UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS - IFSC

JACIARA CÁSSIA DE CARVALHO SANTOS

**Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados
para aplicação em biossensores**

SÃO CARLOS

2012

JACIARA CÁSSIA DE CARVALHO SANTOS

**Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados
para aplicação em biossensores**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Física do Instituto de Física de São Carlos da
Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Básica

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

SÃO CARLOS

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Jaciara Cássia de Carvalho

Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes
nanoestruturados para aplicação em biossensores /
Jaciara Cássia de Carvalho Santos; orientador
Valtencir Zucolotto - versão corrigida -- São Carlos, 2012.
94 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Básica) -- Instituto de Física de São Carlos,
Universidade de São Paulo, 2012.

1. Técnica de Automontagem. 2. Glicose. 3.
Imobilização. 4. Biossensores. 5. Nanopartículas de ouro.
I. Zucolotto, Valtencir, orient. II. Título.

*Esta dissertação é dedicada à minha mãe
Maria Júlia Barradas de Carvalho.*

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional, em especial á minha mãe Maria Júlia, irmãs Wilmara e Marina e à minha prima Kelly.

Ao Marcio pela sua paciência infinita e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela orientação, apoio e confiança depositada nesse trabalho.

Aos meus amigos do Grupo de Biofísica: Lilian, Valéria, Juliana, Verônica, Edson, Fabrício, Wagner, Denise, Leo e Rodrigo.

Aos técnicos do laboratório de Biofísica pela ajuda nas horas difíceis.

Ao Instituto de Física de São Carlos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

SANTOS, J. C. de C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. 2011. 94p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Aplicações de nanomateriais em biossensores têm recebido muito interesse nos últimos anos. Entre os vários tipos de biossensores estudados, sensores de glicose têm recebido destaque devido a sua importância em diagnósticos clínicos. Apesar do grande avanço no monitoramento de glicose nas últimas décadas, ainda há muitos desafios para alcançar um monitoramento de glicemia contínuo, clinicamente preciso, em conexão a um “sistema fechado” otimizado para a entrega de insulina no corpo. Esta dissertação descreve a fabricação de filmes *layer-by-layer* (*LbL*) obtidos a partir da enzima glicose oxidase (GOx) e dos polieletrólitos poli(amidoamina) de geração 4 (PG4) e o híbrido PG4 com as nanopartículas de ouro (PG4AuNp). As nanopartículas de ouro foram sintetizadas em meio aquoso usando o dendrímero PG4, o ácido cloroáurico (HAuCl₄) e ácido fórmico. As medidas de espectroscopia UV-Vis dos filmes automontados em substratos de quartzo mostraram um crescimento linear em função do número de bicamadas depositados apenas para o filme PG4-GOx. No filme PG4AuNp-GOx o crescimento não é linear. Em adição às caracterizações ópticas, estrutural e eletroquímica, os filmes *LbL*, depositados sobre substratos de vidro recoberto com óxido de índio (ITO) foram testados para a atuação em biossensores de peróxido de hidrogênio e de glicose. A biofuncionalidade da GOx e a viabilidade do método como biossensor foi demonstrada pelo aumento da corrente em função das sucessivas adições de alíquotas de glicose à solução. Os filmes sem nanopartículas não foram sensíveis a glicose. O biossensor com melhor desempenho foi o ITO-(PG4AuNp-GOx) com 5 bicamadas, que mostrou-se linear na faixa de 0 a 4,8 mM de glicose com sensibilidade 0,013 μA/mM e limite de detecção 0,44 mmol L⁻¹.

Palavras-chave: Técnica de Automontagem. Glicose. Imobilização. Biossensores. Nanopartículas de ouro.

ABSTRACT

SANTOS, J. C. de C. **Glucose oxidase immobilization on nanostructured thin films for application in biosensors.** 2011. 94p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Applications of nanomaterials for biosensors have been target of substantial research in the last years. Among a large number of biosensors, glucose biosensors have attracted attention due to their applications in clinical diagnostics. Despite the remarkable progress in glucose biosensors in the last decades, there are still many challenges in achieving clinically accurate continuous glycemic monitoring in connection to closed-loop systems aimed at optimal insulin delivery. This dissertation describes the fabrication of layer-by-layer (LbL) films obtained from the enzyme glucose oxidase (GOx) and the polyelectrolytes poli(amidoamine) generation 4 (PG4) and PG4 containing gold nanoparticles (PG4AuNp). Gold nanoparticles were synthesized in aqueous solution using formic acid, PG4 and HAuCl₄. UV-vis spectroscopy showed a linear growth on quartz substrate only in the system PG4-GOx. In addition to the optical, structural and electrochemistry investigation, these LbL films deposited on ITO-coated glass were employed as electrochemical glucose biosensors. The biofunctionality of GOx and feasibility of the method as biosensor are demonstrated by the increase of reduction current upon additions of successive aliquots of glucose. The biosensor ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ with the optimum performance had a detection limit of 0.44 mmolL⁻¹ with a linear response in the range from 0 to 4.8 mmolL⁻¹ and sensibility 0.013μA/mmolL⁻¹.

Keywords: Self-assemble technique. Glucose. Immobilization. Biosensors. Gold Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (a) Estrutura molecular de um aminoácido. (b) Representação de uma ligação peptídica.	24
Figura 2 - Níveis estruturais em uma proteína (20).....	25
Figura 3 - Cofator FAD, em destaque, ligado à enzima glicose oxidase (25).....	26
Figura 4 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase (31).	27
Figura 5 - Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase (25).	28
Figura 6 - Representação de um filme fino obtido a partir da técnica de automontagem baseada na interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos.	30
Figura 7 - Principais constituintes de um biossensor.	32
Figura 8 - Representação esquemática dos diferentes tipos de gerações de biossensores (54).	33
Figura 9 - Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulação, e (d) ligação covalente cruzada (68).	34
Figura 10 - a) Dispositivo eletrônico analisador de glicose (74) e b) sensores de glicose da marca Accu-Chek (75). c) Teste de glicose a partir de um biossensor comercial (76).	36
Figura 11 - Algumas configurações de imobilização da GOx em trabalhos recentes. a) Imobilização a partir da técnica <i>LbL</i> com o polímero quitosana em um filme de Azul da Prússia (78). b) Imobilização a partir de deposição eletroquímica com nanopartículas de ouro e o híbrido quitosana-ferroceno (37). c) Imobilização em materiais porosos à base de carbono (79). d) Imobilização por <i>crosslinking</i> com o dendrímero PAMAM G4 (77).	37
Figura 12 - Alguns tipos de nanomateriais em estudo. (i) Nanotubos de carbono. (ii) Fullerenos. (iii) Nanopartículas metálicas estabilizadas em dendrímeros (92).	39
Figura 13 - Ilustração esquemática da oscilação da nuvem eletrônica de uma superfície esférica sob o efeito de uma onda eletromagnética (100).	40
Figura 14 - Soluções coloidais de nanopartículas de ouro e prata com diferentes tamanhos, composição e geometrias. Da esquerda para a direita as soluções 1, 2 e 9 são de nanobarras de ouro. As soluções 3, 4 e 6 são nanobarras de Au/Ag. A solução 5 contem nanoesferas de prata. As soluções 7 e 8 são misturas de nanoesferas e nanobarras de ouro (96).	41
Figura 15 - (a) Formação de nanopartículas estabilizadas em um dendrímero (92). (b) Formação de nanopartículas estabilizadas em um polímero (107).....	42

Figura 16 - Ilustração de um dendrímero de geração 3.....	43
Figura 17 - Diferentes formas de encapsulamento de um medicamento por um dendrímero. As bolinhas azuis e verdes representam fármacos armazenados no interior e no exterior do dendrímero.....	44
Figura 18 - Ilustração dos métodos divergente e convergente (110).	45
Figura 19 - Materiais utilizados para a construção dos filmes <i>LbL</i> . a) Glicose Oxidase (25). b) PG4 (119).	47
Figura 20 - Estrutura idealizada dos filmes contendo a glicose oxidase imobilizada nas sequências: (a) PG4-GOx e (b) PG4AuNp-GOx.	48
Figura 21 - Modelo de célula utilizada nos experimentos eletroquímicos.	50
Figura 22 - Representação esquemática da dupla camada formada na interface eletrodo-solução.	51
Figura 23 - (a) Forma de aplicação de potencial na voltametria cíclica. (b) Corrente resultante devido em resposta ao potencial aplicado.	53
Figura 24 - (a) Forma de aplicação de potencial na voltametria de pulso diferencial. (b) Corrente resultante em resposta ao potencial aplicado.	53
Figura 25 – Esquema ilustrando a) o princípio da impedância eletroquímica para detecção de antígenos usando b) o circuito equivalente de Randle para ajustar os espectroscopia de impedância por software comercial de análise de dados Autolab e c) o espectro típico de Nyquist de impedância faradaica na presença de sonda redox. (128). No circuito equivalente, R_{ct} (o diâmetro do semi-círculo no espectro de impedância) representa a resistência transferência eletrônica que controla a cinética de elétrons de transferência da sonda redox na interface do eletrodo.....	54
Figura 26 - (i) A mistura de HAuCl_4 e PG4. (ii) Mistura de HAuCl_4 e PG4 após adicionar o agente redutor. (iii) Mistura após 4h sob agitação com o agente redutor. (iv) Ilustração da formação de nanopartículas em um dendrímero.	55
Figura 27 - Espectros de UV-Vis das suspensões de nanopartículas de ouro e do sal HAuCl_4 em solução aquosa.....	56
Figura 28 – Histograma obtido a partir de medidas de DLS do híbrido PG4AuNp.	56
Figura 29 - Espectro de absorvância da solução de GOx em tampão fosfato de sódio na concentração de 1 mg/mL. No <i>inset</i> é mostrada a estrutura do cromóforo FAD (134) responsável pelas bandas de absorção com picos em 380 e 460 nm, atribuídas às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ao longo ao longo dos três ciclos do anel isoaloxazina.....	57
Figura 30 - Monitoramento do crescimento do filme da sequência PG4-GOx a partir de medidas de absorvância. No <i>inset</i> é mostrada a absorvância do filme em função do número de bicamadas.....	58

Figura 31 - Monitoramento do crescimento do filme da sequência PG4AuNp-GOx a partir de medidas de absorvância.	59
Figura 32 - Crescimento da absorvância em função do número de bicamadas depositadas nos filmes nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx.	59
Figura 33 – Espectros de FTIR dos filmes <i>cast</i> de PG4 puro e do híbrido PG4AuNp.	60
Figura 34 – Espectros de FTIR dos filmes <i>cast</i> de PG4, GOx, e do filme <i>LbL</i> contendo 15 bicamadas na sequência PG4-GOx.	61
Figura 35 - Espectros de FTIR dos filmes <i>LbL</i> na sequência PG4-GOx após 5, 10 e 15 bicamadas.	62
Figura 36 – Espectros de FTIR dos filmes <i>cast</i> de PG4AuNp, GOx e do filme <i>LbL</i> contendo 15 bicamadas na sequência PG4AuNp-GOx. No <i>inset</i> é mostrado o alargamento da banda resultante da soma das contribuições dos grupos NH ₂ do PG4AuNp e dos grupos N-H da GOx.	63
Figura 37 – Espectros de FTIR dos filmes na sequência PG4AuNp-GOx com 5, 10 e 15 bicamadas.	64
Figura 38 – (a) - Voltamogramas cíclicos repetitivos (15 ciclos) do eletrodo ITO em solução TFS após a adição de 20µL de PG4AuNp e o voltamograma do ITO em PBS antes da adição de nanopartículas. (b) - Voltamograma cíclicos repetitivos (15 ciclos) do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) com 5 bicamadas. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4. Velocidade de varredura 100mV/s. No <i>inset</i> são mostrados os voltamogramas a partir do segundo ciclo para melhor visualização.	66
Figura 39 – Voltamograma cíclico do (a) - filme ITO-(PG4-GOx) com 7 bicamadas e (b) dos eletrodos ITO-(PG4AuNp-GOx) com 3, 5, 7 bicamadas e do eletrodo de ITO. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4.	67
Figura 40 – Voltamograma cíclicos do eletrodo ITO-(PG4-GOx) ₅ em solução 1mmol/L de K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O. No <i>inset</i> são mostradas a correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4.	68
Figura 41 – Voltamograma cíclicos do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx), em solução 1mmol/L de K ₄ [Fe(CN) ₆].3H ₂ O, com 3-(a), 5-(b) e 7-(c) bicamadas. Nos <i>insets</i> são mostradas a correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para cada filme. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4.	69
Figura 42 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4-GOx) ₃ em eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mV/s e amplitude de pulso de 30 mV.	71
Figura 43 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₃ em eletrólito suporte: PBS 0,06 mmolL ⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura	

50 mV/s e amplitude de pulso de 30mV. No <i>inset</i> é mostrada a curva analítica de detecção de H ₂ O ₂	72
Figura 44 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₅ em eletrólito suporte: PBS 0,06M pH=7,4, velocidade de varredura 50 mV/s e amplitude de pulso de 30mV. No <i>inset</i> é mostrada a curva analítica de detecção de H ₂ O ₂	72
Figura 45 – Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₃ em função da concentração de H ₂ O ₂ . Faixa de frequência 0.1 a 10 ⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7.4. Potencial de 0V.	74
Figura 46 - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₅ em função da concentração de H ₂ O ₂ . Faixa de frequência 0.1 a 10 ⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7.4. Potencial de 0.16 V.	74
Figura 47 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₃ Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs ⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No <i>inset</i> é mostrada a curva analítica de detecção de glicose.....	75
Figura 48 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₅ Eletrólito suporte: PBS 0,06 mmolL ⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs ⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No <i>inset</i> é mostrada a curva analítica de detecção de glicose.....	76
Figura 49 – (a) - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₃ em função da concentração de glicose. Potencial 0,15V. (b) - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) ₅ em função da concentração de glicose. Faixa de frequência 0,1 a 10 ⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL ⁻¹ pH=7,4. Potencial 0,15 V.....	77

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AuNp	<i>Nanopartículas de ouro</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DM	<i>Diabetes Melito</i>
DPV	<i>Differential Pulse Voltammetry</i>
EPH	<i>Eletrodo Padrão de Hidrogênio</i>
far-UV	<i>far-ultraviolet</i>
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FTIR	<i>Fourier tranform infrared spectroscopy</i>
FID	<i>Federação Internacional de Diabetes</i>
GOx	<i>Glicose Oxidase</i>
EIE	<i>Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>
I_{pa}	<i>Corrente de pico anódico</i>
I_{pc}	<i>Corrente de pico catódico</i>
ITO	<i>Indium tin Oxide</i>
LbL	<i>Layer-by-layer</i>
LB	<i>Langmuir-Blodgett</i>
Np	<i>Nanopartículas</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
pI	<i>Ponto isoelétrico</i>
PAMAM	<i>Poli(amidoamina)</i>
PG4	<i>Poli(amidoamina)de geração 4</i>
PG4AuNp	<i>Nanopartículas de ouro ligadas a pamam geração 4</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
TFS	<i>Tampão fosfato de sódio</i>
UV-Vis	<i>Ultravioleta-visível</i>
VC	<i>Voltametria cíclica</i>

