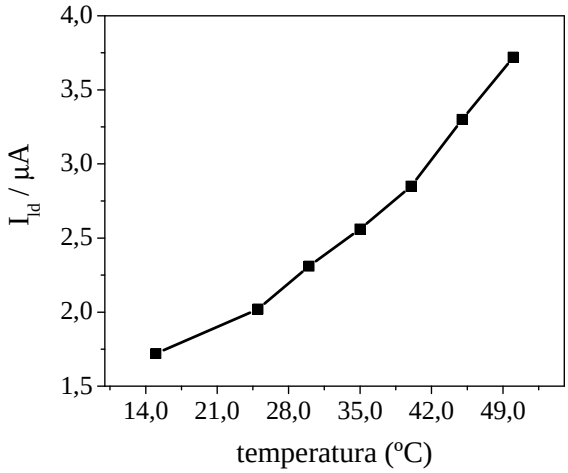

Figura 28. Dependência da resposta do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU em função da temperatura em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl.

Pode-se observar que com o aumento da temperatura, houve aumento da corrente obtida, aumentando a velocidade de reação e indicando que não houve perda na resposta da enzima. Desta forma, optou-se por trabalhar com a temperatura de 35ºC, pois esta é próxima da temperatura normal de operação da biomolécula no organismo, diminuindo possíveis problemas de desnaturação da enzima.

Os experimentos de temperatura para o biossensor Au-CYS-TTF-FDH-GLU, foram realizados por meio de medidas cronoamperométricas para a solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-frutose. As temperaturas variaram de 25 a 45 ºC como pode ser visto na Figura 30.

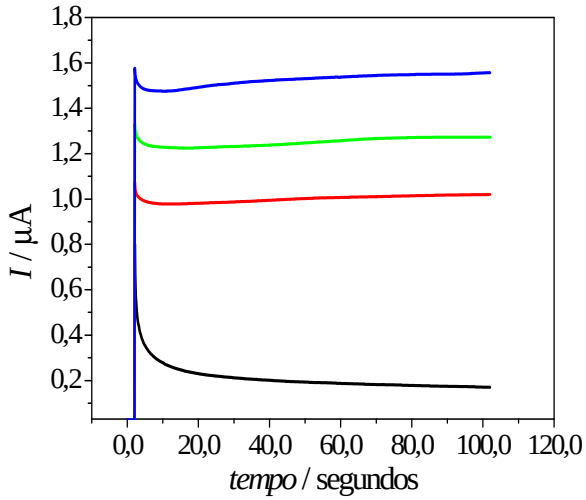

Figura 29. Cronoamperogramas obtidos para a variação de temperatura com adição de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} D-frutose em tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} (pH = 6,5), onde: 25°C (—); 30°C (—); 35°C (—) e 40°C (—).

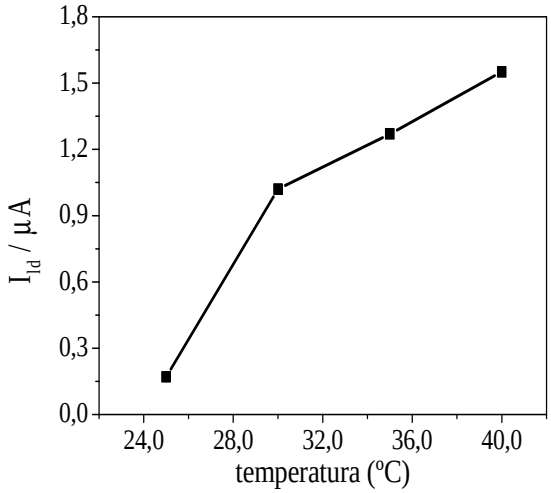

Figura 30. Dependência da resposta do biossensor Au-CYS-TTF-FDH-GLU em função da temperatura em solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH=6,5), contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-frutose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl.

Pode-se observar que com o aumento da temperatura, houve aumento da corrente obtida, aumentando a velocidade de reação e indicando que não houve perda na resposta da enzima. Desta forma, optou-se por trabalhar com a temperatura de 35ºC, pois esta é próxima da temperatura normal de operação da biomolécula no organismo, diminuindo possíveis problemas de desnaturação da enzima.

5.3.1.7 Efeito da Concentração Hidrogeniônica

A influência da concentração hidrogeniônica do meio na resposta cronoamperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU foi examinada na faixa de pH entre 5,5 e 8,5 em meio de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} na presença de D-glicose e D-frutose. Os resultados são apresentados na Figura 31, onde se observa o aumento da corrente com o aumento do pH até adquirir um valor máximo em pH=6,5. A partir desta condição, a corrente diminuiu novamente. O valor de pH=6,5 foi adotado para o desenvolvimento de metodologia e aplicação deste biossensor.

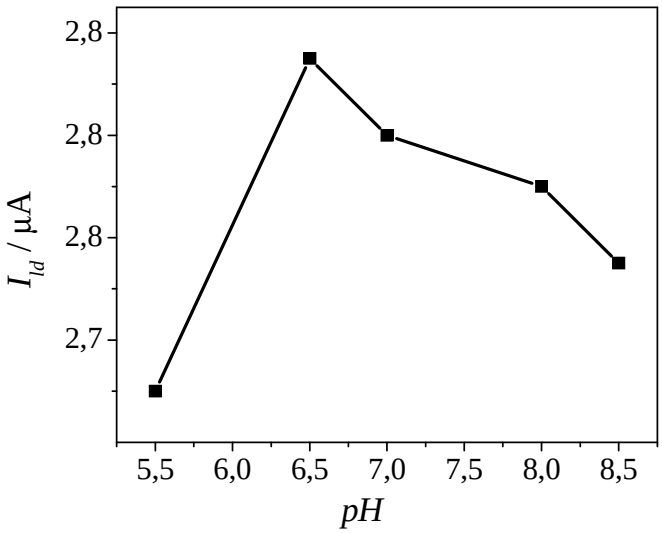

Figura 31. Dependência da resposta amperométrica do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em função do pH em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1}, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC.

5.3.1.8 Efeito do Eletrólito Suporte para a enzima Frutose Dehidrogenase

De acordo com a literatura[137] o melhor eletrólito suporte para o estudo da reação da enzima D-frutose 5-dehidrogenase (FDH) é o tampão McIlvaine.

O tampão McIlvaine trata-se de uma mistura de Na_2HPO_4 e ácido cítrico, em concentrações que podem variar. Para este estudo foi utilizada uma solução de Na_2HPO_4 de 0,2x10^{-3} mol L^{-1} juntamente com 0,1x10^{-3} mol L^{-1}de ácido cítrico, este procedimento foi adotado de acordo com dados obtidos da literatura[115].

Desta forma, os estudos com a FDH iniciaram avaliando-se o efeito do tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} e do tampão McIlvaine.

A Figura 32 apresenta os cronoamperogramas para os eletrólitos suporte em estudo. Nota-se que para o tampão fosfato de sódio a magnitude de corrente é muito superior em relação ao tampão McIlvaine. Provavelmente, este aumento da corrente é resultado da concentração de tampão fosfato de sódio ser superior ao da solução de McIlvaine,

promovendo um aumento do agente de transporte de carga. Assim, para aplicação do biossensor bienzimático foi escolhido o tampão fosfato, uma vez que as respostas para este eletrólito foram satisfatórias e, dessa forma, o desenvolvimento da metodologia para a FDH foi também realizado em meio de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1}.

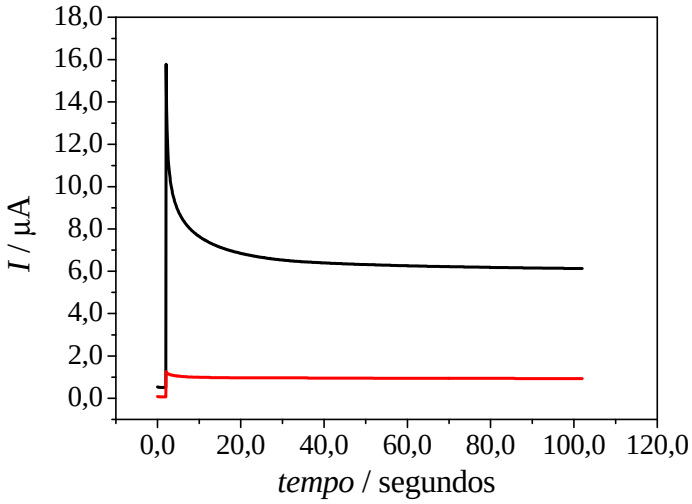

Figura 32. Cronoamperogramas obtidos para a FDH em diferentes eletrólitos suporte, onde: solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5 (—) e solução de tampão McIlvaine pH = 6,5 (—). Concentração de D-frutose de $6,89x10^{-3}$ mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC.

5.3.1.9 Estudo da Reprodutibilidade de Preparação dos Biossensores Bienzimáticos

A reprodutibilidade de preparação dos biossensores foi estimada usando a resposta da corrente amperométrica de 5 eletrodos diferentes (n=5) seguindo o mesmo esquema de montagem Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo $6,89x10^{-3}$ mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose com T=35ºC. A reprodutibilidade foi avaliada usando o desvio padrão relativo (DPR) e foi de 5,60%.

5.3.1.10 Estudo da Repetibilidade e Reprodutibilidade de Medida do Biossensor Bienzimático

As medidas de repetibilidade do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU foram realizadas em uma série de 5 medidas (n = 5) numa mesma solução, na concentração de 6,89,0x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose, em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde o DPR foi de 1,01 %. Para os testes de reprodutibilidade do método foram efetuadas 5 medidas (n = 5) em soluções diferentes, com concentração de 6,89,0x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose, em meio de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde o DPR foi de 1,80 %.

5.3.1.11 Estudo da Estabilidade do Biossensor Bienzimático

Para verificar o tempo de vida do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU, foram feitas medidas diárias usando sempre o mesmo biossensor. Os resultados estão apresentados na Figura 33, onde é possível observar uma considerável estabilidade até o trigésimo dia e, após este período, a resposta começa apresentar uma redução diária. Cabe ressaltar que mesmo com esta diminuição da resposta, o biossensor ainda apresenta sensibilidade suficiente para ser utilizado em análises de rotina.