SUMÁRIO

Capítulo 1 Introdução	21
Capítulo 2 Revisão Bibliográfica.....	23
2.1 Enzimas.....	23
2.1.1 Glicose Oxidase	27
2.2 Filmes Automontados	29
2.3 Biossensores	31
2.3.1 Biossensores Enzimáticos	34
2.4 Biossensores de glicose	36
2.5 Nanomateriais	39
2.5.1 Nanopartículas Metálicas	40
2.5.2 Dendrímeros	43
Capítulo 3 Materiais e Métodos	47
3.1 Materiais e reagentes	47
3.2 Preparação dos filmes automontados	48
3.3 Espectroscopia na região do UV-Visível	49
3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho	49
3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	49
3.6 Medidas Eletroquímicas	50
3.6.1 Voltametria Cíclica (VC)	51
3.6.2 Medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)	53
3.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	54
Capítulo 4 Resultados E Discussão	55
4.1 Espectroscopia de Absorbância no UV-vis	55
4.1.1 Síntese das AuNps em PG4	55
4.1.2 Crescimento dos filmes finos	57
4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	60
4.3 Caracterização Eletroquímica	66
4.3.1 Caracterização das Nanopartículas no Filme Automontado.....	66
4.3.2 Cinética e Mecanismos de Transferência de Carga.....	68
4.3.3 Resposta Eletroquímica à oxidação do peróxido de hidrogênio.....	70
4.3.4 Estudo do Biossensor de Glicose.....	75
Capítulo 5 Conclusões	79
Capítulo 6 Propostas Para Trabalhos Futuros	81
REFERÊNCIAS	83

Capítulo 1 Introdução

Em uma conferência dada pelo físico Richard Feynman em 1959, ele encorajava o estudo de um novo campo que, segundo ele, nos diria muitas coisas de grande interesse sobre os estranhos fenômenos que ocorrem em situações complexas e, além disso, teria um grande número de aplicações técnicas (1). Feynman se referia à manipulação da matéria em escala atômica. É nesse contexto que duas décadas após começa a surgir uma nova área, mais tarde denominada nanotecnologia (2), que se dedica ao entendimento e aplicação das propriedades exibidas pelos materiais quando estruturados em escala nanométrica (3, 4).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de materiais nanoestruturados tem sido alvo de intenso estudo de muitos pesquisadores devido a sua enorme gama de aplicações em diversas áreas, como biologia, medicina, agroindústria e outras (5-7). Estes materiais são muito interessantes porque as suas propriedades diferenciam drasticamente das exibidas pelos seus precursores (8). Podemos assim obter propriedades otimizadas aliadas a dimensões reduzidas.

Materiais nanoestruturados podem exibir várias formas, incluindo nanopartículas, nanofios, nanotubos e filmes finos, geralmente dispostos em camadas com espessura nanométrica (9, 10). Dentre as técnicas empregadas na fabricação de filmes finos, citam-se as técnicas de Automontagem ou *LbL* (layer-by-layer) (11) e Langmuir-Blodgett (*LB*) (12). Ambas destacam-se por permitir um alto controle de parâmetros como espessura e arquitetura molecular. Porém a técnica *LB* possui um alto custo experimental necessário para a confecção dos filmes. A técnica *LbL* destaca-se pela sua simplicidade, baixo custo experimental e pela possibilidade de utilização de uma grande variedade de materiais (11, 13).

A possibilidade da manipulação de materiais biológicos em nanoescala para a aplicação em dispositivos tecnológicos tem despertado muito interesse na área de imobilização de proteínas e outras biomoléculas (14, 15). A confecção de filmes nanoestruturados utilizando materiais biológicos apresenta um enorme potencial de aplicações em biossensores e biotecnologia. Porém, a imobilização de biomoléculas como enzimas, anticorpos ou oligonucleotídeos em superfícies com a completa retenção de suas propriedades de reconhecimento, ainda é um fator crucial no desenvolvimento de biossensores (16).

A maioria dos procedimentos convencionais de imobilização de biomoléculas, incluindo *crosslinking*, ligação covalente e aprisionamento em gel ou membranas, sofre de baixa reprodutibilidade e possuem deposição espacial pouco controlada (16). Dentre as várias

técnicas empregadas para imobilizar biomoléculas destaca-se a técnica de automontagem que permite que a obtenção de uma estrutura multicamadas de maneira eficiente e com baixo custo experimental. O processo de imobilização se dá num ambiente favorável às biomoléculas, em solução aquosa, com pH e força iônica controlados, evitando assim desnaturação e a perda de atividade (17-18).

Dentre os vários tipos de biossensores baseados na imobilização de biomoléculas, os biossensores enzimáticos têm recebido atenção especial. A enzima glicose oxidase é a mais utilizada em biossensores enzimáticos, devido à sua alta especificidade, estabilidade e baixo custo de obtenção, quando comparada às outras enzimas, e à sua grande importância em diagnósticos clínicos (19).

O trabalho descrito nessa dissertação tem por objetivo o desenvolvimento e caracterização de filmes automontados contendo a enzima glicose oxidase imobilizada em conjunto com dendrímeros poli(amidoamina) de geração 4, e o dendrímero híbrido com nanopartículas de ouro. Esses filmes foram caracterizados por técnicas ópticas, espectroscópicas e eletroquímicas que revelaram como esses materiais se organizam nesse tipo de arranjo supramolecular. Também nos propusemos a estudar a viabilidade da utilização destes filmes finos para atuar como sensores de glicose.

Capítulo 2 Revisão Bibliográfica

2.1 Enzimas

Todas as enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA que apresentam propriedades catalíticas. As enzimas são essenciais para todos os processos bioquímicos, uma vez que catalisam centenas de reações graduais que degradam moléculas nutrientes, conservam e transformam em energia química, e fazem macromoléculas biológicas a partir de precursores simples (20). O potencial catalítico de enzimas é extraordinário, em geral muito maior que os catalisadores sintéticos ou inorgânicos (20, 21). Estas possuem um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas e atuam em soluções aquosas sob condições muito suaves de temperatura e pH (22). Estas propriedades são apresentadas por poucos catalisadores não-biológicos (20). A atividade catalítica das enzimas depende fortemente da integridade da sua conformação nativa. Se uma enzima sofre desnaturação ou é dissociada em pequenas subunidades, a atividade catalítica poderá ser destruída.

Enzimas, como todas as proteínas, são longas cadeias poliméricas constituídas de aminoácidos. As unidades monoméricas (aminoácidos) formadoras das proteínas são poucas em número e idênticas em todas as espécies vivas. Vinte aminoácidos distintos são encontrados nas proteínas, todos esses contêm um grupo amina e um grupo carboxila ligado ao mesmo carbono, designado α -carbono. Esses α -aminoácidos diferem uns dos outros apenas por suas cadeias laterais ou grupos R conforme mostrado na Figura 1-(a). As proteínas são formadas por ligações peptídicas entre os aminoácidos constituintes, que são ligações do grupo amino ($-\text{NH}_2$) de um aminoácido com o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) de outro aminoácido, através da formação de uma amida, conforme é ilustrado na Figura 1-(b) (23).

Figura 1 - (a) Estrutura molecular de um aminoácido. (b) Representação de uma ligação peptídica.

A estrutura das proteínas é bastante complexa. Para descrever a estrutura das mesmas são necessários quatro níveis que denominamos estruturas primária, secundária, terciária e quaternária (22). A estrutura primária trata-se da ordem em que os aminoácidos se encontram na cadeia e do número de aminoácidos que a compõem. A estrutura secundária se refere aos arranjos que os resíduos de aminoácidos assumem, dando origem a padrões estruturais recorrentes. Os tipos de configurações mais proeminentes das cadeias de ligações peptídicas são as formas α -hélice e folhas β (20). A estrutura terciária descreve todos os aspectos do desdobramento tridimensional de um polipeptídeo. Quando uma proteína possui duas ou mais subunidades de polipeptídios, há a formação de um complexo tridimensional, e denominamos esse arranjo espacial de estrutura quaternária. Na Figura 2 estão ilustrados os quatro níveis estruturais em uma proteína.

As enzimas podem ser classificadas de acordo os tipos de reações por elas catalisadas. Essas são divididas em seis classes: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (20). Na Tabela 1 é mostrada a classificação internacional das enzimas baseada nos tipos de reações por ela catalisadas.

Figura 2 - Níveis estruturais em uma proteína (20).

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas (20).

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H).
2	Transferases	Reações de transferência de grupos.
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água).
4	Liasas	Adição de grupos às duplas ligações ou formação de duplas ligações por meio de remoção de grupos.
5	Isomerases	Transferência de grupos da mesma molécula para formar isômeros.
6	Ligases	Formação de ligações do tipo C-C, C-S, C-O e C-N por meio de reações de condensação acopladas à quebra de ATP.

Algumas enzimas são constituídas apenas de uma ou mais cadeias polipeptídicas, enquanto outras apresentam também algum outro componente químico adicional necessário à sua atividade, ou que a acentuam, podendo ser um íon inorgânico denominado cofator, uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica denominada coenzima (24). Quando a coenzima ou o cofator se encontram firmemente ou mesmo covalentemente ligado à parte protéica da enzima, estes recebem a denominação de grupo prostético. A enzima, juntamente com seu grupo prostético, é então chamada de holoenzima e a parte prostética, apoenzima (24). Na Figura 3 é mostrado o grupo prostético da glicose oxidase mostrando a

estrutura da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) em destaque, uma coenzima de enzimas oxiredutases que atua como agente oxidante biológico (20).

Figura 3 - Cofator FAD, em destaque, ligado à enzima glicose oxidase (25).

Os polipeptídios possuem cargas elétricas devido principalmente aos grupos ionizáveis das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (23). A carga líquida de uma proteína irá depender do número de cadeias ionizáveis, do valor do pK e do pH do meio. O pH onde a soma das cargas negativas é igual a das cargas positivas é denominado ponto isoelétrico (pI) da proteína. Em pH maior do que o pI a proteína terá carga negativa efetiva. Em pH menor do que o pI a proteína terá carga positiva efetiva (26). Portanto, a magnitude da carga elétrica efetiva de uma proteína depende da diferença entre o pH e o pI da mesma (23).

2.1.1 Glicose Oxidase

A glicose oxidase (GOx) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- δ -lactone, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (27). Na Figura 4 é mostrada a reação de oxidação da glicose pela GOx. Sua descoberta ocorreu em 1928 por Muller, em extratos do fungo *Aspergillus niger* (28). Esta é produzida naturalmente por alguns fungos e insetos, onde o seu produto catalítico, H_2O_2 , atua como um agente bactericida e fungicida (29).

A GOx faz parte da classe das oxiredutases, que catalisam reações por trocas de cargas ou de oxiredução utilizando o oxigênio molecular como aceitador de elétrons, gerando como subproduto o peróxido de hidrogênio. Uma maneira de determinar o seu comportamento enzimático é avaliar a quantidade de peróxido de hidrogênio formado. Existem várias publicações com métodos de determinação da glicose onde se utiliza a detecção de peróxido de hidrogênio (30).

Figura 4 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase (31).

A GOx é uma enzima globular dimérica que tem o FAD por cofator, o diâmetro médio da GOx é 8 nm (28). Uma unidade monomérica da GOx possui o formato esferóide e compacto com dimensões 60 Å x 52 Å x 37 Å. A Figura 5 representa a simulação computacional da molécula de GOx com o seu cofator, obtida a partir do fungo *Aspergillus niger* através de um modelo de fitas (32). O pH ótimo da glicose oxidase é 5,5. Entretanto possui uma faixa de boa atividade entre pH 4-7. O seu ponto isoelétrico é 4,2. Para valores de pH maiores que o seu pI esta pode ser utilizada na montagem de filmes *LbL* como polieletrólito aniônico (33, 34).

Figura 5 - Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase (25).

A GOx é de considerável importância comercial. Tem sido utilizada no cozimento, na produção de ovo em pó, na produção de vinho e na produção de ácido glucônico, entre outros (29). Porém, as suas aplicações não se resumem apenas a aplicações industriais. A GOx é a enzima mais estudada para a atuação em biossensores de glicose devido a sua alta especificidade, estabilidade e baixo custo de obtenção quando comparada a outras enzimas (35-37).

2.2 Filmes Automontados

O desenvolvimento de técnicas de fabricação de filmes ultrafinos surgiu da necessidade de se obter estruturas organizadas com controle de espessura e de propriedades na escala molecular. As primeiras tentativas de produzir filmes ultrafinos de moléculas orgânicas foram feitas por Irving Langmuir, e mais tarde Katharine Blodgett. A técnica desenvolvida por eles recebeu então a denominação Langmuir-Blodgett (LB) (11, 38). Os filmes LB possuem elevada organização estrutural em escala nanométrica, porém esta técnica é bastante sofisticada e requer um ambiente de trabalho extremamente limpo e isolado, tornando o seu custo bastante elevado.

Sagiv e colaboradores desenvolveram um método alternativo ao LB, utilizando automontagem, que está fundamentado na adsorção espontânea sequencial de monocamadas sobre um substrato, e não é necessária nenhuma intervenção externa para que o filme seja formado (39). A técnica consiste na imersão de um substrato quimicamente modificado em uma solução contendo moléculas bifuncionais. Como essas moléculas são bifuncionalizadas, a extremidade que não se liga ao substrato pode, em uma nova imersão, novamente se ligar formando uma nova monocamada. A repetição sistemática desse processo levará à formação de um filme multicamadas. O método de Sagiv apresenta por limitações o fato de depender de reações químicas com um alto rendimento e a obrigatoriedade de utilizar compostos com funcionalidades químicas específicas para a adsorção da camada posterior. Nessa técnica, a constante presença de impurezas acarreta uma constante diminuição dos sítios de adsorção, uma vez que estas podem proteger os sítios de moléculas adsorventes (11, 40).

Decher e colaboradores (41), na década de 90, propuseram que filmes finos automontados fossem obtidos através da adsorção física, baseada em interações eletrostáticas entre moléculas contendo grupos iônicos, como compostos polieletrólitos e anfifílicos. Atualmente essa técnica é conhecida por *LbL* (*layer-by-layer*). A vantagem dessa abordagem é que a adsorção das camadas ocorre por interações iônicas, não havendo necessidade de que uma ligação covalente seja formada, permitindo assim que uma grande variedade de materiais possa ser utilizada (13, 42). Outros atrativos dessa técnica são o seu baixo custo, a simplicidade do aparato experimental e a possibilidade de obter filmes nanoestruturados em substratos de diferentes tamanhos ou formas (11, 13).

Na técnica *LbL*, um substrato carregado negativamente, por exemplo, é imerso em uma solução catiônica durante um determinado intervalo de tempo. Em seguida é imerso numa

solução de lavagem para retirar as moléculas que não foram adsorvidas e então é colocado na solução aniônica para formação da camada seguinte. Após, é novamente imerso na solução de lavagem e retirado, obtendo assim a segunda camada (1ª bicamada). A repetição desse processo leva a filmes multicamadas. Obtêm-se assim um arranjo que preserva a identidade dos componentes e ainda permite que sejam obtidas novas propriedades. A Figura 6 mostra a representação de um filme fino obtido a partir desta técnica.

Figura 6 - Representação de um filme fino obtido a partir da técnica de automontagem baseada na interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos.

Comparada com a técnica LB que apresenta uma alta orientação molecular a cada monocamada, a técnica *LbL* pode ter um caráter desordenado (43). Entretanto, a aderência das próximas camadas nesses filmes não é afetada de forma expressiva por pequenas imperfeições na adsorção, uma vez que a repetição do processo de deposição de camadas leva a uma minimização dessas falhas. Outro aspecto importante sobre o processo de formação das multicamadas é que as camadas que compõem o filme não são exatamente bem delimitadas, podendo ocorrer interpenetrações das cadeias de polieletrólitos adsorvidos (44, 45).

A técnica de automontagem *LbL* é um dos mais versáteis métodos de deposição de filmes finos. Essa técnica tem sido utilizada especialmente na imobilização de biomoléculas em substratos sólidos para aplicação em biossensores e biotecnologia (46-49). A dimensão

molecular dos filmes resultantes dessa técnica torna os biossensores economicamente viáveis mesmo quando o material a ser imobilizado possui um custo elevado (50).

2.3 Biossensores

A história dos biossensores começa em 1962 quando Clark e Lyons (51), em seu artigo tratando sobre o monitoramento contínuo do sangue, sugeriram que uma camada muito fina de enzima solúvel poderia ser retida na superfície de um eletrodo de oxigênio (Eletrodo de Oxigênio de Clark), com o uso de uma membrana dialítica. Estes autores foram os primeiros a mencionarem a utilização de biocatalisadores acoplados a transdutores eletroquímicos, introduzindo o termo “eletrodo enzimático”. Em 1967, Updike e Hicks (52) utilizaram o eletrodo de oxigênio de Clark para imobilizar a enzima glicose oxidase em gel de poliacrilamida para a medição do sensoramento de glicose em soluções biológicas e em tecidos *in vitro*. Alguns anos mais tarde, Guilbault e Montalvo (53) descreveram um sensor para uréia baseado na imobilização da enzima uréase em uma membrana.

Um biossensor é um dispositivo analítico composto de um elemento de reconhecimento biológico, denominado biorreceptor, que em contato íntimo a um transdutor, irá converter a concentração de um determinado analito em uma resposta mensurável (54). Na Figura 7 são apresentados os principais componentes de um biossensor. Estes podem ser classificados de acordo com o método de detecção em transdutores ópticos, elétricos, eletroquímicos e térmicos, entre outros (55). Os biossensores também são classificados quanto ao tipo de biorreceptor em biossensores enzimáticos, imunossensores, genossensores, etc (55). Na Tabela 2 são resumidos os principais tipos de biorreceptores e suas descrições.

Em um biossensor, é desejável que a sua porção sensível seja pequena, permitindo assim análises em frações reduzidas de amostras. Isso requer uma atividade seletiva, máxima ou específica, para determinados compostos e com mínima interferência possível, para que o sinal possa ser identificável com facilidade (56-57).

Biossensores eletroquímicos são os mais comuns para o uso em análises clínicas. Esses podem ser amperométricos, potenciométricos, condumétricos ou impedanciométricos. Dentre esses, os amperométricos são a classe mais difundida, mais numerosa e com maior sucesso

comercial em dispositivos eletrônicos biomoleculares. A importância desses dispositivos deve-se ao fato de terem sido os primeiros nesse novo campo de biotecnologia analítica (58).

Figura 7 - Principais constituintes de um biossensor.

Tabela 2 - Principais tipos de bioreceptores utilizados para o desenvolvimento dos biossensores (59).

<i>Bioreceptores</i>	<i>Descrição</i>
Enzimas	Catalisadores de reações com um alto grau de especificidade por seus substratos.
Anticorpos	A relação entre um anticorpo e seu antígeno é muito específica.
Ácidos nucleicos	Possuem alta especificidade dos pares de bases distribuídos ao longo da dupla hélice que forma a cadeia de DNA.
Microorganismos (fungos, bactérias, etc.)	Podem assimilar compostos orgânicos e produzir enzimas que serão detectadas por um receptor.

Os biossensores amperométricos são dispositivos mantidos em potencial fixo e que propiciam sinais de corrente proporcionais à concentração do analito, em função de processos eletroquímicos que ocorrem na interface eletrodo/solução (60). A corrente medida é uma função da presença em solução de uma substância eletroquimicamente ativa, cuja oxidação ou redução pode se dar na superfície do eletrodo de trabalho proporcionalmente à quantidade dessa substância em solução.

De acordo com o processo envolvido na transferência de carga, os sensores amperométricos podem ser classificados em três principais grupos: primeira, segunda e terceira geração (54). Na Figura 8 são ilustradas as diferentes gerações de biossensores. A seguir são apresentadas as descrições de cada grupo. Neste trabalho, nanopartículas de ouro foram utilizadas como mediadores de elétrons para o estudo de biossensores de glicose, portanto, biossensores de segunda geração.

- Primeira geração: Sensores baseados na medida da concentração de substratos naturais ou de um produto de uma reação enzimática;
- Segunda geração: Sensores que utilizam mediadores como transportadores de elétrons do centro ativo da enzima para o eletrodo;
- Terceira geração: Sensores que utilizam transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo.

Figura 8 - Representação esquemática dos diferentes tipos de gerações de biossensores (54).

2.3.1 Biossensores Enzimáticos

Desde a década de 60 grandes esforços vem sendo realizados para o desenvolvimento de biossensores enzimáticos. Tal fato possibilitou o surgimento de novas técnicas de imobilização enzimática, novos materiais utilizados como matriz para imobilização enzimática e novas técnicas de transdução (61-64). Vários analitos de interesse podem ser detectados por biossensores enzimáticos. Dentre esses, citam-se a glicose, a uréia e o ácido ascórbico (47, 65-66).

O fato de reações enzimáticas serem altamente específicas, possuindo um grande potencial catalítico, superior a qualquer catalisador sintético, possibilita que biossensores baseados nestes biocatalizadores sejam utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra. Tornam-se assim desnecessários os processos de separação e purificação das amostras, muitas vezes necessários em análises químicas. Ainda que a atividade enzimática seja reduzida até certo ponto pela imobilização, biossensores enzimáticos têm vantagens como maior estabilidade conformacional e possível reutilização (67).

Uma objeção para a utilização de enzimas como reagentes analíticos reside no fato de possuírem um elevado custo, especialmente se purificados. A imobilização da enzima elimina esse problema, uma vez que, a princípio, podem ser usadas repetidas vezes. A imobilização enzimática pode ser feita utilizando diversos procedimentos. Tais procedimentos podem ser divididos em quatro grupos: (a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulação e (d) entrecruzamento. Na Figura 9 são ilustrados os procedimentos de imobilização enzimática. O método utilizado neste trabalho foi a adsorção física, baseada na interação eletrostática de polieletrólitos com cargas opostas.

Figura 9 - Esquema ilustrativo dos tipos básicos de métodos de imobilização enzimáticos: a) adsorção; (b) ligação covalente; (c) encapsulação, e (d) ligação covalente cruzada (68).

No projeto de biossensores enzimáticos é importante que seja encontrado um método adequado de imobilização enzimática que se tenha alta atividade enzimática e estabilidade, evitando o processo de desnaturação. Uma descrição dos principais métodos de imobilização enzimática é mostrada a seguir:

a) Adsorção física

O método mais simples e rápido de imobilização enzimática é a adsorção física, o qual se baseia em interações físicas entre a enzima e a superfície onde a enzima será imobilizada. Nesse método a atividade enzimática observada é próxima à atividade natural da enzima. As principais vantagens desse método são a sua simplicidade e baixo custo experimental (69).

b) Ligação covalente

O método que emprega a formação de ligação covalente é o método que tem sido mais utilizado (46, 70). Neste caso a retenção da enzima na superfície do suporte é efetuada por ligações entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do suporte. Porém, a técnica apresenta como desvantagem a perda de parte da atividade enzimática devido a mudanças nas conformações dos sítios ativos das enzimas (69, 71).

c) Entrecruzamento

Este método é baseado na formação de um reticulado das moléculas da enzima de modo a formar uma rede rígida. Nesse processo tem-se a vantagem de uma ligação enzima-enzima mais sólida, porém, pode induzir a formação de barreiras de difusão, aumentando assim o tempo de resposta do biossensor (69).

d) Encapsulação

No método de encapsulação é feito um confinamento da enzima em uma membrana localizada na superfície do eletrodo. Tal membrana irá reter a enzima de forma a permitir livre difusão do substrato e dos produtos da reação da mesma. A principal desvantagem desta técnica está associada aos fenômenos de transferência de massa do substrato, aos produtos da reação enzimática e ao crescimento de microorganismos na superfície da membrana.

2.4 Biossensores de glicose

O desenvolvimento de biossensores para o monitoramento de glicose no sangue constitui um importante avanço no sistema de auto-avaliação para pacientes diabéticos (72). Atualmente, testes de glicose podem ser feitos de forma rápida e prática através de biossensores comerciais. Estes são dispositivos baseados na medida da corrente elétrica gerada pela oxidação da glicose feita pela enzima glicose oxidase (73). Geralmente esses dispositivos possuem uma leitura na faixa de 10 a 600 mg/dL. Na Figura 10 é mostrado um biossensor comercial da marca Accu-Chek e o teste clínico para o monitoramento de glicose.

Os biossensores são vendidos em lotes separadamente dos dispositivos eletrônicos para a análise. O preço do dispositivo medidor de glicose está na faixa de R\$ 50 a 130,00, enquanto que as fitas enzimáticas custam em torno de R\$ 0,80/ fita. Alguns pacientes usam 2 ou mais fitas por dia. Considerando-se que o salário mínimo atual no Brasil é de R\$ 622,00 o custo dos biossensores comerciais de glicose ainda é caro para a população de mais baixa renda.

Figura 10 - a) Dispositivo eletrônico analisador de glicose (74) e b) sensores de glicose da marca Accu-Chek (75). c) Teste de glicose a partir de um biossensor comercial (76).

Biossensores amperométricos baseados na enzima GOx são as ferramentas mais eficientes na determinação de glicose e são muito importantes em diversas áreas como: biologia, química e médica, entre outras (37). Na maioria dos biossensores amperométricos, a GOx é imobilizada em filmes por ligação covalente e a quantidade de glicose imobilizada é muito pequena, uma vez que, em geral, são feitas apenas monocamadas de GOx, ou até 3

camadas alternadas com outros polieletrólitos (37, 46, 77-78). Na Figura 11 estão ilustradas algumas das mais comuns configurações de imobilização da GOx em trabalhos recentes.

Figura 11 - Algumas configurações de imobilização da GOx em trabalhos recentes. a) Imobilização a partir da técnica *LbL* com o polímero quitosana em um filme de Azul da Prússia (78). b) Imobilização a partir de deposição eletroquímica com nanopartículas de ouro e o híbrido quitosana-ferroceno (37). c) Imobilização em materiais porosos à base de carbono (79). d) Imobilização por *crosslinking* com o dendrímero PAMAM G4 (77).

A importância da detecção de glicose gerou um grande número de publicações e esse fluxo não mostra sinais de estar diminuindo (34-35, 37, 46, 80-81). Apesar dos grandes avanços na concepção e utilização de biossensores de glicose desde a década de 60, a gestão de um sensoriamento de glicose robusta ainda não foi completamente cumprida. Ainda existem maiores desafios para alcançar um monitoramento glicêmico contínuo, clinicamente preciso, em conexão a um “sistema fechado” otimizado para a entrega de insulina no corpo. Essa resposta a mudanças químicas no corpo pode servir como modelo para o monitoramento de diferentes doenças (82).

A Tabela 3 mostra diferentes biossensores enzimáticos de glicose em trabalhos recentes, eles possuem uma boa faixa de detecção de glicose e também limites de detecção, porém, na maioria dos biossensores as medidas de detecção são feitas em potenciais altos. A importância na detecção de glicose em potenciais baixos é a diminuição do número de interferentes na

medida, pois, em potenciais mais elevados outras espécies podem sofrer oxidação afetando a acurácia e eficiência do sistema analítico (83).

Tabela 3 – Alguns trabalhos recentes com biossensores enzimáticos de glicose.

Diferentes biossensores	Faixa de detecção	LD	Potencial
1. Crespilho, F. N.; et al. <i>Talanta</i> 2008, 76, 922-928.	0 a 250 μ M	6.1 μ M	0 V
2. Qiu, J.-D.; Wang, R.; Liang, R.-P.; Xia, X.-H. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> 2009, 24, 2920-2925.	0.02 a 8.66 mM	5.6 μ M	0.4 V
3. Senel, M.; Nergiz, C. <i>Current Applied Physics</i> 2012, 12, 1118-1124.	1 a 18 mM	0.5mM	0.6V
4. Chen, M.; Zhang, W.; Jiang, R.; Diao, G. <i>Analytica Chimica Acta</i> 2011, 687, 177-183.	0.08 a 10 mM	20 μ M	0.6V
5. German, N. et al In <i>Microchimica Acta</i> ; Springer Wien, 2011; Vol. 172, pp 185-191.	0.1 a 10 mM	0.05mM	0.3V

2.5 Nanomateriais

Nanomateriais são bastante atrativos devido às suas propriedades diferirem drasticamente das propriedades exibidas pelos seus precursores (8). As propriedades desses materiais dependem de seu tamanho e morfologia, o que tem chamado a atenção de muitos pesquisadores que veem no estudo de nanomateriais a possibilidade de moldá-los de forma a serem obtidas propriedades específicas e controláveis (84, 85).

Uma série de nanomateriais, como nanotubos, nanofios, fulerenos e nanopartículas preparadas a partir de metais, semicondutores ou espécies poliméricas, têm sido bastante estudadas para inúmeras aplicações nas áreas de nanotecnologia, nanobiotecnologia e medicina (36, 70, 80, 86-90). Isso deve-se às propriedades como a grande razão superfície-volume, alta eficiência catalítica e sua grande habilidade de adsorção (36, 91). Na Figura 12 são mostrados alguns dos principais nanomateriais estudados.

Figura 12 - Alguns tipos de nanomateriais em estudo. (i) Nanotubos de carbono. (ii) Fulerenos. (iii) Nanopartículas metálicas estabilizadas em dendrímeros (92).

2.5.1 Nanopartículas Metálicas

Nanopartículas (Nps) podem ser formadas a partir da maior parte dos elementos da tabela periódica (93), podendo ser classificadas como metálicas, semicondutoras ou poliméricas, de acordo com seus constituintes. As nanopartículas metálicas, especialmente as de ouro (AuNps), tem despertado grande interesse devido às propriedades eletrônicas, ópticas e térmicas, bem como às suas propriedades catalíticas e um potencial de aplicações em áreas como física, química, biologia, medicina, ciências de materiais e seus diferentes campos multidisciplinares (84, 94-95).

As Nps metálicas são bastante conhecidas por suas propriedades de ressonância de superfície plasmônica (SPR- do inglês *surface plasmon resonance*) (96, 97), originadas devido à excitação coletiva dos elétrons de condução em resposta a uma excitação óptica. A banda de SPR é uma banda de absorção forte e larga observada no espectro de absorção de UV-Vis de Nps com tamanhos superiores a 2 nm (97-98). Para tamanhos inferiores a 2 nm os efeitos quânticos são predominantes, e não se observa o fenômeno de SPR (97, 99). Se uma nanopartícula metálica esférica é irradiada pela luz, o campo elétrico oscilante faz com que os elétrons de condução oscilem de forma coerente, assim a nuvem eletrônica é deslocada em relação ao núcleo. A frequência de oscilação irá depender de parâmetros como densidade eletrônica, massa efetiva dos elétrons, constante dielétrica do meio, geometria e tamanho da distribuição eletrônica (100). A excitação coletiva de um gás formado por elétrons é chamada de ressonância de plasmom (101). Na Figura 13 é ilustrada a oscilação plasmônica em uma superfície esférica.