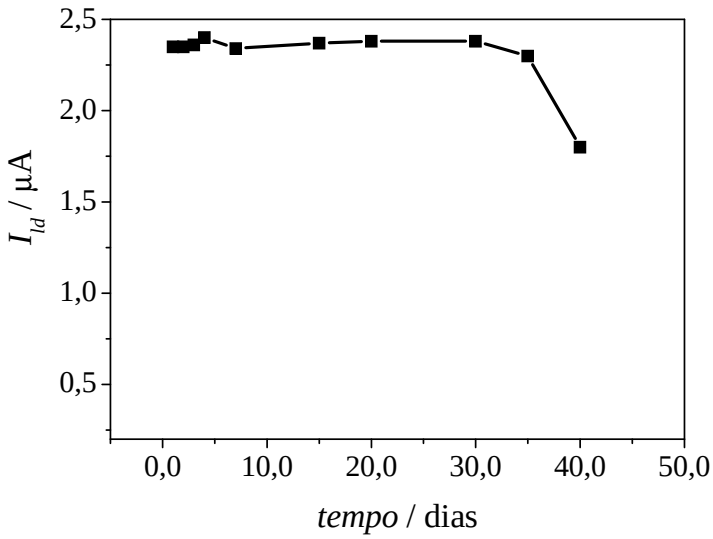

Figura 33. Efeito do tempo de estocagem do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU para análise diária em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, contendo 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC.

5.3.1.12 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-GOx-GLU

Estabelecidas as melhores condições para, construiu-se a curva analítica, por meio da investigação do sinal amperométrico do biossensor com o aumento contínuo da concentração de D-glicose em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. A Figura 34 apresenta três cronoamperogramas que mostram a dependência da corrente de oxidação do TTF com a adição de D-glicose, a fim de mostrar a reprodutibilidade das medidas. Ainda na Figura 34 está inserida a curva analítica construída por meio da média das correntes limite de difusão obtidas da oxidação do TTF *vs* a concentração da D-glicose.

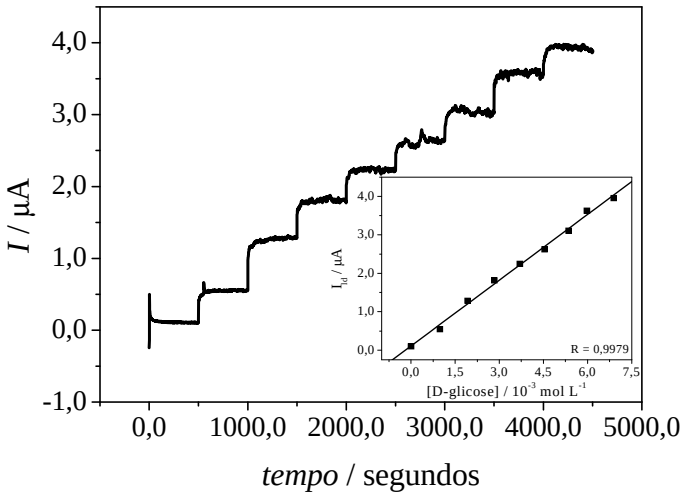

Figura 34. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração de D-glicose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC. *Inserido*: Média da dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose. Faixa linear de concentração de D-glicose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se o desvio padrão da média aritmética de dez amperogramas de brancos, obtidos das correntes médias no mesmo potencial do pico de oxidação do TTF, e a relação mostrada abaixo[138,139].

$$LD = \frac{3S_B}{b} \qquad (12)$$

onde S_B é o desvio padrão da média aritmética da correntes do voltamogramas do branco, no potencial equivalente à oxidação do TTF e *b* o valor do coeficiente angular da curva analítica. O limite de detecção obtido foi de 0,24 mg L^{-1} (1,33x10^{-6} mol L^{-1}).

Além do limite de detecção, o limite de quantificação (LQ) foi também avaliado. Considerando-se a metodologia proposta o valor de LQ é dado pela relação[138,139]:

$$LQ = \frac{10\,S_b}{B} \qquad (13)$$

O valor de LQ obtido para a D-glicose foi de 0,82 mg L^{-1} (4,55x10^{-6} mol L^{-1}).

Para o eletrodo Au-CYS-TTF-GOx-GLU, calculou-se a constante aparente de Michaelis-Menten (K_M^{app}) com base na curva analítica representada na Figura 34. Essa

constante é um parâmetro importante, que fornece informação sobre a cinética enzimática. Segundo a equação de Michaelis-Menten, a cinética enzimática[140] pode ser descrita em princípio por:

$$V = K_2[GOx]\,[glicose] / K_M + [glicose] \quad (14)$$

Para a construção dos eletrodos é desejável obter mais baixo valor de K_M e V mais elevado. Em outras palavras, quanto menor o K_M maior a atividade enzimática.

Por meio de uma relação recíproca, a equação inicialmente descrita por Lineweaver-Burk relaciona os valores de correntes obtidos a partir do gráfico I vs concentração de glicose (Figura 34) dado por:

$$1 / I_{ss} = 1 / I_{max} + K_M^{app} / I_{max}\, C \quad (15)$$

onde, I_{ss} é a corrente de estado estacionário após adição de glicose, I_{max} é a corrente máxima obtida após a saturação da curva e C é a concentração de glicose da solução.

Utilizando a equação 15 obteve-se $K_M^{app} = 4{,}16 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}. Esse valor de K_M^{app} é alto, em comparação com a literatura[141]. Isto se deve, provavelmente, a não saturação completa dos sítios ativos da GOx, não permitindo que esta catalise eficientemente a oxidação da glicose.

5.3.1.13 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-FDH--GLU

Foi construída a curva analítica para o biossensor Au-CYS-TTF-FDH-GLU, por meio da investigação do sinal amperométrico do biossensor com o aumento contínuo da concentração de D-frutose em solução de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. A Figura 35 apresenta o cronoamperograma que mostra a dependência da corrente de oxidação do TTF com a adição de D-frutose. Na mesma Figura 35 está inserido o gráfico que mostra a

dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF *vs* a concentração da D-frutose.

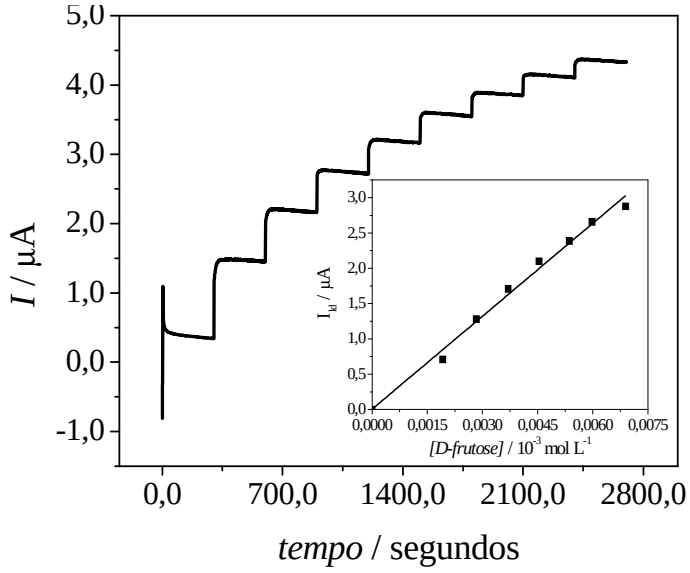

Figura 35. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração de D-frutose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC. *Inserido*: Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-frutose. Faixa linear de concentração de D-frutose: 0,98x10^{-3} a 3,70x10^{-3} mol L^{-1}.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos por meio das equações 12 e 13 foram de 0,18 mg L^{-1} (1,00x10^{-6} mol L^{-1}) e 0,63 mg L^{-1} (3,5x10^{-6} mol L^{-1}), respectivamente.

Assim como para o biossensor à base da GOx, foi calculado o valor de K_M^{app} o biossensor Au-CYS-TTF-FDH-GLU. O valor encontrado por meio da equação 15 foi de K_M^{app} = 1,30x10^{-2} mol L^{-1}. Esse valor de K_M^{app} está de acordo com resultados obtidos na literatura[142].

5.3.1.14 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Au-CYS-TTF-FDH--GLU

Após conhecidos os comportamentos dos biossensores a base de GOx e FDH, fez-se a determinação analítica para o biossensor utilizando as duas enzimas simultaneamente. Dessa forma, foi verificado o comportamento do biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU, por meio de medidas de voltametria cíclica em meio de 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose (Figura 36). Em uma mesma solução de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH=6,5 foram adicionados 6,89x10^{-3} mol L^{-1} de D-glicose e D-frutose simultaneamente a fim de verificar o sinal obtido desta mistura (Figura 37).

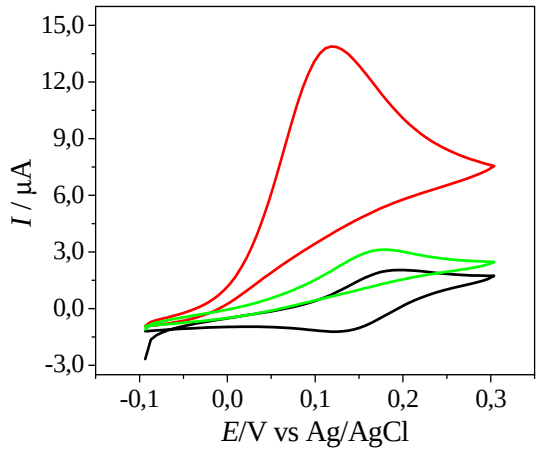

Figura 36. Voltamogramas obtidos para a adição de D-glicose e D-frutose, em soluções separadas de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: branco (—); D-glicose (—) e D-frutose (—). Concentração de D-glicose e D-frutose: 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. T=35ºC (100 U GOx).