Figura 13 - Ilustração esquemática da oscilação da nuvem eletrônica de uma superfície esférica sob o efeito de uma onda eletromagnética (100).

Quando a luz incide em nanopartículas do mesmo tamanho ou com tamanho da mesma ordem do comprimento de onda da luz incidente, passa-se a considerar fenômenos de

espalhamento e não apenas absorção. Nessa situação devem ser considerados os efeitos de espalhamento de Mie (101). A teoria de Mie foi desenvolvida a partir das soluções das equações de Maxwell para o espalhamento de partículas esféricas em 1905 (102). A soma das contribuições de absorção e espalhamento Mie resulta no chamado espectro de extinção (103).

As NPs podem ter absorção de luz pelo plasmon nas regiões do espectro visível, ultravioleta e infravermelho próximo. Um aumento no tamanho das nanopartículas pode resultar no deslocamento das bandas de absorção de plasmon de superfície para regiões de maior comprimento de onda (97). Na Figura 14 são mostradas soluções coloidais de nanopartículas de ouro e prata com diferentes geometrias e tamanhos.

Figura 14 - Soluções coloidais de nanopartículas de ouro e prata com diferentes tamanhos, composição e geometrias. Da esquerda para a direita as soluções 1, 2 e 9 são de nanobarras de ouro. As soluções 3, 4 e 6 são nanobarras de Au/Ag. A solução 5 contém nanoesferas de prata. As soluções 7 e 8 são misturas de nanoesferas e nanobarras de ouro (96).

As nanopartículas sem revestimentos são muito instáveis, apresentam alta energia superficial e tendem a agregar-se em solução. Assim, polímeros, dendrímeros, líquidos iônicos e surfactantes geralmente são usados como estabilizantes, evitando que as nanopartículas formem aglomerados (104-107). Na Figura 15 são mostradas nanopartículas estabilizadas por diferentes materiais em diversas configurações.

Em uma síntese típica de nanopartículas metálicas, geralmente um sal metálico, como HAuCl_4 , é reduzido pela adição de um agente redutor que leva a nucleação de íons a nanopartículas. Adicionalmente, é necessário um agente estabilizante que possa absorver ou mesmo se ligar quimicamente às nanopartículas. Esse agente estabilizante pode estar carregado,

de maneira que as nanopartículas que possuem cargas iguais se repelem, adquirindo assim uma conformação coloidal estável (107, 108).

Figura 15 - (a) Formação de nanopartículas estabilizadas em um dendrímero (92). (b) Formação de nanopartículas estabilizadas em um polímero (107).

Inúmeras são as aplicações de nanopartículas metálicas. Estas podem ser usadas para a modificação de superfícies de eletrodos, ou para modificar moléculas biológicas como enzimas, anticorpos ou oligonucleotídeos (30). Uma das funções mais importantes das nanopartículas é a sua alta atividade catalítica para muitas reações, especialmente as nanopartículas de metais nobres (109). Tal propriedade possibilita que estas sejam utilizadas em biossensores eletroquímicos pela capacidade de promover uma rápida transferência de elétrons entre o eletrodo e a proteína (30, 36).

2.5.2 Dendrímeros

Dendrímeros são macromoléculas monodispersas altamente ramificadas. Diferentemente dos polímeros lineares, os dendrímeros apresentam estruturas bem definidas e um peso molecular uniforme (110). O termo dendrímero tem origem grega ‘dendron’ que significa árvore e ‘mero’ que significa parte. Isso deve-se à analogia com a estrutura dos dendrímeros que possuem muitas ramificações, características tridimensionais que lembram a arquitetura de uma árvore (111).

Um dendrímero típico é constituído de quatro componentes estruturais principais: (i) um núcleo central multifuncional, (ii) unidades ramificadas denominadas ‘dêndrons’, (iii) grupos terminais na superfície e (iv) cavidades internas. As unidades ramificadas são organizadas em camadas chamadas de “gerações”, e representam a unidade de monômero de repetição dessas macromoléculas (110). Essas crescem a partir de um núcleo designado por ‘geração 0’ e cada conjunto de unidades monoméricas adicionadas é designado por ‘Geração N’, onde N é o número de unidades monoméricas adicionadas, conforme ilustrado na Figura 16. Esta adição torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter uma estrutura globular e densa. Os pontos de ramificação em cada unidade monomérica são capazes de conduzir a estruturas com definidos números de geração e grupos funcionais terminais. Os grupos funcionais de sua superfície podem então ser convenientemente ativados para a imobilização de enzimas, biocatalisadores essenciais para o desenvolvimento de biossensores (32).

Figura 16 - Ilustração de um dendrímero de geração 3.

Dendrímeros têm recebido grande atenção de pesquisadores por possuírem propriedades únicas devido a sua forma globular, superfícies multifuncionais e à presença de cavidades internas. A mais importante é a possibilidade de encapsular moléculas em seu interior, podendo atuar como transporte de medicamentos (89, 112), o que possibilita uma gama de aplicações em biologia e medicina. Na Figura 17 são mostrados dois tipos de encapsulamento de drogas por dendrímeros.

Figura 17 - Diferentes formas de encapsulamento de um medicamento por um dendrímero. As bolinhas azuis e verdes representam fármacos armazenados no interior e no exterior do dendrímero.

Os dendrímeros geralmente são sintetizados usando o método divergente ou o método convergente: o método divergente, desenvolvido por Tomalia (113), no qual o dendrímero cresce para fora de um núcleo central e o método convergente de Fréchet (114), no qual o dendrímero é sintetizado da periferia para o interior terminando no núcleo.

No método divergente, o dendrímero cresce para o exterior a partir de uma molécula de núcleo multifuncional (115). A molécula central reage com moléculas de monômero reativas contendo um e dois grupos dormentes, dando origem ao dendrímero de primeira geração. A nova periferia da molécula é ativada para reações com mais monômeros. O processo é repetido por várias gerações, camada por camada. Enquanto que na abordagem convergente, o dendrímero é construído por etapas, a partir dos grupos finais e para dentro, progredindo (115). Quando o crescimento dos braços poliméricos ramificados, chamado dêndrons, é grande o suficiente, estes são conectados a uma molécula de núcleo multifuncional (116). Na Figura 18 é mostrado o esquema idealizado das sínteses a partir dos métodos divergente e convergente.

Figura 18 - Ilustração dos métodos divergente e convergente (110).

Os dendrímeros mais representativos são os poli(amidoamina) (PAMAM) e os poli(propilenoimina) (PPI), que são produzidos em grande escala industrial e distribuídos comercialmente (117). O dendrímero utilizado neste trabalho foi o poli(amidoamina) de geração 4 (PG4) com núcleo de etilenodiamina. O PG4 possui 64 grupos terminais NH_2 na superfície, o que o torna altamente solúvel em água. Uma vez protonados, os grupos terminais aminas ficam carregados positivamente permitindo assim que o PG4 seja utilizado como polieletrólito positivo na formação de filmes *LbL*, juntamente com um polieletrólito de carga oposta. As moléculas de PG4 possuem quatro ramificações de poliamida ligadas ao seu núcleo e o seu diâmetro médio do é 4,5 nm (118). Essas ramificações fazem com que essa molécula tenha cavidades intramoleculares possibilitando um eficiente encapsulamento de nanopartículas.

A escolha do dendrímero PG4 e do híbrido PG4AuNp para a confecção dos filmes *LbL* foi motivada por ser carregado positivamente, e pelo grande número de grupos terminais.

Capítulo 3 Materiais e Métodos

3.1 Materiais e reagentes

Foram utilizados três compostos para a confecção dos filmes automontados: a enzima glicose oxidase (GOx), o dendrímero poli(amidoamina) de geração 4 (PG4) com núcleo de etilenodiamina e o dendrímero híbrido PG4 com nanopartículas de ouro (PG4AuNp). A estrutura dessas moléculas é mostrada na Figura 19.

Figura 19 - Materiais utilizados para a construção dos filmes *LbL*. a) Glicose Oxidase (25). b) PG4 (119).

Todos os reagentes foram utilizados usados como adquiridos. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada, purificada por um sistema Millipore (Milli-Q) com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$. A enzima glicose oxidase (200 U/mg) foi adquirida comercialmente da Sigma, e foi utilizada em solução tampão fosfato de sódio (TFS) $0,01 \text{ molL}^{-1}$, pH=6,5, na concentração de 1,5 mg/mL. O polieletrólito poli(amidoamina) de geração 4 foi adquirido comercialmente da Aldrich Co, e também foi preparado em solução TFS $0,01 \text{ molL}^{-1}$ com pH=6,5 na concentração de 3 mg/mL. O híbrido PG4AuNp foi sintetizado em nosso laboratório usando ácido fórmico como agente redutor.

3.2 Preparação dos filmes automontados

3.2.1 Técnica de automontagem

Para a confecção dos filmes *LbL*, as soluções aquosas de GOx e PG4 foram preparados em tampão fosfato de sódio (TFS) $0,01 \text{ molL}^{-1}$, pH=6,5. Na concentração de 1,5 mg/mL e 3 mg/mL para a GOx e o polieletrólito poli(amidoamina) de geração 4, respectivamente.

Foram confeccionados filmes *LbL* nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx, onde a GOx atuou como poliânion, e os dendrímeros puro e híbrido, PG4 e PG4AuNp-GOx atuaram como policátions. A solução de lavagem utilizada foi o mesmo tampão utilizado para preparar as soluções de GOx. Os tempos de imersão para cada camada foram de 6 minutos para o PG4 e PG4AuNp e de 10 minutos para a GOx. Na Figura 20 é mostrada a estrutura idealizada dos filmes automontados nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx.

Figura 20 - Estrutura idealizada dos filmes contendo a glicose oxidase imobilizada nas sequências: (a) PG4-GOx e (b) PG4AuNp-GOx.

3.2.2 Filmes *cast*

A técnica *casting* consiste no espalhamento da solução precursora da amostra sobre um substrato, em seguida, o solvente é eliminado por evaporação, resultando na formação de um filme. Os filmes *cast* foram feitos sobre substratos de silício para o estudo de FTIR dos materiais puros. Os filmes foram secos em uma estufa a vácuo, à temperatura ambiente, durante 2 horas.

3.3 Espectroscopia na região do UV-Visível

Medidas de espectroscopia de absorção na região UV-Vis foram realizadas para monitorar as etapas de crescimento dos filmes automontados. A partir do aumento da absorbância em bandas características dos materiais em função do número de bicamadas depositadas sobre o substrato, é possível inferir sobre o crescimento dos filmes. Foram estudados filmes com até 17 bicamadas nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx. As medidas foram realizadas a cada duas bicamadas depositadas sobre um substrato de quartzo. A limpeza das lâminas de quartzo foi feita colocando-as em solução sulfonítrica aquecida a 60°C por 5 minutos. As medidas de absorbância foram realizadas no espectrofotômetro HITACHI U-2800.

3.4 Espectroscopia na região do Infravermelho

As medidas de FTIR foram realizadas no modo transmissão obtendo-se espectros para os filmes *casting* (materiais puros) e automontados. A comparação dos espectros usando essas duas técnicas foi feita com o objetivo de estudar as interações entre os polieletrólitos, registradas nos deslocamentos das bandas características desses materiais com relação ao material puro. Foram realizadas medidas com filmes contendo 5, 10 e 15 bicamadas depositadas em silício. As lâminas de silício utilizadas foram limpas em ultrassom durante dez minutos em uma solução 2% de KOH + 10% de água + etanol e enxaguadas em água Milli-Q. As medidas foram realizadas usando o espectrômetro NICOLET 6700 (resolução 4 cm⁻¹) utilizando fluxo de nitrogênio constante para descontaminação da atmosfera.

3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Espalhamento dinâmico de luz (do inglês, Dinamic Light Scattering) é uma técnica utilizada para medidas de tamanhos de partículas em soluções coloidais. A distribuição do tamanho das partículas foi obtida por medidas de DLS, à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Malvern spectrometer Nano SZ (Malvern Instruments, UK)

3.6 Medidas Eletroquímicas

Para os experimentos eletroquímicos foram empregados a voltametria cíclica, a voltametria de pulso diferencial e a espectroscopia de impedância. O sistema usado para as medidas de eletroquímica consistiu de uma cela eletroquímica com volume de 11 mL e um sistema convencional de 3 eletrodos: o eletrodo de Ag / AgCl como referência, uma placa de platina como contra-eleto-rodo, e vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio (ITO) modificado com os filmes automontados como eletrodo de trabalho. As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando o potenciostato/galvanostato Autolab, com softwares GPES e FRAC para aquisição e tratamento de dados. Na Figura 21 está representado um esquema da célula eletroquímica utilizada.

Figura 21 - Modelo de célula utilizada nos experimentos eletroquímicos.

Quando um eletrodo de trabalho carregado é imerso na solução, este irá alterar a camada de solução imediatamente vizinha da superfície do mesmo. Em uma interface eletrodo/solução eletrolítica, a região fronteiriça é denominada dupla camada elétrica. Na Figura 22 é ilustrada a dupla camada elétrica formada. Para realizar uma medida de potencial do eletrodo de trabalho, há a necessidade de um segundo eletrodo que será tomado como um eletrodo de referência. Portanto, medidas de potencial de um eletrodo são relativas e arbitrárias, uma vez que sempre é

necessário um eletrodo de referência. Atribui-se, arbitrariamente, ao eletrodo padrão de hidrogênio (EPH), o valor zero Volt de potencial de eletrodo (120). No entanto, o uso do EPH como eletrodo de referência é bastante inconveniente na prática cotidiana em laboratório, por isso, comumente, são usados eletrodos de referência secundários, mais fáceis de serem preparados e de trabalhar em experimentos eletroquímicos (121). Entre esses, citam-se os eletrodos de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o de mercúrio ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$), também conhecido como eletrodo de calomelano.

As células eletroquímicas de dois eletrodos apresentam limitações devido à passagem de corrente no eletrodo de referência e às reações químicas que ocorrem no mesmo. Para acabar com essas limitações, foi desenvolvida uma célula com três eletrodos. O terceiro eletrodo foi introduzido para assegurar o sistema potenciostático (120). Este é chamado de contra eletrodo, podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc. Na célula eletroquímica, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional que atuará fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do contra eletrodo diminua. Dessa forma a corrente irá passar entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, evitando problemas no eletrodo de referência. Assim, este irá manter o seu potencial constante durante as medidas.

Figura 22 - Representação esquemática da dupla camada formada na interface eletrodo-solução.

3.6.1 Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia em fenômenos que acontecem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a

essa superfície (122). As informações sobre um analito são obtidas, nessa técnica, pela medição da corrente elétrica de resposta devido a uma tensão aplicada entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. Essa corrente de resposta pode ser governada por processos de transferência de carga, transferência de massa ou reações químicas devido à transferência de elétrons (122).

O transporte de massa é a transferência de espécies do corpo da solução para a interface eletrodo-superfície. Esse transporte de massa pode ocorrer de três formas: migração, convecção e difusão. A migração é o movimento de íons através da solução causada por atração ou repulsão entre espécies em solução e o eletrodo de trabalho. A convecção é a movimentação de espécies causada pela perturbação mecânica do fluxo da solução e a difusão é a movimentação espontânea da espécie química causada por um gradiente de concentração do analito de interesse. Geralmente as medidas de voltametria são realizadas de forma a minimizar os transportes de massa ocasionados por migração e convecção. Assim, o transporte de massa é feito basicamente por difusão. No caso da migração, é adicionado um excesso de eletrólito não reativo (eletrólito suporte) na solução, para impedir a formação de um campo elétrico devido ao gradiente de cargas. O transporte por convecção é minimizado, cessando o distúrbio mecânico (agitação e borbulhamento de gás) da solução antes de realizar os experimentos (123).

As transferências de cargas que ocorrem na interface solução-eletrodo geram corrente elétrica. Esta corrente pode ser ocasionada devido à reação de oxiredução da espécie de estudo no eletrodo (corrente faradaica) e à corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo-solução (corrente capacitiva) (123).

A partir da voltametria cíclica é possível obter informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída de pelo menos dois eletrodos, sendo um deles o eletrodo de trabalho e o outro um eletrodo de referência (124). O potencial é aplicado entre os dois eletrodos variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial (E) e a corrente resultante (I) são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial é chamada de voltamograma. Na Figura 23 é ilustrado a forma do potencial aplicado na voltametria cíclica e um voltamograma típico mostrando as correntes de pico catódico (I_{pc}) e anódico (I_{pa}).

Figura 23 - (a) Forma de aplicação de potencial na voltametria cíclica. (b) Corrente resultante devido em resposta ao potencial aplicado.

3.6.2 Medidas de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Na voltametria de pulso diferencial, o eletrodo de trabalho é submetido a uma série de pulsos periódicos fixos de potencial sobrepostos a uma rampa de potencial crescente (ver Figura 24-a). A corrente é medida imediatamente antes e ao final da aplicação do pulso, resultando uma leitura menos influenciada pela corrente capacitiva (125). A diferença desses valores de corrente é plotada em função do potencial aplicado. Deste modo, esta leitura diferencial da corrente gera um voltamograma de picos de corrente de forma gaussiana (ver Figura 24-b).

Figura 24 - (a) Forma de aplicação de potencial na voltametria de pulso diferencial. (b) Corrente resultante em resposta ao potencial aplicado.

Foram feitas medidas de DPV nos filmes automontados fabricados sobre ITO para testes de detecção de peróxido de hidrogênio e glicose. Fez-se o uso de uma micropipeta para a adição de pequenas quantidades (25 μL) do analito de interesse a uma célula eletroquímica contendo 11 mL de eletrólito suporte (tampão PBS 0,06 molL^{-1} , pH=7,4.). A área do eletrodo de trabalho imersa na solução foi de 5 mm x 15 mm.

3.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) consiste na análise da impedância de uma amostra em uma célula eletroquímica em função da frequência de um sinal AC aplicado. A resposta elétrica foi analisada na faixa de frequência de 0,1 a 10^6 Hz. Foram realizadas medidas de EIE utilizando-se de um potenciostato/galvanostato Autolab, acoplado a um microcomputador com software FRAC para aquisição de dados.

A técnica EIE é um método eficaz para sondar as propriedades interfaciais de eletrodos modificados (122, 126). Em biossensores, o componente biológico é imobilizado no eletrodo de trabalho e sua impedância é analisada como função da concentração do analito desejado em solução ou em função do tempo (127). Na Figura 25 é ilustrado o princípio de impedância eletroquímica para a detecção de antígenos.

Figura 25 – Esquema ilustrando a) o princípio da impedância eletroquímica para detecção de antígenos usando b) o circuito equivalente de Randle para ajustar os espectroscopia de impedância por software comercial de análise de dados Autolab e c) o espectro típico de Nyquist de impedância faradaica na presença de sonda redox. (128). No circuito equivalente, R_{ct} (o diâmetro do semi-círculo no espectro de impedância) representa a resistência transferência eletrônica que controla a cinética de elétrons de transferência da sonda redox na interface do eletrodo.

Capítulo 4 Resultados E Discussão

4.1 Espectroscopia de Absorbância no UV-vis

4.1.1 Síntese das AuNps em PG4

Os dendrímeros possuem cavidades intramoleculares que auxiliam a estabilização de nanopartículas em soluções aquosas, o que possibilitou a aplicação dos mesmos na síntese de nanopartículas de ouro (77, 129). Foram sintetizadas nanopartículas de ouro em solução aquosa usando ácido fórmico, o dendrímero PG4 e ácido cloroáurico (HAuCl_4). O ácido fórmico foi utilizado como agente redutor, reduzindo Au^{3+} para Au^0 . A formação do híbrido PG4AuNp consistiu em adicionar-se volumes iguais de HAuCl_4 1 mmol L^{-1} e de PG4 0.21 mmol L^{-1} e, em seguida, a uma solução de ácido fórmico 10% v/v. Primeiramente misturamos as soluções de PG4 e HAuCl_4 e deixamos agitar essa solução de coloração amarela por 2 minutos e então adicionamos o ácido fórmico e deixamos em agitação por 4 horas. Durante todo o procedimento manteve-se a solução coberta por papel alumínio para proteção contra a incidência de luz, uma vez que as nanopartículas de ouro são fotossensíveis (130). Na Figura 26 são ilustradas as três etapas da síntese das AuNps.

Figura 26 - (i) A mistura de HAuCl_4 e PG4. (ii) Mistura de HAuCl_4 e PG4 após adicionar o agente redutor. (iii) Mistura após 4h sob agitação com o agente redutor. (iv) Ilustração da formação de nanopartículas em um dendrímero.

As nanopartículas sintetizadas foram armazenadas à temperatura ambiente em um frasco opaco para impedir a passagem da luz. Na Figura 27 são mostrados os espectros de UV-Vis das dispersões das nanopartículas de ouro e ácido cloroáurico. Antes da formação do híbrido PG4AuNp observa-se uma banda intensa em torno de 300 nm. Após a redução dos íons de ouro, uma banda bem definida aparece em torno 525 nm, devido à ressonância de plasma (131), demonstrando a formação de nanopartículas de ouro.

Figura 27 - Espectros de UV-Vis das suspensões de nanopartículas de ouro e do sal HAuCl_4 em solução aquosa.

A distribuição dos tamanhos do híbrido PG4AuNps, obtida por medidas de DLS, é mostrada na Figura 28. O diâmetro médio do PG4AuNp é $7,6 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$.

Figura 28 – Histograma obtido a partir de medidas de DLS do híbrido PG4AuNp.

4.1.2 Crescimento dos filmes finos

A Figura 29 mostra o espectro UV-Vis da GOx em solução TFS (pH=6,5). A GOx apresenta dois grupos cromóforos responsáveis pela absorção no espectro visível. A porção FAD incorporada em cada monômero da proteína é responsável pelas bandas de absorção com picos em 380 e 460 nm (132), atribuídas às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ao longo dos três ciclos do anel isoaloxazina (ver *inset* Figura 28). A cadeia de aminoácidos aromáticos laterais é responsável pela absorção em 280 nm (133).

Figura 29 - Espectro de absorbância da solução de GOx em tampão fosfato de sódio na concentração de 1 mg/mL. No *inset* é mostrada a estrutura do cromóforo FAD (134) responsável pelas bandas de absorção com picos em 380 e 460 nm, atribuídas às transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ao longo dos três ciclos do anel isoaloxazina.

O crescimento dos filmes automontados nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx foi acompanhado a partir de medidas de absorção a cada duas bicamadas (de 3 até 17 bicamadas) depositadas sobre um substrato de quartzo. A banda de absorção da GOx em 280 nm foi usada para monitorar o crescimento dos filmes. Foi feito um estudo das melhores condições para o crescimento dos filmes automontados, e neste observamos que a concentração do tampão utilizado para confeccionar os filmes é um fator crucial para a imobilização da GOx. Foram feitos filmes com soluções TFS nas concentrações 0,1, 0,05 e 0,01 molL⁻¹. Nas concentrações 0,1 e 0,05 molL⁻¹ de TFS foi observada forte dessorção de glicose oxidase nos filmes. O

crescimento só foi observado de forma sistemática quando utilizamos o TFS na concentração $0,01 \text{ molL}^{-1}$. O TFS em altas concentrações pode ter blindado as cargas da molécula de GOx impedindo que o filme cresça por adsorção física.

Na Figura 30 são mostrados os espectros de absorção do filme PG4-GOx com o aumento do número de bicamadas. Observa-se que o crescimento dos filmes (absorbância) em função do número de bicamadas é aproximadamente linear até 15 bicamadas. Após o qual é observado desorção de glicose oxidase no filme.

Figura 30 - Monitoramento do crescimento do filme da sequência PG4-GOx a partir de medidas de absorbância. No *inset* é mostrada a absorbância do filme em função do número de bicamadas.

Na Figura 31 são mostrados os espectros de absorção do filme PG4AuNp-GOx com o aumento do número de bicamadas. O aumento da absorbância com o aumento não mostrou –se linear. Na Figura 32 é ilustrada a comparação do crescimento dos filmes PG4-GOx e PG4AuNp-GOx com o aumento do número de bicamadas. Nos filmes da sequência PG4AuNp-GOx, para um mesmo número de bicamadas, a absorbância é sempre maior que nos filmes PG4-GOx, significando que há sempre mais GOx imobilizada no mesmo. O híbrido PG4AuNp tem o tamanho aproximado do diâmetro médio da GOx, enquanto que o PG4 é muito menor, isso justifica a maior adsorção da GOx nos filmes PG4AuNp-GOx.

Figura 31 - Monitoramento do crescimento do filme da sequência PG4AuNp-GOx a partir de medidas de absorvância.

Figura 32 - Crescimento da absorvância em função do número de bicamadas depositadas nos filmes nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx.

4.2 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Na Figura 33 são ilustrados os espectros de FTIR dos filmes *cast* do dendrímero PG4 e do híbrido PG4AuNp sintetizado a partir deste.

Figura 33 – Espectros de FTIR dos filmes *cast* de PG4 puro e do híbrido PG4AuNp.

A partir das medidas de FTIR dos filmes *cast* do dendrímero PG4 puro e do híbrido PG4AuNp (com nanopartículas de ouro) observa-se que, após a hibridização, as bandas do grupo terminal NH_2 do PG4 deslocam-se de 3067 e 3278 cm^{-1} para 3063 e 3270 cm^{-1} , respectivamente. Essa observação indica a existência de interações inter-moleculares entre as nanopartículas de ouro com os grupos amino ($-\text{NH}_2$) da superfície do dendrímero PG4. Os dendrímeros estão adsorvendo as nanopartículas de ouro no seu exterior. Também podemos observar que as bandas do grupo $-\text{NHCO}-$ em 1644 e 1557 cm^{-1} (135), as quais são atribuídas às vibrações de $\text{C}=\text{O}$ e de $\text{N}-\text{H}$, deslocaram-se para 1645 e 1563 cm^{-1} . Esses resultados mostram a existência de interação intra-molecular entre as nanopartículas de ouro e as

ramificações –NHCO– do dendrímero PG4, uma vez que tais grupos amidas ocorrem no interior do dendrímero, sugerindo que as nanopartículas de ouro são adsorvidas em parte no interior da molécula do dendrímero PG4 (136).

Na Figura 34 são ilustrados os espectros de FTIR dos filmes *cast* de GOx e PG4, e do filme *LbL* PG4-GOx contendo 15 bicamadas. Observa-se um alargamento das bandas resultantes da soma das contribuições dos grupos aminos I e II do PG4 e dos grupos amidas I e II da GOx (137, 138). É observado um deslocamento da banda associada aos agrupamentos NH₂ do PG4 de 3067 cm⁻¹ para 3075 cm⁻¹. E o deslocamento da banda da GOx associada aos grupos N-H de 3297 cm⁻¹ para 3294 cm⁻¹. Estes deslocamentos esta associado à interação entre o PG4 e a GOx, interação essa responsável pelo crescimento dos filmes.

Figura 34 – Espectros de FTIR dos filmes *cast* de PG4, GOx, e do filme *LbL* contendo 15 bicamadas na sequência PG4-GOx.

A Figura 35 mostra os espectros de FTIR do filme PG4-GOx com 5, 10 e 15 bicamadas. Podemos observar o aumento na intensidade dos picos de transmitância com o aumento do número de bicamadas depositadas, indicando o crescimento do filme sobre o substrato de silício.

Figura 35 - Espectros de FTIR dos filmes *LbL* na sequência PG4-GOx após 5, 10 e 15 bicamadas.

Na Figura 36 são mostrados os espectros de FTIR dos filmes *cast* de GOx e PG4AuNp e do filme *LbL* contendo 15 bicamadas na sequência PG4AuNp-GOx. No *inset* é ilustrado o alargamento das bandas resultantes da soma das contribuições dos grupos amins I e II do PG4AuNp e dos grupos amidas I e II da GOx (137, 138). É observado um deslocamento da banda associada aos agrupamentos NH_2 do PG4AuNp de 3063 cm^{-1} para 3078 cm^{-1} e o deslocamento da banda dos grupos N-H da GOx de 3297 cm^{-1} para 3317 cm^{-1} , respectivamente. Estes deslocamentos estão associados à interação entre PG4AuNp e a GOx, interação essa responsável pelo crescimento dos filmes.

Figura 36 – Espectros de FTIR dos filmes *cast* de PG4AuNp, GOx e do filme *LbL* contendo 15 bicamadas na sequência PG4AuNp-GOx. No *inset* é mostrado o alargamento da banda resultante da soma das contribuições dos grupos NH_2 do PG4AuNp e dos grupos N-H da GOx.

A Figura 37 ilustra os espectros de FTIR do filme LbL após 5, 10 e 15 bicamadas, respectivamente, podendo ser observados o aumento na intensidade dos picos de transmitância com o aumento do número de bicamadas depositadas, indicando o crescimento do filme. As posições das bandas amida I e amida II no espectro de FTIR das proteínas são sensíveis indicadores de mudanças conformacionais na estrutura secundária da proteína. As duas bandas características da GOx, no filme automontado PG4-GOx, podem ser observadas em torno de 1556 e 1656 cm^{-1} . No filme PG4AuNp-GOx, estas podem ser observadas em 1540 e 1653 cm^{-1} . Porém, uma vez que há uma superposição das contribuições dos grupos amida I e II da GOx e dos grupos amina I e II do dendrímero nos filmes LbL, não é possível inferir sobre a estrutura secundária da GOx nos filmes a partir do espectros de FTIR.

Figura 37 – Espectros de FTIR dos filmes na sequência PG4AuNp-GOx com 5, 10 e 15 bicamadas.

Na Tabela 4 são mostrados as principais bandas de absorção de FTIR referentes aos filmes *cast* de PG4, PG4AuNp e GOx, e aos filmes *LbL* nas sequências PG4-GOx e PG4AuNp-GOx.

Tabela 4 - Atribuição das principais bandas de FTIR referente aos filmes *cast* e automontados de PG4 e GOx.