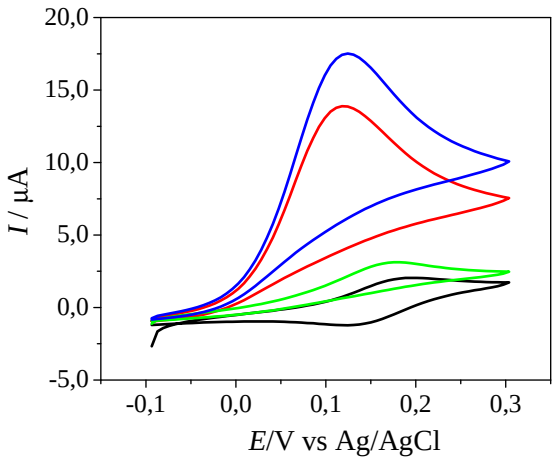

Figura 37. Voltamogramas obtidos para a adição de D-glicose e D-frutose, em soluções separadas de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: branco (—); D-glicose (—) e D-frutose (—). (—) Voltamograma para a D-glicose e D-frutose juntas na mesma solução. Concentração de D-glicose e D-frutose: 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. T=35ºC. (20,6 U FDH).

5.3.1.15 Desenvolvimento de Metodologia Analítica para o Biossensor Bienzimático

Depois de construídas as curvas de trabalho para a determinação dos açúcares D-glicose e D-frutose, separadamente, a fim de verificar a potencialidade do biossensor bienzimático, fez-se então, a determinação simultânea dos carboidratos por meio de adições

padrão de uma mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, como apresentado na Figura 38. Na mesma está inserido o gráfico que mostra a dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF *vs* a concentração da mistura equimolar de D-glicose + D-frutose.

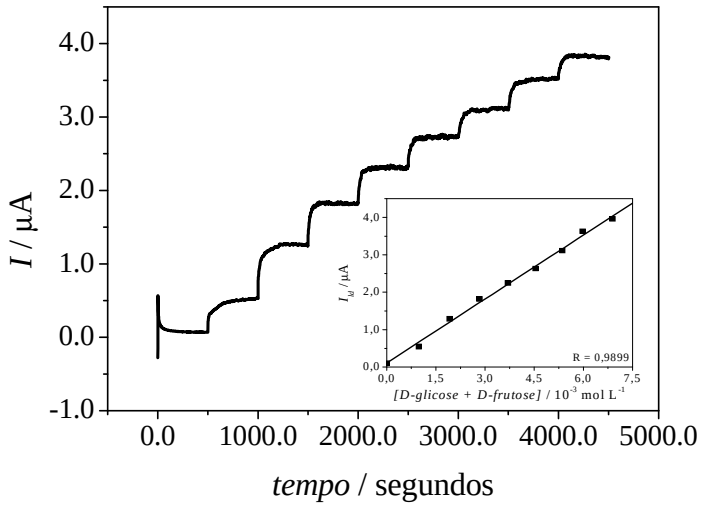

Figura 38. Cronoamperograma obtido para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5. Faixa de concentração da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 6,89x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC. *Inserido*: Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração da mistura D-glicose+D-frutose. Faixa linear de concentração: 0,98x10^{-3} a x10^{-3} mol L^{-1}.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos por meio das equações 12 e 13 foram de 0,26 mg L^{-1} (1,44x10^{-6} mol L^{-1}) e 0,91 mg L^{-1} (5,05x10^{-6} mol L^{-1}), respectivamente.

A potencialidade da metodologia foi então testada realizando-se medidas de recuperação em amostras de refrigerantes e adoçantes obtidas no comércio local.

5.3.1.16 Aplicação do Biossensor Bienzimático em Amostras de Alimentos

5.3.1.16.1 Aplicação em Refrigerantes

A determinação dos açúcares D-glicose e D-frutose, presentes em grande quantidade em alimentos, como refrigerantes, foi realizada utilizando o biossensor bienzimático

Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU. Foram utilizados refrigerantes à base de cola, de guaraná e de suco de laranja, sendo estes: não dietéticos, light e dietéticos.

Para este estudo foi adicionado à cela eletroquímica uma alíquota de 100 μL de cada amostra em 10,0 mL de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5 e por meio de adição de padrão de mistura equimolar de D-glicose + D-frutose foram construídas curvas analíticas, de onde foram obtidos valores referentes a menor quantidade detectada dos açúcares por meio da equação 12. Estes resultados são apresentados na Figura 39, para a amostra de refrigerante à base de cola, onde se observa que os amperogramas para as amostras dos refrigerantes dietético e light apresentaram a mesma magnitude nos valores de corrente, indicando a ausência dos açúcares. Este fato pode ser relacionado com os rótulos dos produtos, os quais indicam que estes alimentos não contêm quantidades significantes de carboidratos. Entretanto, se houver uma quantidade mínima de D-glicose e D-frutose na amostra de refrigerante light, esta diferença de conteúdo em relação à dietética, está abaixo do limite de detecção da técnica.

Já o cronoamperograma para a amostra de refrigerante não dietético (Figura 39), observa-se que existe uma elevada magnitude de corrente durante a medida do branco (sem adição de D-glicose), indicando a presença de D-glicose em uma quantidade significativa, o que demonstra a boa funcionalidade do biossensor.

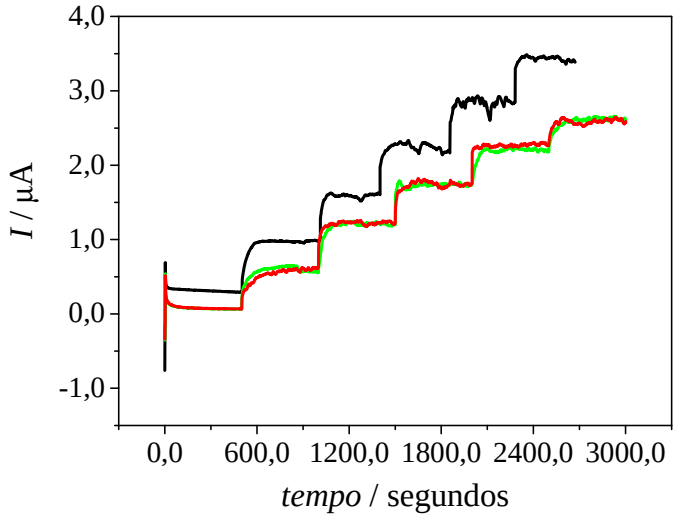

Figura 39. Cronoamperogramas obtidos para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, na presença de refrigerante à base de cola onde: refrigerante não dietético (—); refrigerante light (—) e refrigerante dietético (—). Faixa de concentração de D-glicose+Dfrutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC.

A dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF em função da adição de D-glicose+D-frutose para as amostras de refrigerante dietético e light, está apresentada na Figura 40 e Figura 41. A menor quantidade do açúcares detectada para o refrigerante dietético foi de 0,25 mg L^{-1} (1,38x10^{-6} mol L^{-1}) e para o refrigerante light foi de 0,24 mg L^{-1} (1,33x10^{-6} mol L^{-1}). Estes resultados comparados ao LD obtido na curva analítica em eletrólito puro indicam que praticamente não há efeito de matriz.

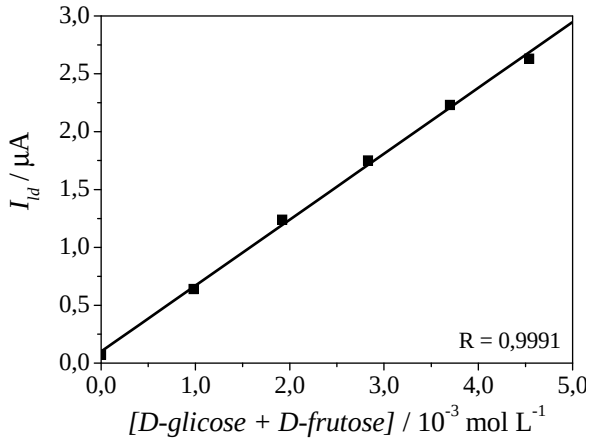

Figura 40. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola dietético. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: $0,98x10^{-3}$ a $4,54x10^{-3}$ mol L^{-1}.

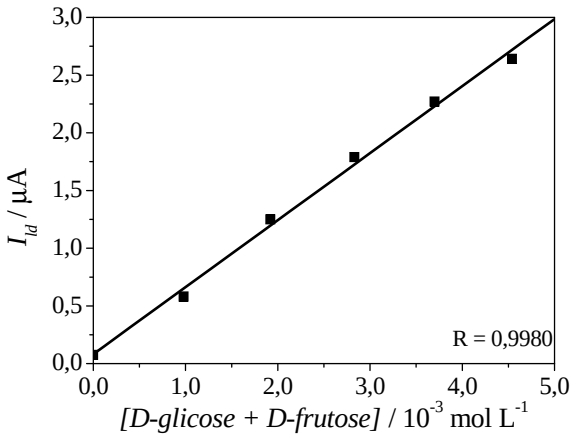

Figura 41. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra de refrigerante à base de cola light. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: $0,98x10^{-3}$ a $4,54x10^{-3}$ mol L^{-1}.

Para a amostra de refrigerante à base de cola não dietético obteve-se um valor inicial de D-glicose+D-frutose de 17,9 mg L^{-1} ($9,95x10^{-5}$ mol L^{-1}) de acordo com a Figura 42.