ATRIBUIÇÃO	PG4 (cm ⁻¹)	PG4AuNp (cm ⁻¹)	GOx (cm ⁻¹)	PG4-GOx (cm ⁻¹)	PG4AuNp-GOx (cm ⁻¹)	Ref.
N-H <i>stretching</i> (<i>amide II</i>)	-	-	1543	1540	1547	(35, 138)
C=O <i>stretching</i> (<i>amide I</i>)	-	-	1656	1653	1658	(35, 138)
C-NH (<i>amine II</i>)	1557	1562	-	1540	1547	(139)
C=O <i>stretching</i> (<i>amine I</i>)	1644	1645	-	1653	1658	(139)
CH <i>groups</i>	2830	2828	2874	2873	2878	(138)
CH <i>asymmetric stretching in CH₂</i>	-	-	2932	2929	2932	(138, 139)
	2940	2941	2954	2955	2960	
N-H <i>stretching</i>	3067	3063	3057	3075	3078	(138, 139)
	3278	3270	3297	3294	3317	(35, 138, 139)

4.3 Caracterização Eletroquímica

4.3.1 Caracterização das Nanopartículas no Filme Automontado

Na Figura 38-(a) são ilustrados voltamogramas do eletrodo de ITO em solução PBS antes e após a adição de 20 μL de solução de PG4AuNp. Na voltametria cíclica da solução com nanopartículas é observado um pico de oxidação em 1,08V, atribuído à formação de óxidos na superfície das nanopartículas de ouro (140, 141). Não é observado um pico de redução do mesmo indicando que o processo é irreversível. É observada uma queda da corrente de oxidação com o aumento do número de ciclos até o décimo terceiro ciclo, após o qual observa-se uma estabilização da corrente. O mesmo comportamento é observado nos filmes finos, conforme mostrado na Figura 39.

Figura 38 – (a) - Voltamogramas cíclicos repetitivos (15 ciclos) do eletrodo ITO em solução TFS após a adição de 20 μL de PG4AuNp e o voltamograma do ITO em PBS antes da adição de nanopartículas. (b) - Voltamograma cíclicos repetitivos (15 ciclos) do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ com 5 bicamadas. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4. Velocidade de varredura 100mV/s. No *inset* são mostrados os voltamogramas a partir do segundo ciclo para melhor visualização.

Na Figura 38-(b) são mostrados voltamogramas cíclicos do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ onde este foi submetido a 15 ciclos com velocidade de varredura 100mV/s em tampão PBS pH=7,4. A janela de potencial foi de 0 a 1,3V, com o intuito de visualizar a oxidação das

nanopartículas de ouro. Os voltamogramas mostraram um decaimento acentuado de corrente com o aumento do número de ciclos, a estabilização da corrente é observada por volta do 13º ciclo. Os filmes, portanto, não se mostram estáveis nessa faixa de potencial. Nos filmes com 3 e 7 bicamadas o mesmo comportamento é observado.

Não foi observada atividade eletroquímica nos sistemas ITO-(PG4-GOx), na Figura 39-(a) é ilustrado o voltamograma cíclico do filme ITO-(PG4-GOx)₇. Com o intuito de estudar as nanopartículas imobilizadas nos filmes finos, realizaram-se voltamogramas cíclicos dos eletrodos ITO-(PG4AuNp-GOx) com 3, 5 e 7 bicamadas, ilustrados na Figura 39-(b). É observado um aumento da corrente de pico de oxidação dos filmes com o aumento do número de bicamadas no filme, indicando que há uma maior quantidade de nanopartículas imobilizadas.

Figura 39 – Voltamograma cíclico do (a) - filme ITO-(PG4-GOx) com 7 bicamadas e (b) dos eletrodos ITO-(PG4AuNp-GOx) com 3, 5, 7 bicamadas e do eletrodo de ITO. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4.

Para o estudo de filmes *LbL* contendo nanopartículas de ouro é preferível trabalhar em janelas de potencial até 800 mV, garantindo assim a integridade do filme, especialmente das nanopartículas de ouro, onde essas são utilizadas como mediadores de elétrons no biossensor.

4.3.2 Cinética e Mecanismos de Transferência de Carga

Para verificar o comportamento eletroquímico frente a uma espécie eletroativa em solução, os eletrodos de ITO-(PG4-GOx) e ITO-(PG4AuNp-GOx) contendo 3, 5 e 7 bicamadas foram submetidos a varreduras na presença de hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) na concentração de 1 mmolL^{-1} entre as velocidades de varredura de 10 a 225 mVs^{-1} , utilizando como eletrólito de suporte, tampão PBS $0,06 \text{ molL}^{-1}$, $\text{pH}=7,4$. Os voltamogramas das Figuras 40 e 41 mostram o perfil voltamétrico característico do par redox $[\text{FeCN}_6]^{3-}/[\text{FeCN}_6]^{4-}$, observa-se um aumento na intensidade das correntes de pico catódicas e anódicas variando linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (*inset* de cada Figura), mostrando que a transferência de íons da solução até a superfície do eletrodo é limitada pelo transporte difusional de massa (142).

Na Figura 40 são mostrados os voltamogramas do eletrodo ITO-(PG4-GOx) com 5 bicamadas em solução 1 mmol/L de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Os filmes com 3 e 7 bicamadas mostraram um o perfil voltamétrico semelhante e por isso não são mostrados na figura.

Figura 40 – Voltamograma cíclicos do eletrodo ITO-(PG4-GOx)₅ em solução 1 mmol/L de $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. No *inset* são mostradas a correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura. Eletrólito suporte: PBS $0,06 \text{ molL}^{-1}$ $\text{pH}=7,4$.

Na Figura 41 são mostrados os voltamogramas do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx) com 3, 5 e 7 bicamadas em solução 1 mmol/L de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Os filmes apresentam um perfil voltamétrico semelhante, porém, é observado um deslocamento dos potenciais de oxidação e redução do par redox $[Fe(CN)_6]^{3-}/[Fe(CN)_6]^{4-}$ ao aumentar o número de bicamadas no eletrodo. Nesse caso observa-se um deslocamento de potencial de oxidação do par redox de cerca de 140 mV para os filmes de 3 e 7 bicamadas, esse deslocamento é atribuído ao aumento do número de bicamadas o que dificulta a difusão das espécies até a superfície do eletrodo, aumentando a resistência de transferência de carga.

Figura 41 – Voltamograma cíclicos do eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx), em solução 1mmol/L de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, com 3-(a), 5-(b) e 7-(c) bicamadas. Nos *insets* são mostradas a correntes de pico anódico e catódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura para cada filme. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4.

4.3.3 Resposta Eletroquímica à oxidação do peróxido de hidrogênio

A detecção de glicose pode ser feita indiretamente a partir da determinação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado na reação da glicose com GOx. A enzima glicose oxidase catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- δ -lactone, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise, H_2O_2 . Ao imobilizar a GOx nos filmes *LbL*, esta entra em contato com a glicose e ocorre uma reação química, na qual é produzido peróxido de hidrogênio, após o qual segue-se uma reação de oxidação do mesmo. A reação que se segue é:

Para a determinação do potencial de oxidação do H_2O_2 nos filmes automontados foram realizadas medidas de voltametria de pulso diferencial (DPV). Os voltamogramas foram obtidos com velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} , por permitir uma boa visualização dos processos eletroquímicos. As curvas de calibração dos sistemas mostraram diferenças significativas na sensibilidade com o aumento do número de bicamadas no eletrodo.

Nos filmes sem nanopartículas, apenas o filme com 3 bicamadas mostrou-se sensível à adição de H_2O_2 na célula eletroquímica. Porém é observado um deslocamento de potencial de oxidação com o aumento da concentração do analito (Figura 42).

Na Figura 42 são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial para o eletrodo ITO-(PG4-GOx)₃ em TFS, pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs^{-1} e amplitude de pulso de 30 mV. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de H_2O_2 . A curva de detecção mostrou-se aproximadamente linear na faixa 0 a 6 mM com sensibilidade $0,018 \mu\text{A}/\text{mmolL}^{-1}$ e limite de detecção de $0,30 \text{ mmolL}^{-1}$.

Nos filmes com nanopartículas, o filme com 7 bicamadas mostra-se sensível a H_2O_2 apenas a partir das concentrações muito altas (3 mmolL^{-1}), porém sem pico de oxidação definido (apenas aumento de corrente). Os filmes com 3 e 5 bicamadas mostram-se sensíveis em faixas de concentrações menores (a partir de $10^{-4} \text{ mmolL}^{-1}$). O filme com 5 bicamadas mostra uma curva de calibração linear na faixa de 0 a 2 mmolL^{-1} . Embora o filme com 3 bicamadas tenha mostrado uma boa sensibilidade, este mostrou-se bastante instável, uma vez que é observado um deslocamento do potencial de detecção do H_2O_2 nos filmes feitos sob as mesmas condições experimentais. O filme com 5 bicamadas apresentou maior estabilidade.

Figura 42 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4-GOx)₃ em eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mV/s e amplitude de pulso de 30 mV.

Na Figura 43 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ em TFS, pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de H₂O₂. A curva de detecção mostrou-se aproximadamente linear na faixa 0 a 2 mmolL⁻¹ com sensibilidade 0,038 μA/mmolL⁻¹ e limite de detecção de 0,87 mmolL⁻¹.

Na Figura 44 são mostrados voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de H₂O₂. A curva de detecção mostrou-se linear na faixa de 0 a 2 mmolL⁻¹ com sensibilidade 0,095 μA/mmolL⁻¹ e limite de detecção de 0,033 mmolL⁻¹.

Figura 43 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ em eletrólito suporte: PBS 0,06 mmolL⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mV/s e amplitude de pulso de 30mV. No inset é mostrada a curva analítica de detecção de H₂O₂.

Figura 44 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ em eletrólito suporte: PBS 0,06M pH=7,4, velocidade de varredura 50 mV/s e amplitude de pulso de 30mV. No inset é mostrada a curva analítica de detecção de H₂O₂.

Nos sistemas ITO-(PG4-GOx) e ITO-(PG4AuNp-GOx) com 3 bicamadas, o uso das nanopartículas melhora o sistema estudado quanto à sensibilidade ao H_2O_2 e quanto aos valores de corrente para uma mesma concentração de H_2O_2 . Porém o limite de detecção é menor para o filme sem nanopartículas, uma vez que o filme com 3 bicamadas com AuNps não mostrou-se estável. Nos sistemas com 5 bicamadas, a detecção de H_2O_2 somente foi possível após a incorporação de nanopartículas, uma vez que estas atuaram como mediadores de elétrons (143, 144).

A fim de confirmar os resultados obtidos por DPV foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) fornece uma visão completa e detalhada das características da interface eletrodo/solução, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até os estudos de processos cinéticos eletroquímicos (145). Esta técnica é amplamente usada em aplicações no campo de biossensores (127, 146, 147).

Diante do uso de EIE para caracterizar diferentes sistemas sensores, optou-se em caracterizar os biossensores com o aumento da concentração de H_2O_2 . Foi observada uma queda da resistência de transferência de carga para os filmes em função do aumento da concentração de H_2O_2 . Essa relação está provavelmente associada ao aumento de espécies H_2O_2 nos poros dos filmes *LbL* (77, 146, 148).

Nos filmes com menores números de bicamadas é observada menor resistência de transferência de carga, o que está relacionado à melhor difusão das espécies através das bicamadas. Além disso, há uma diminuição acentuada da resistência em altas concentrações do analito, uma vez que nesse caso tem-se uma alta quantidade de espécies redox nos poros do próprio filme, isto é, um gradiente de concentração alto fazendo com que a resistência diminua.

Na Figura 45 é mostrado o diagrama de Nyquist para o eletrodo com 3 bicamadas em para diversos valores de concentração de H_2O_2 . Na Figura 46 é mostrado o diagrama de Nyquist para o eletrodo com 5 bicamadas em para diversos valores de concentração de H_2O_2 . Os filmes com 5 bicamadas apresentam maior resistência à transferência de carga uma vez que ao aumentar o número de bicamadas é criada uma maior barreira de difusão das espécies no filme.

Figura 45 – Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ em função da concentração de H₂O₂. Faixa de frequência 0.1 a 10⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7.4. Potencial de 0V.

Figura 46 - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ em função da concentração de H₂O₂. Faixa de frequência 0.1 a 10⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7.4. Potencial de 0.16 V.

4.3.4 Estudo do Biossensor de Glicose

Os eletrodos modificados foram testados para o sensoriamento de glicose por DPV. Os filmes sem nanopartículas não foram sensíveis a glicose. Nos filmes com nanopartículas apenas os filmes com 3 e 5 bicamadas mostraram sensibilidade à adição de glicose na célula eletroquímica. A biofuncionalidade da glicose oxidase nos filmes automontados e a viabilidade do método como biossensor são demonstrados pelo aumento da corrente de pico de oxidação em função das sucessivas adições de glicose à solução.

Na Figura 47 são mostrados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ em PBS, pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de glicose, que se apresenta linear na faixa de 0 a 2 mmolL⁻¹, com sensibilidade 0,049 μ A/mmolL⁻¹ e limite de detecção 0,41 mmolL⁻¹. Observa-se que ao aumentar a concentração de glicose há um deslocamento do potencial de oxidação para maiores valores.

Figura 47 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de glicose.

Na Figura 47 são mostrados voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de glicose. A curva

de detecção mostrou-se linear na faixa 0 a 4,8 mmolL⁻¹ com sensibilidade 0,013 µA/mmolL⁻¹ e limite de detecção 0,44 mmolL⁻¹.

Foram observadas significativas diferenças nas curvas de calibração nos filmes com 3 e 5 bicamadas. A curva de calibração do sensor com 3 bicamadas tem uma menor faixa de detecção de glicose (0-2 mmolL⁻¹) e apresenta deslocamento do potencial de oxidação para maiores valores de concentração de glicose, enquanto o filme com 5 bicamadas apresenta uma maior faixa de detecção (0-4,8 mmolL⁻¹) e não há deslocamento de potencial de oxidação. Isso mostra a viabilidade e versatilidade da técnica LbL na construção de filmes automontados. Uma vez que há a possibilidade de ajustar o número de bicamadas de modo a otimizar o biossensor.

Figura 48 – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅. Eletrólito suporte: PBS 0,06 mmolL⁻¹ pH=7,4, velocidade de varredura 50 mVs⁻¹ e amplitude de pulso de 30 mV. No *inset* é mostrada a curva analítica de detecção de glicose.

Para confirmar os resultados obtidos por DPV foram realizadas medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica nos sistemas ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ e ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ (Figura 49). Foi observada uma queda da resistência de transferência de carga para os filmes em função do aumento da concentração de glicose, que está provavelmente associada ao aumento de espécies H₂O₂ nos poros dos filmes LbL (77, 148). A queda da resistência de transferência de carga é mais acentuada no filme com 3 bicamadas, porém, o filme com 5 bicamadas apresenta uma maior faixa de detecção.

Na Figura 49-(a) é mostrado o diagrama de Nyquist para o eletrodo com 3 bicamadas para diversos valores de concentração de glicose. Na Figura 49-(b) é mostrado o diagrama de Nyquist para o eletrodo com 5 bicamadas em para diversos valores de concentração de glicose.

Figura 49 – (a) - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ em função da concentração de glicose. Potencial 0,15V. (b) - Diagramas de Nyquist obtidos para o eletrodo ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ em função da concentração de glicose. Faixa de frequência 0,1 a 10⁶ Hz. Eletrólito suporte: PBS 0,06 molL⁻¹ pH=7,4. Potencial 0,15 V.

O perfil de resistência para a detecção de peróxido via glicose modificou drasticamente quando comparada ao perfil apresentado nas curvas de detecção direta de peróxido. Isso se deve à baixíssima concentração de espécies redox (H₂O₂), o que reflete no próprio formato do semicírculo no diagrama de Nyquist, isto é, a difusão é tão lenta que não se observa a formação de um semicírculo, apenas o início dele.