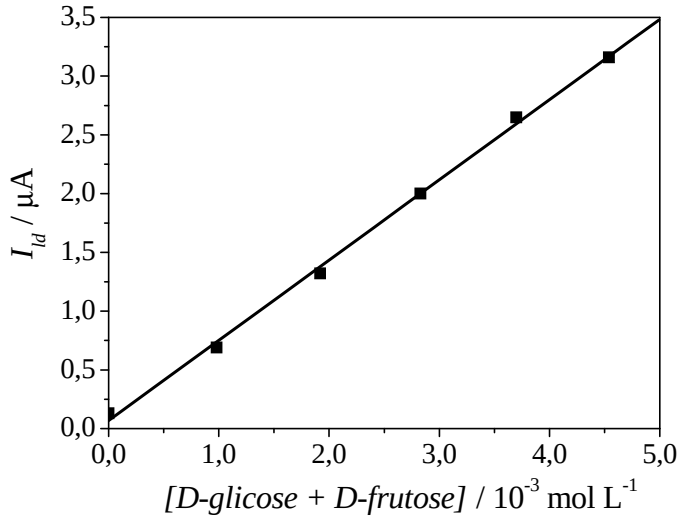

Figura 42. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para amostra de refrigerante não dietético.

Para as demais amostras de refrigerante, sendo elas à base de guaraná e à base de suco de laranja, foram encontrados os seguintes valores de acordo com a Tabela 6 e a Tabela 7:

Tabela 6. Valores referentes às quantidades de D-glicose e D-frutose obtidos para as amostras de refrigerante à base de guaraná, para os tipos: dietético, light e não dietético.

Refrigerante à base de guaraná	*[D-glicose+D-frutose / mg L^{-1}*
Light	0,28 ($1,55x10^{-6}$ mol L^{-1})
Não dietético	20,2 ($1,12x10^{-4}$ mol L^{-1})

Tabela 7. Valores referentes às quantidades de D-glicose e D-frutose obtidos para as amostras de refrigerante à base de suco de laranja, para os tipos: dietético, light e não dietético.

Refrigerante à base de suco de laranja	*[D-glicose+D-frutose / mg L^{-1}*
Light	0,27 ($1,50x10^{-6}$ mol L^{-1})
Não dietético	25,4 ($1,41x10^{-4}$ mol L^{-1})

5.3.1.17 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os resultados obtidos no item anterior foram comparados com dados obtidos para HPLC com detector eletroquímico[143], onde foram determinadas as quantidades mínimas dos carboidratos estudados.

Os autores utilizaram um sistema de cromatografia líquida, o qual consistiu de uma bomba modelo LC-10Ai (Shimadzu), com sistema de distribuição de solventes (*lab made*) e uma válvula de injeção Rheodyne com uma alça de amostragem de 20 µL. Utilizou-se uma pré-coluna CarboPac PA1 (Dionex) e uma coluna de troca aniônica forte de resina de poliestireno-divinilbenzeno (CarboPac PA1, 10 µm, 250 mm x 4 mm, Dionex). A fase móvel utilizada foi 1,4 mM de NaOH. A fase móvel foi filtrada em membrana 0,45 µm de PTFE e desaerada com nitrogênio. O fluxo utilizado foi 1 mL min^{-1}, a temperatura da coluna foi mantida em forno controlado a 25 ºC. Após cada corrida, a coluna foi regenerada com 300 mmol L^{-1} de NaOH por 12,5 min e em seguida as condições cromatográficas foram re-equilibradas com a passagem 1,4 mmol L^{-1} de NaOH por 15 min, antes de cada injeção. Para construir as curvas analíticas, partiu-se de uma solução estoque e diluiu-se 100, 200, 400 e

1000 vezes. A Tabela 8 apresenta os valores de concentração (g L^{-1}) da solução estoque de carboidratos e suas respectivas diluições.

Tabela 8. Valores de concentração (g L^{-1}) das soluções estoque de carboidratos e suas respectivas diluições empregadas na avaliação da célula eletroquímica desenvolvida e aplicada na quantificação em refrigerantes a base de cola.

Carboidrato	*Solução estoque (g L^{-1})*	*Solução diluída 100x (g L^{-1})*	*Solução diluída 200x (g L^{-1})*	*Solução diluída 400x (g L^{-1})*	*Solução diluída 1000x (g L^{-1})*
Glicose	0,41	$4{,}1 \times 10^{-3}$	$2{,}05 \times 10^{-3}$	$1{,}02 \times 10^{-3}$	$4{,}1 \times 10^{-4}$
Frutose	0,50	$5{,}0 \times 10^{-3}$	$2{,}5 \times 10^{-3}$	$1{,}25 \times 10^{-3}$	$5{,}0 \times 10^{-4}$

O sistema de detecção eletroquímico foi composto por um potenciostato PGStat 30 (Autolab), um sistema de aquisição e tratamento de dados composto por um microcomputador Pentium IV, atuando com o programa GPES 4.9 (Autolab). A detecção eletroquímica foi feita por detecção amperométrica pulsada.

O corpo da célula eletroquímica (tipo *thin layer*) foi confeccionado em aço inox 316L, com conexões de entrada e de saída da fase móvel. Para esta célula foi confeccionado um eletrodo de ouro (diâmetro 2 mm) embutido em Teflon. A fase móvel após passar pelo eletrodo de trabalho, vai para um poço, onde está presente o eletrodo de referência Ag/AgCl saturado (*lab made*). Este poço contém uma conexão de saída, que leva a fase móvel ao frasco de descarte. Esta célula eletroquímica permite a utilização de qualquer tipo de material como eletrodo de trabalho, uma vez que é embutido em teflon e pode ser facilmente desconectado da célula eletroquímica e substituído por outro eletrodo.

O modelo de célula *thin-layer* necessita de um espaçador que este fica entre o eletrodo de trabalho e o corpo metálico para delimitar o volume analítico da célula. A sensibilidade dependerá deste parâmetro, uma vez que tem relação direta com o transporte de massa sob o eletrodo. Quanto mais fino for o espaçador, menor será o volume analítico da célula e consequentemente maior a sensibilidade da detecção. Para esta célula eletroquímica

foi confeccionado um espaçador em folha de acetato com espessura de 0,05 mm e resultando em um volume de detecção de 0,45 µL.

A célula desenvolvida não apresentou problemas de vedação ou vazamentos e foi utilizada com sucesso na determinação de carboidratos em refrigerantes.

Diferentemente da técnica de detecção UV-Vis, a detecção amperométrica de carboidratos não necessita de derivatização e pode ser aplicada na detecção de qualquer carboidrato, já que todos possuem grupos oxidáveis (hidroxilas). Esta detecção se baseia na oxidação dos carboidratos em eletrodos de Au ou Pt em meio fortemente alcalino (pH > 12). Entretanto, somente com a utilização de eletrodos de Au é possível a detecção de carboidratos sem que simultaneamente ocorra a redução do O_2 dissolvido. Esta técnica, quando acoplada a HPLC, permite a detecção direta de carboidratos até níveis de 10 picomol injetados com excelente relação sinal-ruído.

Em pH elevado, os carboidratos são eletrocataliticamente oxidados na superfície do eletrodo de ouro pela aplicação de um potencial positivo. A corrente gerada na oxidação é proporcional à concentração do carboidrato oxidado, desta maneira, os carboidratos podem ser detectados e quantificados. Entretanto, se utilizarmos a amperometria DC – onde um potencial fixo é aplicado ao eletrodo – os produtos da oxidação gradualmente passivam a superfície do eletrodo, causando perda do sinal analítico. Para prevenir essa perda a detecção amperométrica pulsada foi desenvolvida possibilitando uma limpeza eletroquímica do eletrodo entre duas medidas consecutivas. Isto é feito aplicando-se uma série de potenciais por períodos de tempo pré-determinados.

A técnica de detecções amperométrica pulsada (PAD) utiliza uma forma de onda potencial-tempo (E-t) de três etapas que incorpora o processo de detecção amperométrica com

alternância de polarizações anódica e catódica para a detecção do composto, limpeza e reativação da superfície do eletrodo de trabalho.

Inicialmente aplica-se um potencial de determinação (E_{det}) por um período de tempo. O sinal analítico será dado pela obtenção da corrente elétrica durante um intervalo de tempo (t_{det}) (faz-se a aquisição do último valor de corrente, desprezando-se assim a corrente capacitiva). Após o processo de detecção, os produtos da oxidação adsorvidos no eletrodo são desorvidos por um processo eletrocatalítico que ocorre simultaneamente com a formação anódica de óxido na superfície do eletrodo pela aplicação de um potencial (E_{oxi}) por um período (t_{oxi}). Em seguida, a atividade da superfície do eletrodo é regenerada pela dissolução catódica do filme de óxido, através da aplicação de um potencial negativo (E_{red}) por um período (t_{red}).[6] Os potenciais E_{det}, E_{oxi} e E_{red} são determinados por voltametria cíclica, enquanto os tempos t_{det}, t_{oxi} e t_{red} são determinados por cronoamperometria.

A Tabela 9 apresenta a forma de onda utilizada para a determinação de carboidratos.

Tabela 9. Parâmetros da forma de onda utilizada na detecção dos carboidratos.

Parâmetro	*Potencial (mV)*	*Parâmetro*	*Tempo (ms)*
E_{det}	+200	t_{det}	400
E_{oxd}	+750	t_{oxd}	200
E_{red}	-200	t_{red}	400

Depois de otimizados os parâmetros da detecção amperométrica pulsada, a célula eletroquímica foi utilizada na determinação de carboidratos em amostras de refrigerantes à base de cola.

A Tabela 10 mostra a linearidade das curvas cromatográficas e o coeficiente de correlação da reta para cada carboidrato. Para o levantamento das curvas analíticas foram utilizadas as soluções padrão com diluição de 100, 200, 400 e 1000 vezes (vide Tabela 9).

Nesta mesma Tabela 10, encontram-se os valores dos limites de detecção encontrados para cada carboidrato utilizando o detector eletroquímico desenvolvido neste trabalho. Comparando estes valores com os limites de detecção obtidos com um detector comercial, relatado no trabalho de Murkovic e Derler[144], observa-se que a célula desenvolvida apresenta limites de detecção muito menores, indicando o bom desempenho deste detector *lab-made*, principalmente para análises em matrizes que possuem baixas concentrações do analito, dispensando-se uma pré-concentração.

Tabela 10. Linearidade, coeficiente de correlação e limite de detecção (LD) obtidos para os carboidratos utilizando detecção amperométrica pulsada (HPAE-PAD).

Carboidrato	*Linearidade*	*R*	*LD / mg L^{-1}*	*(Célula Comercial)[7] LD / mg L^{-1}*
Glicose	$y=2,04 \times 10^{-7} x$	0,9998	0,049	1,1
Frutose	$y=3,88 \times 10^{-8} x$	0,9992	0,540	2,2

Pode-se dizer que os resultados obtidos com a aplicação do biossensor bienzimático, quando comparados a esses valores encontrados pela técnica de HPLC foram bastante satisfatórios, uma vez que o limite de detecção obtido para o biossensor foi de 0,26 mg L^{-1}, estando abaixo inclusive dos valores obtidos por meio de um detector comercial.

A cromatografia líquida acoplada à detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) é a metodologia oficial para a análise de carboidratos. Assim, os autores, analisaram amostras de refrigerante à base de cola não dietético.

A Tabela 11 apresenta as concentrações de glicose e frutose encontradas na amostra do refrigerante analisado.

Tabela 11. Concentrações de glicose e frutose encontradas em refrigerantes à base de cola.

Carboidrato	*Normal*
Glicose	30,8 g L^{-1}
Frutose	30,6 g L^{-1}

As quantidades de glicose e frutose encontradas nesta amostra foram 30,8 g L^{-1} e 30,6 g L^{-1}, respectivamente. No refrigerante normal, ou seja, não dietético é utilizada sacarose para adoçar, assim em um meio ácido como o refrigerante (pH 2,8), a sacarose é hidrolisada em glicose e frutose, o que de fato se verifica nas concentrações iguais encontradas para estes carboidratos.

5.3.1.17.1 Aplicação em Adoçantes

O biossensor Au-CYS-TTF-GOx-FDH-GLU foi também aplicado em amostras de adoçantes, tendo sido utilizados dois tipos comerciais. Tais amostras foram denominadas 1 e 2. A amostra 1 constituiu-se de um adoçante artificial, contendo em sua composição os edulcorantes sacarina sódica e ciclamato de sódio. Já a amostra 2 tratou-se de um adoçante natural, contendo em sua composição o steviosídeo como edulcorante.

Para este estudo foram adicionadas à cela eletroquímica 8 gotas de cada amostra em 10,0 mL de tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5 e por meio de adição de padrão foram construídas curvas analíticas, de onde foram obtidos valores referentes a menor quantidade detectada de D-glicose e D-frutose por meio da equação 8. Estes resultados são apresentados na Figura 43, onde observa-se que os cronoamperogramas apresentaram diferença nos valores de corrente, indicando maior efeito de matriz para a amostra 2.

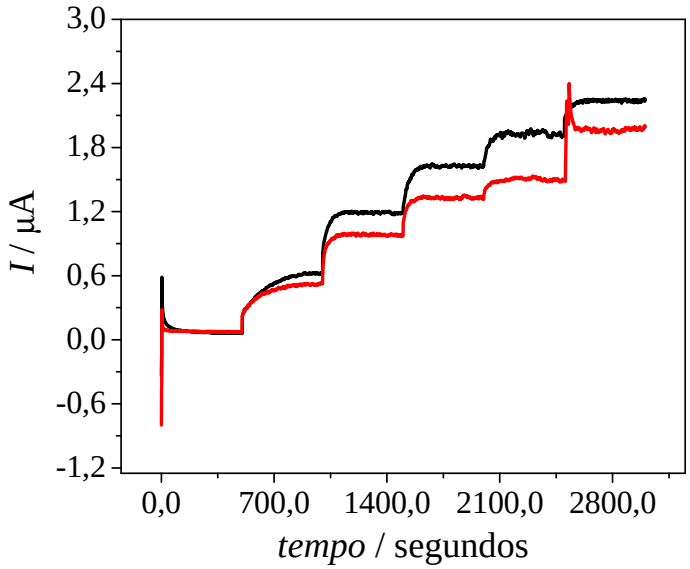

Figura 43. Cronoamperogramas obtidos para a adição de padrão usada na determinação de D-glicose e D-frutose em meio de solução tampão fosfato 0,10 mol L^{-1} pH=6,5, onde: adoçante 1 (—) e adoçante 2 (—). Faixa de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC.

Este fato pode ser comprovado por meio das curvas de dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF em função da adição de D-glicose+D-frutose (Figura 44 e Figura 45), onde os valores encontrados foram de 0,27 mg L^{-1} e 0,34 mg L^{-1} para as amostras 1 e 2, respectivamente. A amostra 2 trata-se de um adoçante natural, isto provavelmente, explica o maior efeito de interferentes nesta matriz.

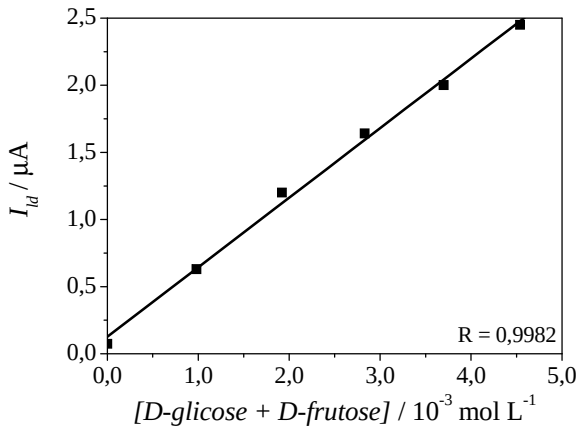

Figura 44. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra 1 de adoçante. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3}a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}.

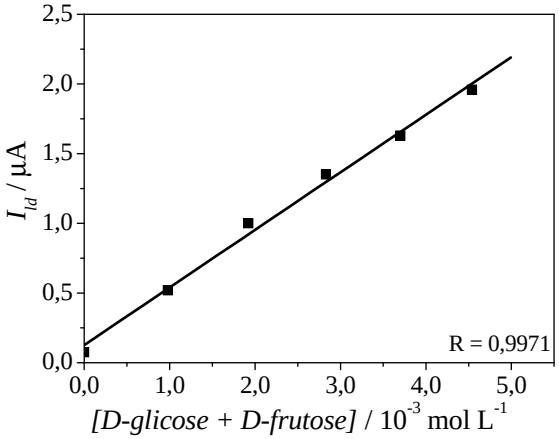

Figura 45. Dependência das correntes limite de difusão da oxidação do TTF com a concentração de D-glicose+D-frutose para a amostra 2 de adoçante. Faixa linear de concentração de D-glicose+D-frutose: 0,98x10^{-3} a 4,54x10^{-3} mol L^{-1}.

5.3.1.18 *Análise de Interferentes*

O efeito de interferentes foi investigado para alguns ácidos orgânicos. Primeiramente, foi adicionada uma alíquota da mistura equimolar de D-glicose e D-frutose até estabilização da corrente e, por conseguinte, foram adicionados separadamente cada um dos possíveis interferentes e finalmente mais uma alíquota da mistura equimolar de D-glicose e D-frutose. Não foi observado respostas de corrente para os compostos verificados, como mostrado na Figura 44.

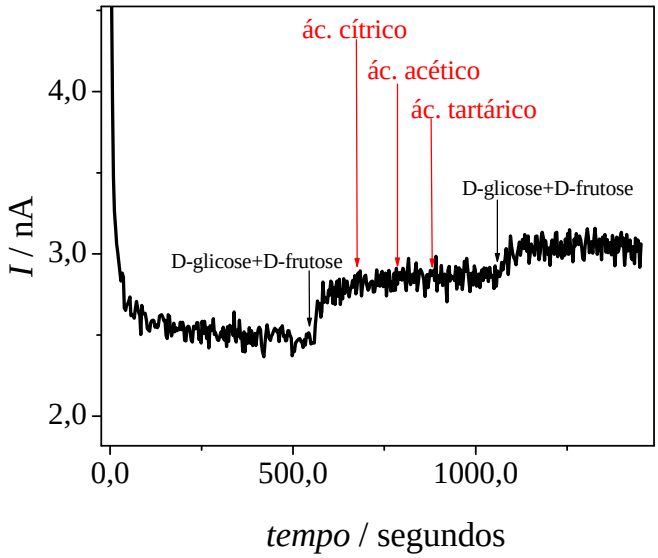

Figura 46. Cronoamperograma obtido do biossensor bienzimático para adições da mistura equimolar de D-glicose+D-frutose com concentração de 0,1 µmol L^{-1} e de possíveis interferentes orgânicos na concentração de 0,25 µmol L^{-1} em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH=6,5. E aplicado: 0,200 V *vs* Ag/AgCl. T=35ºC

5.3.1.19 *Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (MECQ)*

A cinética de formação de monocamadas auto-organizadas é um dos temas que mais geram discussões sobre o entendimento destes sistemas. Dentre as técnicas mais utilizadas para avaliar este mecanismo, a microbalança eletroquímica a cristal de quartzo tem se mostrado uma ferramenta poderosa e extremamente atraente para examinar os processos de

adsorção/dessorção das monocamadas devido à sua capacidade de detectar diferenças de massa na ordem de nanogramas[136].

As medidas de MECQ foram realizadas para verificar a variação de massa (Δm) em função do tempo para o biossensor a base de GOx. Estas foram realizadas em meio aquoso (Figura 47).

Primeiramente, foi adicionado 1,00 mL de solução de CYS na concentração de $1{,}00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} e acompanhou-se a variação de freqüência (Δf) durante 2 horas. Assumindo que uma monocamada constitui um filme rígido, a equação de Sauerbrey pode ser utilizada para converter a variação de freqüência em variação de massa, onde o coeficiente de sensibilidade para a microbalança utilizada é de 0,060 Hz/ng cm^{-2}. Na Figura 47 observa-se que o processo de formação da monocamada de cistamina ocorre em uma etapa. Inicialmente, deve-se considerar que os eletrodos de ouro da microbalança eletroquímica de cristal de quartzo apresentam uma área eletroquímica de 1,7 cm^2 exposta à solução. Nesta área, levando em consideração a distribuição das faces cristalográficas do ouro policristalino, existem $2{,}10 \times 10^{-9}$ moles de átomos de ouro por cm^2, onde cada átomo corresponde a um sítio de adsorção, que será recoberto com uma molécula do alcanotiol. Assim, como cada molécula de CYS tem uma massa molecular de 225,20 g mol^{-1}, o valor teórico de Δm, nas mesmas condições, para uma massa total da monocamada completa será de 803,90 ng cm^{-2}, considerando-se que cada molécula se adsorve sobre um átomo de ouro da superfície do eletrodo. Como o eletrodo tem 1,7 cm^2, o valor experimental encontrado foi de 918,50 ng.