Capítulo 5 Conclusões

As principais contribuições desse trabalho foram a possibilidade de imobilizar a enzima GOx em filmes nanoestruturados em dois sistemas distintos com o dendrimero PG4 puro (PG4-GOx) e com o híbrido com nanopartículas (PG4AuNp-GOx) através da técnica de automontagem (*LbL*) e exemplificar a aplicação desses filmes no sensoriamento de glicose.

As análises espectroscópicas forneceram informações sobre o crescimento dos filmes e sobre a organização das multicamadas. A partir das medidas de absorbância observou-se que a adsorção da GOx apresenta um comportamento aproximadamente linear no sistema PG4-GOx, e que nos sistemas contendo o nanopartículas a imobilização da GOx é mais eficiente. As medidas de FTIR mostraram deslocamento das bandas NH_2 do PG4 e do híbrido PG4AuNp nos filmes *LbL*, e das bandas N-H da GOx, em decorrência das interações PG4-GOx e PG4AuNp-GOx responsáveis pelo crescimento dos filmes multicamadas.

As análises dos filmes por eletroquímica mostraram que, em ambos os eletrodos ITO-(PG4-GOx) e ITO-(PG4AuNp-GOx), os mecanismos de transferência de carga são limitados por difusão. Os filmes não se mostraram estáveis em potenciais acima de 800 mV. A atuação como biossensor de glicose foi possível somente nos sistemas com nanopartículas. A viabilidade dos filmes como biossensor foi verificada pelo aumento da corrente de oxidação devido à adição de glicose a partir de medidas de DPV, e confirmadas por espectroscopia de impedância eletroquímica. Foi possível detectar glicose em baixos potenciais de detecção (~ 0,15 V) o que diminui o número de espécies interferentes na medida, pois, em potenciais elevados outras espécies podem sofrer oxidação afetando a acurácia e eficiência do sistema analítico (83)

O biossensor ITO-(PG4AuNp-GOx)₃ mostrou-se linear na faixa de 0 a 2 mmolL⁻¹ com sensibilidade 0,048 $\mu\text{A}/\text{mmolL}^{-1}$ e limite de detecção 0,41 mmolL⁻¹. Porém, observa-se que ao aumentar a concentração de glicose há um deslocamento do potencial de oxidação para maiores valores. O biossensor ITO-(PG4AuNp-GOx)₅ mostrou-se linear na faixa de 0 a 4,8 mmolL⁻¹ de glicose com sensibilidade 0,013 $\mu\text{A}/\text{mmolL}^{-1}$ e limite de detecção 0,44 mmolL⁻¹. O filme com 5 bicamadas não apresentou deslocamento de potencial de oxidação e, portanto, apresenta maior estabilidade.

Capítulo 6 Propostas Para Trabalhos Futuros

Diversos aspectos neste trabalho podem ser melhorados ou aprofundados. Abaixo segue uma lista de sugestões:

- Estudar o crescimento do filme (PG4AuNp-GOx) com diferentes valores de concentrações e pH das nanopartículas, para uma maior preservação da estrutura secundária da GOx nos mesmos, visando potencializar sua atividade enzimática;
- Fazer o estudo das medidas de detecção de glicose e outros analitos de interesse na presença de outras substâncias para determinar a especificidade do biossensor.

REFERÊNCIAS

- 1 FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the botton. *Engineering and Science*, v. XXIII, n. 5, p. 22-36, 1960.
- 2 TANIGUCHI, N. On the basic concept of 'NanoTechnology'. In: Proceedings of the International Conference on Production Engineering.1974. Tokyo. Japan Society of Precision Engineering.2 v.
- 3 HOOD, E. Nanotechnology: looking as we leap. *Environ Health Perspect*, v. 112, n. 13, p. A741-A749, 2004.
- 4 VAN HOVE, M. A. From surface science to nanotechnology. *Catalysis Today*, v. 113, n. 3-4, p. 133-140, 2006.
- 5 HARRIS, D. L.;GRAFFAGNINI, M. J. Nanomaterials in medical devices: a snapshot of markets, technologies, and companies. *Nanotechnology Law & Business*, v. 4, n. 4, p. 415-422, 2007.
- 6 PRAKASH, A.;OUYANG, J.;LIN, J.-L.;YANG, Y. Polymer memory device based on conjugated polymer and gold nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, v. 100, n. 5, p. 1-5, 2006.
- 7 JOHNSTON, D. E.;ISLAM, M. F.;YODH, A. G.;JOHNSON, A. T. Electronic devices based on purified carbon nanotubes grown by high-pressure decomposition of carbon monoxide. v. 4, n. 8, p. 589-592, 2005.
- 8 FILHO, A. G. D. S.;FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, v. 30, n. 7, p. 1695-1703, 2007.
- 9 MACIEL, A. P.;LONGO, E.;LEITE, E. R. Dióxido de estanho nanoestruturado: síntese e crescimento de nanocristais e nanofitas. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 855-862, 2003.
- 10 BAER, D. R.;ENGELHARD, M. H.;GASPAR, D. J., et al. Challenges in applying surface analysis methods to nanoparticles and nanostructured materials. *Journal of Surface Analysis*, v. 12, n. 2, p. 101-108, 2005.
- 11 PATERNO, L. G.;MATTOSO, L. H. C.;JR, O. N. O. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
- 12 OLIVEIRA, O. Langmuir-Blodgett films - Properties and possible applications. *Brazilian Journal of Physics*, v. 22, n. 2, p. 60-69, 1992.

- 13 ARIGA, K.;HILL, J. P.;JI, Q. Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 9, n. 19, p. 2319-2340, 2007.
- 14 TELES, F. R. R.;FONSECA, L. P. Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors. *Materials Science and Engineering: C*, v. 28, n. 8, p. 1530-1543, 2008.
- 15 CARUSO, F.;NIKURA, K.;FURLONG, D. N.;OKAHATA, Y. 2. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. *Langmuir*, v. 13, n. 13, p. 3427-3433, 1997.
- 16 COSNIER, S. Biosensors based on immobilization of biomolecules by electrogenerated polymer films. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 89, n. 2, p. 127-138, 2000.
- 17 TANG, Z.;WANG, Y.;PODSIADLO, P.;KOTOV, N. Â. A. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Advanced Materials*, v. 18, n. 24, p. 3203-3224, 2006.
- 18 AI, H.;JONES, S.;LVOV, Y. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. *Cell Biochemistry and Biophysics*. Humana Press Inc., 39,n. 1,p. 23-43, 2003.
- 19 DAVIS, J.;VAUGHAN, D. H.;CARDOSI, M. F. Elements of biosensor construction. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 12, p. 1030-1035, 1995.
- 20 NELSON, D. L.;COX, M. M. Lehninger princípios de bioquímica. 3ª ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2002.
- 21 WOOLERTON, T. W.;SHEARD, S.;CHAUDHARY, Y. S.;ARMSTRONG, F. A. Enzymes and bio-inspired electrocatalysts in solar fuel devices. *Energy & Environmental Science*, v. 5, n. 6, p. 7470-7490, 2012.
- 22 GEOFFREY M. COOPER;HAUSMAN, R. E. The cell: A molecular approach. 4ª ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000.
- 23 MOTTA, V. T. Bioquímica. EDUCS, 332 p., 1901.
- 24 SIMPSON, B. K.;RUI, X.;KLOMKLAO, S. Enzymes in food processing. Food Biochemistry and Food Processing: Wiley-Blackwell, 2012:181-206.
- 25 <<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl>>. Acesso em 10 jun 2011.

- 26 PACE, C. N.;GRIMSLEY, G. R.;SCHOLTZ, J. M. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 20, p. 13285-13289, 2009.
- 27 WOHLFAHRT, G.;TRIVIC, S.;ZEREMSKI, J.;PERICIN, D.;LESKOVAC, V. The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Springer Netherlands, v. 260, n. 1, p. 69-83, 2004.
- 28 WILSON, R. T., A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.
- 29 CHUN MING WONG;KWUN HEI WONG;CHEN, X. D. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 78, n., p. 927-938, 2008.
- 30 MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. *Current Opinion in Chemical Biology. Bioinorganic chemistry / Biocatalysis and biotransformation*, v. 10, n. 2, p. 177-184, 2006.
- 31 LESKOVAC, V.;TRIVIÄ†, S.;WOHLFAHRT, G.;KANDRAÄ •, J.;PERIÄ • IN, D. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, n. 4, p. 731-750, 2005.
- 32 VIEIRA, N. C. S. *Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros pamam e filmes finos de In2O3:Sn*. 141 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- 33 SUN, J.;SUN, Y.;WANG, Z., et al. Ionic self-assembly of glucose oxidase with polycation bearing Os complex. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 202, n. 1, p. 111-116, 2001.
- 34 XIN HUA XU;BO HAN;FU, Y. S. Preparation of chitosan/glucose oxidase nanolayered films for electrode modification by the technique of layer-by-layer self-assembly. *Journal of Materials Science Letters*, v. 22, n., p. 695– 697, 2003.
- 35 VILLALBA, P.;RAM, M. K.;GOMEZ, H.;KUMAR, A.;BHETHANABOTLA, V.;KUMAR, A. GOX-functionalized nanodiamond films for electrochemical biosensor. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 5, p. 1115-1120, 2011.
- 36 KAUSHIK, A.;KHAN, R.;SOLANKI, P. R., et al. Iron oxide nanoparticles-chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 4, p. 676-683, 2008.
- 37 QIU, J.-D.;WANG, R.;LIANG, R.-P.;XIA, X.-H. Electrochemically deposited nanocomposite film of CS-Fc/Au NPs/GOx for glucose biosensor application. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 9, p. 2920-2925, 2009.

- 38 BLODGETT, K. B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *Journal of the American Chemical Society*, v. 57, n. 1, p. 1007, 1935.
- 39 NETZER, L.;SAGIV, J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, v. 105, n. 3, p. 674-676, 1983.
- 40 DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- 41 DECHER, G.;HONG, J. D.;SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin solid films*, v. 210-211, n. Part 2, p. 831-835, 1992.
- 42 DECHER, G.;SCHLENOFF, J. B. Multilayer thin films. Weinheim: Wiley-VCH, v.42, 524 p., 2003.
- 43 KIM, J. Assemblies of conjugated polymers. Intermolecular and intramolecular effects on the photophysical properties of conjugated polymers. Research Triangle Park, NC, ETATS-UNIS: Pure and applied chemistry, v.74, 14 p., 2002.
- 44 LOWACK, K.;HELM, C. A. Molecular mechanisms controlling the self-assembly process of polyelectrolyte multilayers. *Macromolecules*, v. 31, n. 3, p. 823-833, 1998.
- 45 SCHMITT, J.;GRUENEWALD, T.;DECHER, G.;PERSHAN, P. S.;KJAER, K.;LOESCHE, M. Internal structure of layer-by-layer adsorbed polyelectrolyte films: a neutron and x-ray reflectivity study. *Macromolecules*, v. 26, n. 25, p. 7058-7063, 1993.
- 46 SUN, Y.;WANG, H.;SUN, C. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer covalent attachment of AMWNTs and IO4--oxidized GOx. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 1, p. 22-28, 2008.
- 47 MORAES, M.;RODRIGUES FILHO, U.;OLIVEIRA, O.;FERREIRA, M. Immobilization of uricase in layer-by-layer films used in amperometric biosensors for uric acid. *Journal of Solid State Electrochemistry*. Springer Berlin / Heidelberg, 11,n. 11,p. 1489-1495, 2007.
- 48 XU, J.-J.;ZHAO, W.;LUO, X.-L.;CHEN, H.-Y. A sensitive biosensor for lactate based on layer-by-layer assembling MnO₂ nanoparticles and lactate oxidase on ion-sensitive field-effect transistors. *Chemical Communications*, v., n. 6, p. 792-794, 2005.
- 49 KNOF, G. K.;BASSI, A. S. Smart biosensor technology. CRC Press, 664 p., 2006.
- 50 LIM, T.-C. Nanosensors: theory and applications in industry, healthcare and defense. New York: CRC Press, 334 p., 2010.
- 51 CLARK, L. C.;LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.

- 52 UPDIKE, S. J.;HICKS, G. P. The enzyme electrode. v. 214, n. 5092, p. 986-988, 1967.
- 53 GUILBAULT, G. G.;MONTALVO, J. G. Urea-specific enzyme electrode. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, n. 8, p. 2164-2165, 1969.
- 54 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 n., p. 230-243 2003
- 55 VO-DINH, T.;CULLU, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 336, n. 6-7, p. 540-551, 2000.
- 56 VILLAVERDE, A. Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis. *FEBS letters*, v. 554, n. 1, p. 169-172, 2003.
- 57 ZUCOLOTTI, V.;DAGHASTANLI, K. R. P.;HAYASAKA, C. O.;RIUL, ANTONIO;CIANCAGLINI, P.;OLIVEIRA, O. N. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 5, p. 2163-2167, 2007.
- 58 S. V. DZYADEVYCH;V. N. ARKHYPOVA;A. P. SOLDATKIN;A. V. EL'SKAYA;C. MARTELET;JAFFREZIC-RENAULT, N. Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *IRBM*, v. 29, n. 2-3, p. 171-180, 2008.
- 59 KOZAN, J. V. B. *Microsensor para glicose integrado a catéter*. 99 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- 60 LOWINSOHN, D.;BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. *Química Nova*, v. 29, n., p. 1318-1325, 2006.
- 61 NEWMAN, J. D.;SETFORD, S. J. Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnolog*, v. 32, n., p. 249-268, 2006.
- 62 LEE, T. Over-the-counter Biosensors: past, present, and future. *Sensors*, v. 8, n. 9, p. 5535-5559, 2008.
- 63 CHOI, M. M. F. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta*. Springer Wien, 148,n. 3,p. 107-132, 2004.
- 64 MIKKELSEN, S. R.;RECHNITZ, G. A. Conductometric transducers for enzyme-based biosensors. *Analytical Chemistry*, v. 61, n. 15, p. 1737-1742, 1989.
- 65 FERREIRA, M.;FIORITO, P. A.;OLIVEIRA, O. N.;CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, n. 12, p. 1611-1615, 2004.

- 66 AKYILMAZ, E.;DINÇKAYA, E. A new enzyme electrode based on ascorbate oxidase immobilized in gelatin for specific determination of l-ascorbic acid. *Talanta*, v. 50, n. 1, p. 87-93, 1999.
- 67 FERNANDES, E. G. R. *Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose*. 175 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2005.
- 68 MARTINS, M. *Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/ftalocianina*. 162 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Física e Química, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- 69 MARQUES, P. R. B. D. O.;YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- 70 TIWARI, A.;ARYAL, S.;PILLA, S.;GONG, S. An amperometric urea biosensor based on covalently immobilized urease on an electrode made of hyperbranched polyester functionalized gold nanoparticles. *Talanta*, v. 78, n. 4-5, p. 1401-1407, 2009.
- 71 CARDOSO, C. L.;MORAES, M. C. D.;CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 32, n., p. 175-187, 2009.
- 72 GROSS, J. L.;SILVEIRO, S. P.;CAMARGO, J. Z. L.;REICHELT, A. J.;AZEVEDO, M. J. D. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 46, n., p. 16-26, 2002.
- 73 WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanalysis*, v. 13, n. 12, p. 983-988, 2001.
- 74 <<http://www.opx.com.br/produto/accucheck-performa->>. Acesso em 08 jun 2011.
- 75 <<http://www.cardiomed.com.br/tiras-accu-chek-performa-cx-c-50un-roche.html>>. Acesso em 05 jun 2011.
- 76 <<http://farmaciacentraldefornos.pai.pt/>>. Acesso em 08 jun 2011.
- 77 CRESPILO, F. N.;GHICA, M. E.;GOUVEIA-CARIDADE, C.;OLIVEIRA JR., O. N.;BRETT, C. M. A. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. *Talanta*, v. 76, n. 4, p. 922-928, 2008.
- 78 YIN, B.;YUAN, R.;CHAI, Y., et al. Amperometric glucose biosensors based on layer-by-layer assembly of chitosan and glucose oxidase on the Prussian blue-modified gold electrode. *Biotechnology Letters*. Springer Netherlands, 30,n. 2,p. 317-322, 2008.