Dessa forma, relacionando-se o valor experimental com o teórico chegou-se a um valor de recobrimento de $\theta = 1{,}14$ camadas de cistamina sobre a superfície do ouro nas primeiras 2 horas de experimento. Essa diferença do teórico para o experimental foi, possivelmente, devido à presença de moléculas não organizadas e fracamente adsorvidas, as

quais se aglomeraram na superfície do cristal, proporcionando um recobrimento maior que 100%.

Após 2 horas de deposição para a CYS, foi adicionado 100,00 μL da GOx (132,40 mg mL^{-1}) correspondendo a 2000 U de enzima. Nesta segunda etapa, obteve-se um Δm de 1672,20 ng durante 2 horas de experimento.

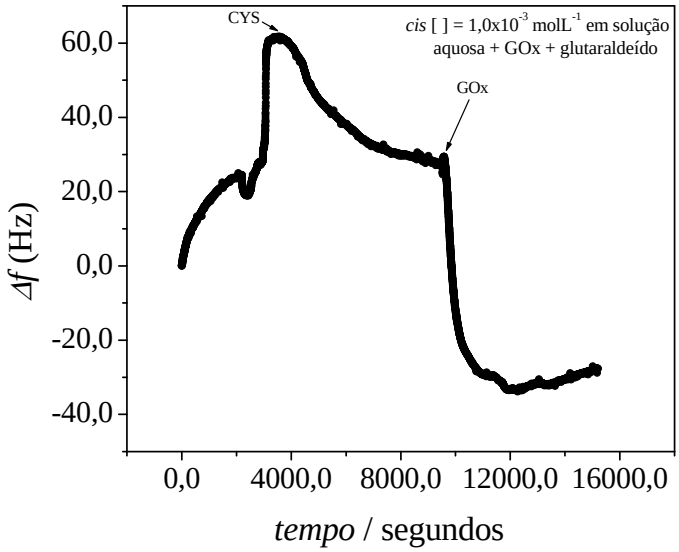

Figura 47. Variação da freqüência com acréscimo de massa.

Calculando o número de moléculas em relação a variação de massa obtida para a CYS e GOx, foi encontrado o equivalente à $2,5x10^{15}$ e $6,19x10^{12}$, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

O desempenho do biossensor bienzimático baseado nas enzimas glicose oxidase (GOx) e frutose dehidrogenase (FDH), imobilizadas sobre eletrodo de ouro modificado com camada auto-organizada do tiol cistamina e, posteriormente, com o mediador de elétrons tetraetiafulvaleno (TTF), mostrou-se eficiente para a determinação de açúcares em matrizes de alimentos, apresentando uma resposta rápida, além da eliminação do efeito da matriz. Desta forma, a metodologia desenvolvida é viável para esse tipo de análise.

O procedimento de imobilização das enzimas apresentou outras vantagens inerentes a este tipo de utilização, que reforçam o sucesso do procedimento desenvolvido. Uma das maiores limitações no emprego de biossensores esta relacionada à rápida perda da atividade enzimática devido a alguns fatores decorrentes dos processos de imobilização. Neste caso, avaliando-se os resultados encontrados, bem como o amplo tempo de vida útil do dispositivo desenvolvido, pode-se considerar que o método de imobilização utilizado promoveu respostas satisfatórias em termos de limite de detecção. Comparando-se a metodologia desenvolvida neste trabalho com os dados da literatura, observou-se que os limites de detecção, obtidos com o biossensor bienzimático, foram menores que os valores obtidos por meio de um procedimento comercial de determinação de carboidratos, utilizando a técnica de HPLC.

Adicionalmente, outra vantagem inerente foi a aplicação do biossensor bienzimático em amostras de alimentos, a fim de verificar a potencialidade deste biossensor, o qual promoveu resultados consideráveis em termos dos valores das menores quantidades detectáveis dos açúcares em estudo.

Estes aspectos são pouco relatados na literatura e constituem uma vantagem característica do sistema desenvolvido neste estudo, bem como uma contribuição importante na área da eletroanálise.

Biossensores bienzimáticos vem sendo desenvolvidos recentemente dentro da área da eletroanálise e desse modo, ainda são pouco relatados na literatura e constituem uma vantagem característica do sistema desenvolvido neste estudo, bem como uma contribuição importante na área da eletroanalítica. Sendo assim, esta área merece uma maior atenção para o perfeito entendimento do funcionamento da metodologia eletroanalítica baseada no dispositivo em estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

2 VALDMAN, B.; FOLLY, R. O. M.; ROCHA-LEAO, M.H.M.; LEITE, S. G. F. **Biossensores:** nova tecnologia em desenvolvimento. Rio de Janeiro: INSTEC, 1993. v.7, p. 29-32.

3 ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

4 NIKOLELIS, D.P.; PANTOULIAS, S. Selective continuous monitoring and analysis of mixtures of acesulfame-K, cyclamate, and saccharin in artificial sweetener tablets, diet soft drinks, yogurts, and wines using filter-supported bilayer lipid membranes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 24, p. 5945-5952, 2001.

5 NIKOLELIS, D.P.; THEOHARIS, G. Rapid detection of vanillin in alcoholic beverages using stabilized polymerized lipid film based biosensors. **Electroanalysis**, v. 14, n. 23, p. 1661-1667, 2002.

6 NIKOLELIS, D.P.; PETROPOULOU, S. S. E; THEOHARIS, G. Electrochemical investigation of interactions of bilayer lipid membranes (BLMs) with incorporated resorcin[4]arene receptor with ephedrine for the development of a stabilized lipid film biosensor for ephedrine. **Electrochimica Acta**, v. 47, p. 3457-3467, 2002.

7 CHETCUTI, A.F.; WONG, D.K.Y.; STUART, M.C. An indirect perfluorosulfonated ionomer-coated electrochemical immunosensor for the detection of the protein human chorionic gonadotrophin. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 18, p. 4088-4094, 1999.

8 ZHU, M.; JIANG, Z.; JING, W. Fabrication of polypyrrole-glucose oxidase biosensor based on multilayered interdigitated ultramicroelectrode array with containing trenches. **Sensors and Actuators B**, v. 110, p. 382-389, 2005.

9 AKRAM, M.; STUART, M.C.; WONG, D.K.Y. Direct application strategy to immobilise a thioctic acid self-assembled monolayer on a gold electrode. **Analytica Chimimica Acta**, v. 504, p. 243-251, 2004.

10 GOODING, J.J.; PRAIG, V.G.; HALL, E.A.H. Platinum-catalyzed enzyme electrodes immobilized on gold using self-assembled layers. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 11, p. 2396-2402, 1998.

11 PAULIUKAITE, R.; BRETT, C. M. A. Characterization of novel glucose oxysilane sol-gel electrochemical biosensors with copper hexacyanoferrate mediator. **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 4973-4980, 2005.

12 PAULIUKAITE, R.; CHIORCEA-PAQUIM, A. M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M..; BRETT, C. M. A. Electrochemical, EIS and AFM characterisation of biosensors: Trioxysilane sol-gel encapsulated glucose oxidase with two different redox mediators **Electrochimica Acta**, v. 52, p. 1-8, 2006.

13 HULANICKI, A.; GEAB, S.; INGMAN, F. Chemical Sensors Definitions and Classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247-1250, 1991.

14 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical Biosensors: Proposed Definitions and Classification Synopsis of the Report. **Sensors and actuators B**, v. 30, p. 81, 1996.

15 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical Biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

16 ROGERS, K. R.; WILLIAMS, R. L. Biosensors for Environmental Monitoring: a Regulatory Perspective. **Trends**, v. 14, n. 7, p. 289-294, 1995.

17 RICCARDI, C.S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, 2002.

18 EGGINS, B. R. **Biosensors:** an introduction. New York: Wiley, 1996. p. 8.

19 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuos monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29, 1962.

20 UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, v. 2144, p. 986-988, 1971.

21 OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Química Nova**, v. 11, p. 432-435, 1988.

22 ANAISSI, F. J.; TOMA, H. E. Catechol incorporation and detection using bentonite-vanadium(V) oxide xerogels. **Sensors and Actuators B**, v. 110, p. 175-180, 2005.

23 DE MATTOS, I. L.; AREIAS, M. C. D. Automated determination of glucose in soluble coffee using Prussian Blue–glucose oxidase–Nafion® modified electrode. **Talanta**, v. 66, p. 1281-1286, 2005.

24 FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. N.; COLLINS, C. H. Hydrogen peroxide detection system consisting of chemically immobilised peroxidase and spectrometer. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3441-3445, 2005.

25 FIORITO, P. A., DE TORRESI, S. I. C. Hybrid nickel hexacyanoferrate/polypyrrole composite as mediator for hydrogen peroxide detection and its application in oxidase-based biosensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 581, p. 31-37, 2005.

26 FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O.; VIEIRA, I. C. Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor. **Talanta**, v. 55, p. 685-692, 2001.

27 LEITE, O. D.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. D. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines. **Talanta**, v. 59, p. 889-896, 2003.

28 LUPETTI, K. O.; VIEIRA, L. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Jack Fruit-Capric Acid Biosensor for Total Phenols Determination in Wastewaters. **Analytical Letters**, v. 37, p. 1833-1846, 2004.

29 SANTOS, A. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Biosensor for H2O2 response based on horseradish peroxidase: effect of different mediators adsorbed on silica gel modified with niobium oxide. **Electroanalysis**, v. 17, n. 12, p. 1103-1111, 2005.

30 MELLO, L. D.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. **Food Chemistry**, v. 92, p. 515-519, 2005.

31 ALVES, A. A.; DA SILVA, L. P.; MACEDO, D.V.; KUBOTA, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. **Analytical Biochemistry**, v. 323, p. 33-38, 2003.

32 CASTILHO, T. J.; SOTOMAYOR, M. D. T.; KUBOTA, L.T. Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 785-791, 2005.

33 FIORITO, Pablo Alejandro. **Construção de biossensores utilizando polímeros condutores eletrônicos**. 2001. 89 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

34 FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.

35 CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuos monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29, 1962.

36 UPDIKE, S. J.; HICKS, G. P. The Enzyme Electrode. **Nature**, v. 2144, p. 986-988, 1971.

37 GUILBAULT, G., G.; MONTAVO, J. G. An urease-specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164-2165, 1969.

38 FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. **Process Biochemistry,** v. 39, p. 957-962, 2004.

39 CUNNINGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensor**. New York: John Wiley & Sons, 1998. p. 19-21.

40 MENDES, Renata Kelly. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006. 112 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

41 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 14, p. 230-243, 2003.

42 SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. *Enzymeless biosensors*: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.

43 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002.

44 FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, v. 54, p. 681-686, 2001.

45 NASCIMENTO, V.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por “silk-screen”. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 614-629, 1998.

46 FERRETTI, S.; PAYNTER, S.; RUSSEL, D. A.; SAPSFORD, K. E.; RICHARDSON, D. J. Self-assembled monolayers: A versatile tool for the formulation of bio- surfaces. **Trends Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530-540, 2000.

47 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications**. Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

48 GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, 1999.

49 MANDLER, D.; TURYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1996.

50 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, 2003.

51 MALINAUSKAS, A. Electrocatalysis at conducting polymers. **Synthetic Metals**, v. 107, p. 75-83, 1999.

52 GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 345-359, 2002.

53 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533-1554, 1996.

54 AZZARONI, O.; SCHILARDI, P. L.; SALVAREZZA, R. C. Metal electrodeposition on self-assembled monolayers: a versatile tool for pattern transfer on metal thin films. **Electrochimica Acta**, v. 48, p. 3107-3114, 2003.

55 FERRET, S.; PAYNTER, S.; RUSSEL, D. A.; SAPSFORD, K. E.; RICHARDSON, D. J. Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 530-540, 2000.

56 BRUST, M.; KIELY, C. Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. **Colloids and Surfaces**, v. 202, p. 175-186, 2002.

57 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 1-12, 2002.

58 GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, 1999.

59 LEE, T. R. LAIBINIS, P. E.; FOLKERS, J. P.; WHITESIDES, G. M. Heterogeneous catalysis on platinum and self-assembled monolayers on metal and metal oxide surfaces. **Pure Applied Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 821-828, 1991.

60 SELLERS, H.; ULMAN, A.; SHNIDMAN, Y.; EILERS, J. E. Structure and binding of alkanethiolates on gold and silver surfaces: implications for self-assembled monolayers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, p. 9389-9401, 1993.

61 LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M. ω-Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 1990-1995, 1992.

62 LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of n-alkanethiolates on copper are barrier films that protect the metal against oxidation by air. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 9022-9028, 1992.

63 SHIMAZU, K.; SATO, Y.; YAGI, I.; UOSAKI, K. Packing state and stability of self-assembled monolayers of 11-ferrocenyl-1-undecanethiol on platinum electrodes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 67, n. 3, p. 863-865.

64 MAOZ, R.; NETZER, L.; GUN, J.; SAGIV, J. in: PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; DE OLIVEIRA, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

65 SAVIG, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, p. 92-98, 1980.

66 MAJOR, R.C.; ZHU, X.Y. Two-step approach to the formation of organic monolayers on the silicon oxide surface. **Langmuir**, v. 17, p. 5576-5580, 2001.

67 PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; DE OLIVEIRA, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: Preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

68 YU, H. Z.; XIA, N.; ZHANG, J.; LIU, Z. F. Constructing different ‘bridges’ for interfacial electron transfer in azobenzene LB/SAM composite bilayers. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 448, p. 119-124, 1998.

69 HOBARA, D.; SASAKI, T.; IMABAYASHI, S.; KAKIUCHI, T. Surface structure of binary self-assembled monolayers formed by electrochemical selective replacement of adsorbed thiols. **Langmuir**, v. 15, p. 5073-5078, 1999.

70 HOBAR, D.; OTA, M.; IMABAYASHI, S.; NIKI, K.; KAKIUCHI, T. Phase separation of binary self-assembled thiol monolayers composed of 1-hexadecanethiol and 3-mercaptopropionic acid on Au(111) studied by scanning tunneling microscopy and cyclic voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 444, p. 113-119, 1998.

71 SUN, Y. X.; WANG, S. F.; ZHANG, X. H.; HUANG, Y. F. Development of a parathion sensor based on molecularly imprinted nano-TiO2 self-assembled film electrode. **Sensors and Actuators B**, v. 117, p. 166-171, 2006.

72 WON, M. S.; RAHMAN, A.; KWON, N. H.; SHANKARAN, D. R.; SHIM, Y. B. Square-wave voltammetric detection of dopamine at a copper-(3-mercaptopropyl) trimethoxy silane complex modified electrode. **Electroanalysis**, v. 17, n. 24, p. 2231-2238, 2005.

73 YANG, K.; CADWELL, K.; ABBOTT, N. Use of self-assembled monolayers, metal ions and smectic liquid crystals to detect organophosphonates. **Sensors and Actuators B**, v. 104, p. 50-56, 2005.

74 ZHANG, L.; JIANG, X. Attachment of gold nanoparticles to glassy carbon electrode and its application for the voltammetric resolution of ascorbic acid and dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 583, p. 292-299, 2005.

75 CHOW, E.; HIBBERT, D.B.; GOODING, J.J. Voltammetric detection of cadmium ions at glutathione-modified gold electrodes. **The Analyst**, v. 130, n. 6, p. 831-837, 2005.

76 CAMPUZANO, S.; LOAIZA, O. A.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. An integrated bienzyme glucose oxidase–fructose dehydrogenase–tetrathiafulvalene-3-mercaptopropionic acid–gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 199-206, 2004.

77 STEINBERG, S.; TOR, Y.; SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I. Ion-selective monolayer membranes based upon self-assembling tetradentate ligand monolayers on gold electrodes. 2. Effect of applied potential on ion binding. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 5176-5182, 1991.

78 STEINBERG, S.; TOR, Y.; SABATANI, E.; RUBINSTEIN, I. Ion-selective monolayer membranes based upon self-assembling tetradentate ligand monolayers on gold electrodes. 2. Effect of applied potential on ion binding. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 5176-5182, 1991.

79 STEINBERG, S.; RUBINSTEIN, I. Ion-selective monolayer membranes based upon self-assembling tetradentate ligand monolayers on gold electrodes. 3. Application as selective ion sensors. **Langmuir**, v. 8, p. 1183-1187, 1992.

80 MENDES, R. K.; FREIRE, R. S.; FONSECA, C. P.; NEVES, S.; KUBOTA, L. T. Characterization of self-Assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 849-855, 2004.

81 ZERULLA, D.; SZARGAN, R.; CHASSÉ, T. Competing interaction of different thiol species on gold surfaces. **Surface Science**, v. 402-404, p. 604-608, 1998.

82 LIU, L.; WANG, T.; LI, J.; GUO, Z. X.; DAI, L.; ZHANG, D.; ZHU, D. Self-assembly of gold nanoparticles to carbon nanotubes using a thiol-terminated pyrene as interlinker. **Chemical Physics Letters**, v. 367, p. 747-752, 2003.

83 CHUANG, W.; LIN, J. Surface characterization and platelet adhesion studies for the mixed self-assembled monolayers with amine and carboxylic acid terminated functionalities. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 82A, n. 4, p. 820-830, 2007.

84 PEDROSA, V. A.; PAIXÃO, T. R. L. C.; FREIRE, R. S.; BERTOTTI, M. Studies on the electrochemical behavior of a cystine self-assembled monolayer modified electrode using ferrocyanide as a probe. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 602, n. 2, p. 149-155, 2007.

85 CAMPUZANO, S.; GÁLVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J.; PINGARRÓN, M. Preparation, characterization and application of alkanetiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 526, p. 92-100, 2002.

86 LIU, G.; LIN, Y. Amperometric glucose biosensor on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. **Eletrochemistry Communications**, v. 8, p. 251-256, 2006.

87 NAKANO, N.; DOI, K.; TAMURA, K.; KATSUMI, Y; TAZAKI, M. Self-assembling monolayer formation of glucose oxidase covalently attached on 11-aminoundecanotiol monolayers on gold. **Chemical Communication**, n. 13, p. 1544-1545, 2003.

88 MANDLER, D.; TURYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, n. 3, p. 207-213, 1996.

89 CAMPUZANO, S.; GÁLVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J.; PINGARRÓN, M. Preparation, characterization and application of alkanetiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 526, p. 92-100, 2002.

90 LIU, G.; LIN, Y. Amperometric glucose biosensor on self-assembling glucose oxidase on carbon nanotubes. **Eletrochemistry Communications**, v. 8, p. 251-256, 2006.

91 KATZ, E.; RIKLIN, A.; HLEG-SHABTAI, V.; WILLNER, I.; BUCKMANN, A. F. Glucose oxidase electrodes via reconstitution of the apo-enzyme: tailoring of novel glucose biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 385, p. 45-58, 1999.

92 WILLNER, I.; LAPIDOT, N.; RIKLIN, A.; KASHER, R.; ZAHAVY, E.; KATZ, E. Electron-transfer communication in glutathione reductase assemblies: electrocatalytic, photocatalytic, and catalytic systems for the reduction of oxidized glutathione. **Journal of the American Chemical Society**, v.116, p. 1428-1441, 1994.