- 79 LEE, D.;LEE, J.;KIM, J., et al. Simple fabrication of a highly sensitive and fast glucose biosensor using enzymes immobilized in mesocellular carbon foam. *Advanced Materials*, v. 17, n. 23, p. 2828-2833, 2005.
- 80 HORNG, Y.-Y.;HSU, Y.-K.;GANGULY, A.;CHEN, C.-C.;CHEN, L.-C.;CHEN, K.-H. Direct-growth of polyaniline nanowires for enzyme-immobilization and glucose detection. *Electrochemistry Communications*, v. 11, n. 4, p. 850-853, 2009.
- 81 CRESPILO, F. N.;GHICA, M. E.;ZUCOLOTTI, V.;NART, F. C.;JR., O. N. O.;BRETT, C. M. A. Electroactive nanostructured membranes (ENM): synthesis and electrochemical properties of redox mediator-modified gold nanoparticles using a dendrimer layer-by-layer approach. *Electroanalysis*, v. 19, n. 7-8, p. 805-812, 2007.
- 82 WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2007.
- 83 TOGHILL, K. E.;COMPTON, R. G. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 5, n. 9, p. 1246-1301, 2010.
- 84 RASHID, M. H.;BHATTACHARJEE, R. R.;KOTAL, A.;MANDAL, T. K. Synthesis of spongy gold nanocrystals with pronounced catalytic activities. *Langmuir*, v. 22, n. 17, p. 7141-7143, 2006.
- 85 RAO, C. N. R.;KULKARNI, G. U.;GOVINDARAJ, A.;SATISHKUMAR, B. C.;THOMAS, P. J. Metal nanoparticles, nanowires, and carbon nanotubes. Pure and applied chemistry. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 21-33, 2010.
- 86 KHAN, R.;KAUSHIK, A.;SOLANKI, P. R.;ANSARI, A. A.;PANDEY, M. K.;MALHOTRA, B. D. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, v. 616, n. 2, p. 207-213, 2008.
- 87 WANG, S. G.;WANG, R.;SELLIN, P. J.;ZHANG, Q. DNA biosensors based on self-assembled carbon nanotubes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 325, n. 4, p. 1433-1437, 2004.
- 88 CARRARA, S.;SHUMYANTSEVA, V. V.;ARCHAKOV, A. I.;SAMORÌ, B. Screen-printed electrodes based on carbon nanotubes and cytochrome P450sc for highly sensitive cholesterol biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 1, p. 148-150, 2008.
- 89 BASAVARAJ K. NANJWADEA;HIREN M. BECHRAA;GANESH K. DERKARA;F.V. MANVIA;VEERENDRA K. NANJWADEB. Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n., p. 185–196, 2009.
- 90 DONGLU SHI;GU, H. Nanostructured materials for biomedical applications. *Journal of Nanomaterials*, v., n., p., 2008.

- 91 ZHAO, Z.;LEI, W.;ZHANG, X.;WANG, B.;JIANG, H. ZnO-Based amperometric enzyme biosensors. *Sensors*, v. 10, n. 2, p. 1216-1231, 2010.
- 92 WORDEN, J. G.;DAI, Q.;HUO, Q. A nanoparticle-dendrimer conjugate prepared from a one-step chemical coupling of monofunctional nanoparticles with a dendrimer. *Chemical Communications*, v., n. 14, p. 1536-1538, 2006.
- 93 BLACKMAN, J. A.;BINNS, C. Handbook of metal physics. Volume 5 ed. Elsevier, v.5, 385 p., 2008.
- 94 DANIEL, M.-C.;ASTRUC, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 104, n., p. 293-346, 2004.
- 95 SPERLING, R. A.;RIVERA GIL, P.;ZHANG, F.;ZANELLA, M.;PARAK, W. J. Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, v. 37, n. 9, p. 1896-1908, 2008.
- 96 LIU;GUYOT-SIONNEST, P. Synthesis and optical characterization of Au/Ag Core/Shell nanorods. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 19, p. 5882-5888, 2004.
- 97 MOORES, A.;GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. *New Journal of Chemistry*, v. 30, n. 8, p. 1121-1132, 2006.
- 98 LINK, S.;EL-SAYED, M. A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 331-366, 2003.
- 99 LINK, S.;EL-SAYED, M. A. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *International Reviews in Physical Chemistry*, v. 19, n. 3, p. 409-453, 2000.
- 100 KELLY, K. L.;CORONADO, E.;ZHAO, L. L.;SCHATZ, G. C. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 107, n. 3, p. 668-677, 2002.
- 101 SANT'ANA, A. C.;CORIO, P.;TEMPERINI, M. L. A. O efeito SERS na análise de traços: o papel das superfícies nanoestruturadas. *Química Nova*, v. 29, n., p. 805-810, 2006.
- 102 TAGVIASHVILI, M. $\epsilon \rightarrow 0$ limits in the Mie-scattering theory. *Physical Review A*, v. 81, n. 4, p. 045802, 2010.
- 103 EVANOFF, D. D.;CHUMANOV, G. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 2. Measurement of extinction, scattering, and absorption cross sections. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 108, n. 37, p. 13957-13962, 2004.

104 HUANG, W.;CHEN, S.;LIU, Y.;FU, H.;WU, G. The controlled synthesis of stable gold nanoparticles in quaternary ammonium ionic liquids by simple heating. *Nanotechnology*, v. 22, n., p. 25602-25608, 2011.

105 MEHTA, S. K.;CHAUDHARY, S. Surfactants: a promising building block in nanoparticle synthesis. SciTopics 01 jun 2011. Disponível em <http://www.scitopics.com/Surfactants_A_Promising_Building_Block_in_Nanoparticle_Synthesis.html>.

106 BOYER, C.;WHITTAKER, M. R.;BULMUS, V.;LIU, J.;DAVIS, T. P. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. *NPG Asia Materials*, v., n., p. 23-30, 2010.

107 LOWE, A. B.;SUMERLIN, B. S.;DONOVAN, M. S.;MCCORMICK, C. L. Facile preparation of transition metal nanoparticles stabilized by well-defined (Co)polymers synthesized via aqueous reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 39, p. 11562-11563, 2002.

108 LIANG, X.;WANG, Z.-J.;LIU, C.-J. Size-controlled synthesis of colloidal gold nanoparticles at room temperature under the influence of glow discharge. *Nanoscale Res Lett*, v. 5, n. 1, p. 124-129, 2010.

109 EL-ANSARY, A.;FADDAH, L. M. Nanoparticles as biochemical sensors. *Nanotechnology, Science and Applications*, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2010.

110 FROEHLING, P. E. Dendrimers and dyes - a review. *Dyes and Pigments*, v. 48, n. 3, p. 187-195, 2001.

111 TOMALIA, D. A.;NAYLOR, A. M.;GODDARD III, W. A. Starburst dendrimers: Molecular-level control of size, shape, surface chemistry, topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie*, v. 29, n., p. 138-175, 1990.

112 DI BEI;JIANING MENG;YOUAN, B.-B. C. Nanomedicine. *Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises*, v. 5, n. 9, p. 1385-1399, 2010.

113 TOMALIA, D. A.;BAKER, H.;DEWALD, J., et al. Dendritic macromolecules: synthesis of starburst dendrimers. *Macromolecules*, v. 19, n. 9, p. 2466-2468, 1986.

114 HAWKER, C. J.;FRECHET, J. M. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, v. 112, n. 21, p. 7638-7647, 1990.

115 JAGDALE, S. C.;GAWALI, V. U.;CHEDE, S. M.;KUCHEKAR, B. S.;CHABUKSWAR, A. R.;LOKHANDE, P. D. Dendrimers. *Journal of Natura Conscientia*, v. 1, n. 2, p. 193-201, 2010.

116 BARBARA KLAJNERT;BRYSEWSKA, M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimic Polonica*, v. 48, n. 1, p. 199–208, 2001.

117 HOLISTER, P.;VAS, C. R.;HARPER, T. Dendrimers. Cientifica. Technology white papers.,n. 6,p. 1-15, 2003.

118 <<http://www.dendritech.com/pamam.html>>. Acesso em 15 março 2012.

119 CHEN, Q.;AI, S.;FAN, H., et al. The immobilization of cytochrome c; on MWNT-PAMAM-Chit nanocomposite incorporated with DNA biocomposite film modified glassy carbon electrode for the determination of nitrite. *Journal of Solid State Electrochemistry*, v. 14, n. 9, p. 1681-1688, 2010.

120 MARCONATO, J. C.;BIDÓIA, E. D. Potencial de eletrodo: uma medida arbitrária e relativa. *Química Nova Na Escola*, v. 17, n. 46-49, p., 2003.

121 BASTOS, A. C. L. M.;RODRIGUES, E. M. S.;SOUZA, J. P. I. D. Físico-Química. Belém: Editora Universitária UFPA, 302 p., 2011.

122 BARD, A. J.;FAULKNER, L. R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 856 p., 2001.

123 PACHECO, W. F. *Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina*. 111 p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica Do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

124 MABBOTT, G. A. An introduction to cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education*, v. 60, n. 9, p. 697-null, 1983.

125 PROTTI, P. Introduction to modern voltammetric and polarographic analisys techniques. IV ed. AMEL Electrochemistry, I,n., 2001.

126 DING, S.-J.;CHANG, B.-W.;WU, C.-C.;LAI, M.-F.;CHANG, H.-C. Electrochemical evaluation of avidin-biotin interaction on self-assembled gold electrodes. *Electrochimica Acta*, v. 50, n. 18, p. 3660-3666, 2005.

127 LISDAT, F.;SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.

128 LIEN T. T. N.;VIET N. X. ;CHIKAE M. ;UKITA Y.;Y., T. Development of Label-Free Impedimetric Hcg-Immunosensor Using Screen-Printed Electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 2, n. 3, p. 2-6, 2011.

- 129 CROOKS, R. M.;ZHAO, M.;SUN, L.;CHECHIK, V.;YEUNG, L. K. Dendrimer-Encapsulated Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications to Catalysis. *Accounts of Chemical Research*, v. 34, n. 3, p. 181-190, 2000.
- 130 ZHANG, Y.;GU, C.;SCHWARTZBERG, A. M.;CHEN, S.;ZHANG, J. Z. Optical trapping and light-induced agglomeration of gold nanoparticle aggregates. *Physical Review B*, v. 73, n. 16, p. 165405, 2006.
- 131 AMENDOLA, V.;MENEGHETTI, M. Size evaluation of gold nanoparticles by UV-vis spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 11, p. 4277-4285, 2009.
- 132 ZAKHARTSEV, M.;MOMEU, C. Purification of glucose oxidase from complex fermentation medium using tandem chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 858, n. 1-2, p. 151-158, 2007.
- 133 ZOLDÁK, G.;ZUBRIK, A.;MUSATOV, A.;STUPÁK, M.;SEDLÁK, E. Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 46, p. 47601-47609, 2004.
- 134 RINUY, J.;BREVET, P. F.;GIRAULT, H. H. Second harmonic generation of glucose oxidase at the air/water interface. *Biophysical Journal*, v. 77, n. 6, p. 3350-3355, 1999.
- 135 KOLHE, P.;MISRA, E.;KANNAN, R. M.;KANNAN, S.;LIEH-LAI, M. Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 259, n. 1-2, p. 143-160, 2003.
- 136 CRESPILO, F. N.;ZUCOLOTO, V.;BRETT, C. M. A.;OLIVEIRA, O. N.;NART, F. C. Enhanced charge transport and incorporation of redox mediators in layer-by-layer films containing PAMAM-encapsulated gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, n. 35, p. 17478-17483, 2006.
- 137 NIE, K.;HU, J.;PANG, W.;ZHU, Q. Poly(amidoamine)-G5 dendrimers/noble metal gold hybrid nanoparticles prepared by [gamma]-ray irradiation. *Materials Letters*, v. 61, n. 17, p. 3567-3570, 2007.
- 138 PORTACCIO, M.;DELLA VENTURA, B.;MITA, D., et al. FT-IR microscopy characterization of sol-gel layers prior and after glucose oxidase immobilization for biosensing applications. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. Springer Netherlands, 57,n. 2,p. 204-211, 2011.
- 139 MARKATOU, E.;GIONIS, V.;CHRYSSIKOS, G. D.;HATZIANTONIOU, S.;GEORGOPOULOS, A.;DEMETZOS, C. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and pamam dendrimer carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 339, n. 1-2, p. 231-236, 2007.

140 JUNGDON SUK;JOOHAN LEE;KWAK, J. Electrochemistry on alternate structures of gold nanoparticles and ferrocene-tethered polyamidoamine dendrimers. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 25, n. 11, p. 1681 - 1686, 2004.

141 SAMEH H. OTHMAN;MOHAMED S. EL-DEAB;OHSAKA, T. Superior electrocatalytic activity of Au (110)-like gold nanoparticles towards the oxygen evolution reaction. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 6, n. 1, p. 6209 - 6219, 2011.

142 ATEŞ, M.;YILMAZ, K.;SHAHRYARI, A.;OMANOVIC, S.;SARAC, A. S. A study of the electrochemical behavior of poly [n-vinyl carbazole] formed on carbon-fiber microelectrodes and its response to dopamine. *Sensors Journal, IEEE*, v. 8, n. 10, p. 1628-1639, 2008.

143 ARYA, S. K.;DEY, A.;BHANSALI, S. Polyaniline protected gold nanoparticles based mediator and label free electrochemical cortisol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 28, n. 1, p. 166-173, 2011.

144 ZHANG, F.-F.;WAN, Q.;WANG, X.-L., et al. Amperometric sensor based on ferrocene-doped silica nanoparticles as an electron transfer mediator for the determination of glucose in rat brain coupled to in vivo microdialysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 571, n. 2, p. 133-138, 2004.

145 CARVALHO, L. A. D.;ANDRADE, A. R. D.;BUENO, P. R. Espectroscopia de impedância eletroquímica aplicada ao estudo das reações heterogêneas em anodos dimensionalmente estáveis. *Química Nova*, v. 29, n., p. 796-804, 2006.

146 KATZ, E.;WILLNER, I. Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: routes to impedimetric immunosensors, DNA-sensors, and enzyme biosensors. *Electroanalysis*, v. 15, n. 11, p. 913-947, 2003.

147 DANIELS, J. S.;POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. *Electroanalysis*, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.

148 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, n. 2, p. 201-208, 2006.