93 WILLNER, I.; RIKLIN, A. Electrical communication between electrodes and NAD(P)+-dependent enzymes using pyrroloquinolinequinone-enzyme electrodes in a self-assembled monolayer configuration: design of a new class of amperometric biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1535-1539, 1994.

94 LINDGREN, A.; LARSSON, T.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Direct electron transfer between the heme of cellobiose dehydrogenase and thiol modified gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 494, p. 105-113, 2000.

95 LINDGREN, A.; GORTON, L.; RUZGAS, T.; BAMINGER, U.; HALTRICH, D.; SCHULEIN, M. Direct electron transfer of cellobiose dehydrogenase from various biological origins at gold and graphite electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 496, p. 76-81, 2001.

96 CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. A peroxidase-tetrathiafulvalene biosensor based on self-assembled monolayer modified Au electrodes for the flow-injection determination of hydrogen peroxide. **Talanta**, v. 66, p. 1310-1319, 2005.

97 LEE, J. W.; SIMA, S. J.; CHOA, S. M.; LEE, J. Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1422-1427, 2005.

98 MENA, M. L.; CARRALERO, V.; GONZALEZ-CORTES, A.; YANEZ-SEDENO, P.; PINGARRON, J. M. Laccase biosensor based on N-succinimidyl-3-thiopropionate-functionalized gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 17, n. 23, p. 2147-2155, 2005.

99 CHENA, H.; HENGA, C. K.; PUIU, P. D.; ZHOUB, X. D.; Ai Cheng LEE, A. C.; LIMC, T. M.; TAN, S. N. Detection of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on self-assembled monolayer (SAM) of alkanethiolate using electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 554,
p. 52-59, 2005.

100 CAMPUZANO, S.; GAMELLA, M.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Integrated Electrochemical Gluconic Acid Biosensor Based on Self-Assembled Monolayer-Modified Gold Electrodes. Application to the Analysis of Gluconic Acid in Musts and Wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 2109-2114, 2007.

101 LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 337-341, 2004.

102 GLICOSE oxidase. Disponível em:<http://www.Doutorado\glicoseoxidase.htm>. Acesso em: 17 ago. 2006.

103 MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, p. 237-256, 2002.

104. CAMPUZANO, S., GÁLVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. An integrated electrochemical fructose biosensor based on tetrathiafulvalene-modified self-assembled monolayers on gold electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 600-607, 2003.

105 MATSUMOTO, K.; KAMIKADO, H.; MATSUBARA, H.; OSAJIMA, Y. Simultaneous determination of glucose, fructose, and sucrose in mixtures by amperometric flow injection analysis with immobilized enzyme reactors. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 2, p. 147-151, 1988.

106 SURAREUNGCHAI, W.; DEEPUNYA, W.; TASAKORN, P. Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose**. Analytica Chimica Acta**, v. 448, p. 215-220, 2001.

107 BECKER, T. M.; SCHMIDT, H. L. New ways of enzymatic two-substrate determinations in flow injection systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 421, p. 7-18, 2000.

108 ANTIOCHIA, R.; LAVAGNINI, I.; MAGNO, F. Amperometric mediated carbon nanotube paste biosensor for fructose determination. **Analytical Letters**, v. 37, n. 8, p. 1657-1669, 2004.

109 FLORESCU, M.; BRETT, C. M. A. Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes **Talanta**, v. 65, p. 306-312, 2005.

110 SHERVEDANI, R. K.; MEHRJARDI, A. H.; ZAMIRI, N. A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 69, p. 201-208, 2006.

111 CREAGER, S. E.; OLSEN, K. G. Self-assembled monolayers and enzyme electrodes: progress, problems and prospects. **Analytica Chimica Acta**, v. 307, p. 277-289, 1995.

112 CECCHET, F.; MARCACCIO, M.; MARGOTTI, M.; PAOLUCCI, F.; RAPINO, S.; RUDOLF, P. Redox mediation at 11-mercaptoundecanoic acid self-assembled monolayers on gold. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 5, p. 2241-2248, 2006.

113 YAMADA, Y.; AINDA, K.; UEMURA, T. Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol. **Journal of Biological Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 636-646, 1967.

114 AMEYAMA, M.; SHINAGAWA, E.; MATSUSHITA, K.; ADACHI, O. D-Fructose Dehydrogenase of Gluconobacter industrius: Purification, Characterization, and Application to Enzymatic Microdetermination of D-Fructose. **Journal of Bacteriology**, v. 145, n. 2, p. 814-823, 1981.

115 GARCIA, Carlos Alexandre Borges. **Construção, avaliação e aplicação de biossensor para a frutose utilizando a enzima D-frutose dehidrogenase**. 1997. 131 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

116 DISTÚRBIOS do metabolismo dos carboidratos. Disponível em:<http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec23_267.htm>. Acesso em: 23 ago. 2007.

117 ANTIOCHIA, R.; LAVAGNINI, I.; MAGNO, F. Amperometric mediated carbon nanotube paste biosensor for fructose determination. **Analytical Letters**, v. 37, p. 1657-1669, 2004.

118 YAMADA, Y.; AIDA, K.; VEMERA, T. A new enzyme, D-fructose dehidrogenase. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, p. 95, 1966.

119 GARCIA, C. A. B.; OLIVEIRA-NETO, G.; KUBOTA, L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, p.201-208, 1998.

120 CAMPUZANO, S.; GÁLVEZ, R.; PEDRERO, M.; VILLENA, F. J. M.; PINGARRÓN, J. M. An integrated electrochemical fructose biosensor based on tetrathiafulvalene-modified self-assembled monolayers on gold electrodes. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, p. 600-607, 2003.

121 SACAROSE. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Sacarose>. Acesso em: 28 ago. 2007.

122 EDULCORANTES: classificação, usos e aplicações. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/nutricao/edulcorantes.php>. Acesso em 28 ago. 2007.

123 - BAIRD, C. **Environmental Chemistry**. 2. ed. New York: W.H. Freeman, 1999. p. 293-377.

124 SUFFREDINI, H.B. Desmistificando a espectroscopia de impedância aplicada a sistemas eletroquímicos utilizando gráficos de Nyquist e Mott-Schottky. **Química Nova**, 2005. No prelo.

125 BINNIG, G.; ROHRER, H. The scanning tunneling microscope. **Scientific American**, v. 253, p. 50-54, 1985.

126 VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 664-679, 2000.

127 BENSEBAA, F.; VOICU, R.; HURON, L.; ELLIS, T. H.; KRUUS, E. Kinetics of formation of long-chain n-alkanethiolate monolayers on polycrystaline gold. **Langmuir**, v. 13, n. 20, p. 5335-5340, 1997.

128 LI, S.; CROOKS, R. M. Imaging of defects contained within n-alkylthiol monolayers by combination of underpotencial deposition and scanning tunneling microscopy-Kinetics of self-assembly. **Journal Electrochemical Society**, v. 138, n. 8, p. 23-25, 1991.

129 CARVALHAL, R. F.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Polycristalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v. 17, n. 14, p. 1251-1259, 2005.

130 VATANKHAH, G.; LESSARD, J.; JERKIEWICZ, G.; ZOLFAGHARI, A.; CONWAY, B. E. Dependence of the reliability of electrochemistry quartz-crystal nanobalance mass responses on the calibration constant, C_f: analysis of three procedures for its determination. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 11, p. 1613-1622, 2003.

131 SMITH, R. K.; LEWIS, P. A.; WEISS, P. S. Patterning self-assembled monolayers. **Programme Surfaces Science**, v. 75, p. 1-68, 2004.

132 VIDAL, J. C.; ESPUELAS, J.; CASTILHO, J. R. Amperometric cholesterol biosensor base don in situ reconstituted cholesterol oxidase on na immobilized monolayer of flavin adenine dinucleotide cofactor. **Analytical Biochemistry**, v. 333, p. 88-98, 2004.

133 RODRIGUEZ, J. F.; MEBRAHTU, T.; SORIAGA, M. P. Determination of the surface area of gold electrodes by iodine chemisorption. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 233, p. 283-289, 1987.

134 STOLBERG, L.; RICHER, J.; LIPKOWSKI, J.; IRISH, D. E. Adsorption of pyridine at the polycrystalline gold-solution interface. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 207, p. 213-234, 1986.

135 WIDRIG, C. A.; CHUNG, C.; PORTER, M. D. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 310, n. 1-2, p. 335-359, 1991.

136 CANCINO, Juliana Carlos. **Eletrodos Modificados com Monocamadas Auto-Organizadas de Alcanotióis: Uma Abordagem sobre a Transferência Eletrônica**. 2008. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

137 GARCIA, C. A. B.; OLIVEIRA NETO, G.; KUBOTA. L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, p. 201-208, 1998.

138 LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition. **Analytical Chemistry,** v. 55, n. 7, p. 112-724, 1983.

139 KRULL, I.; SWARTZ, M. Determining Limits of Detection and Quantitation. **LC-GC,** v. 16, n. 10, p. 922-924, 1998.

140 GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Development and applications of a bienzymatic amperometric glycerol biosensor based on a poly(neutral red) modified carbon film electrode. **Analytical Letters**, v. 39, p. 1527-1524, 2006.

141 CRESPILHO, F. N.; GHICA, M. E.; FLORESCU, M.; NART, F. C.; OLIVEIRA JUNIOR; BRETT, C. M. A. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, p. 1665-1670, 2006.

142 GARCIA, Carlos Alexandre Borges. **Construção, avaliação e aplicação de biossensor para frutose utilizando a enzima D-frutose dehidrogenase**. 1997. 107 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

143 COUTINHO, C. F. B.; COUTINHO, L. F. M.; CAMARA, C. A. P.; NIXDORF, S. L.; CONTADORI, A. S.; MAZO, L. H. Construção e aplicação de um detector eletroquímico para cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**. *Submetido.*

144 MURKOVIC, M.; DERLER, K. Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee. **Journal Biochemistry and. Biophysics Methods**, v. 69, p. 25-32, 2006.