UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

JULIANA COATRINI SOARES

**Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da
imobilização da urease em filmes de polipirrol**

SÃO CARLOS
2011

JULIANA COATRINI SOARES

Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação dos Materiais.

Orientador: Prof^ª. Dra. Débora Gonçalves

SÃO CARLOS

2011

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 preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Soares, Juliana Coatrini
S676b Biossensores eletroquímicos fabricados a partir
da imobilização da urease em filmes de polipirrol / Juliana Coatrini Soares ; orientadora
Débora Gonçalves. — São Carlos, 2011.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e
Engenharia de Materiais e Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização
e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de
Paulo, 2011.

1. Biossensor. 2. Eletroquímica. 3. Polipirrol. 4. Urease. I. Título.

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho
aos meus pais, Luis Carlos Soares e Neuza Coatrini,
pelo apoio, carinho e amor recebidos diariamente e
à memória de meu querido avô Euclydes Quatrini
Amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela oportunidade e possibilidade de realização deste trabalho.

À minha orientadora, prof^ª. Débora Gonçalves, pelos ensinamentos, confiança e paciência ao longo desse período.

Aos meus pais, inspiração de minha vida, Luís Carlos e Neuza, meu irmão Andrey Coatrini, pelo carinho, amor, paciência e conforto nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos do grupo de polímeros do IFSC e em especial aos amigos da sala 18: Vananélia Pereira, Adriana Pavinato, Alexandre, Washington, Yurika, pela amizade e pelos momentos de risos e descontração.

Aos meus amigos Edgar Sanches e Karla Pereira, pela amizade verdadeira. Vocês são meus anjos da guarda !!!

Aos meus amigos Analine Crespo, André Brisolari e Valquíria da Cruz Rodrigues pelo apoio, parceria, companheirismo e principalmente pela amizade, sem esses fatores esse trabalho não teria sido possível.

À Rosangela, Débora T. Balogh, Bertho, Níbio, Ademir e Felipe pelo apoio técnico.

Às bibliotecárias pela atenção e competência demonstrada durante este período.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

SOARES, J.C. 2010. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

A urease (*Canavalia ensiformis* DC.) foi fisicamente imobilizada em matrizes de polipirrol (PPI) com o objetivo de se detectar uréia em amostras padrão. A eletropolimerização do pirrol foi realizada por voltametria cíclica em uma faixa de potencial de -1,0 a 1,0 V vs. ECS em um meio aquoso contendo 0,2 mol L⁻¹ de LiClO₄ e 0,1 mol L⁻¹ de pirrol. Este procedimento permitiu também a imobilização da enzima na matriz polimérica em suas formas, urease purificada (comercial) e como extrato bruto obtido a partir do feijão de porco (*Jack Bean*), após a adição de 300 µg mL⁻¹ de urease purificada ou 100 µL de extrato bruto de feijão de porco. A urease purificada possui 34.375 U g⁻¹ de sólido e o extrato bruto, 13.000 UA/ mL⁻¹, valores obtidos por titrimetria. A presença da enzima imobilizada nos filmes de PPI foi verificada por voltametria cíclica, FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM) e por uma microbalança de cristal de quartzo (MCQE). A atividade da enzima após a imobilização nos filmes de PPI foi confirmada pela presença de íons amônio em solução, que são formados como produtos da reação de hidrólise da uréia catalisada pela enzima. Como o transdutor influencia a eficiência e a sensibilidade do biossensor, dois métodos de transdução foram estudados: cronoamperometria, aplicando-se um potencial de -0,28 V durante 120 s em tampão fosfato pH 7,0 e a cronopotenciometria, aplicando-se uma corrente de 1,0 mA durante 120 s em tampão fosfato pH 7,0 variando-se a concentração de uréia. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do biossensores para a detecção de uréia por meio de transdutores potenciométricos e amperométricos e depois comparar as eficiências dos filmes de PPI/urease purificada e PPI /extrato bruto como biossensores.

Palavras chaves: Biossensor, eletroquímica, polipirrol , urease.

ABSTRACT

SOARES, J.C. 2010. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol** . Tese (Doutorado) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Urease (*Canavalia ensiformis* DC.) was physically immobilized on polypyrrole (PPy) films aiming at detecting urea in standard samples. The electropolymerization of pyrrole was performed by cyclic voltammetry at a potential range from -1.0 to 1.0 V vs SCE in an aqueous medium containing LiClO_4 0.2 mol L⁻¹ and 0.1 mol L⁻¹ pyrrole. This procedure also allowed us to immobilize the enzyme into the PPy matrix in forms, commercially purified and crude extract of urease obtained from *Jack Bean* (*Canavalia ensiformis*) after adding into the electropolymerization media 300 µg mL⁻¹ of purified urease or 100 µL of crude extract. The urease solutions had units of active enzyme of 34.375 U g⁻¹ (purified) and 13.000 UA/ mL⁻¹ (crude extract), and the crude extract was obtained from Jack beans by titrimetric methods. The presence of urease immobilized into the PPy film was verified by cyclic voltammetry, FTIR, scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), and by electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) The activity of the enzyme after immobilizing into the PPy films was confirmed by the presence of ammonium ions in solution, since they are formed as catalytic products by urea hydrolysis reaction catalyzed enzyme. The transducer element influences the efficiency and sensitivity of the biosensor, and two transducer methods were studied: chronoamperometry, by applying a potential of -0.28 V during 120 s in buffer phosphate at pH 7.0 and chronopotentiometry, by applying a current of 1.0 mA during 120 s in buffer phosphate at pH 7.0 both after varying the urea concentration. Our main purpose was to evaluate the efficiency of the biosensors for detecting urea by means of potentiometric and amperometric transducers and then compare the efficiencies of PPy/purified urease e PPy/crude extract as biosensors.

Keywords: Biosensor, electrochemistry, polypyrrole, urease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama que representa o princípio de funcionamento de um biossensor.	25
Figura 2 - Formação da ligação (a) σ a partir da sobreposição dos orbitais sp^2 e (b) π em um plano	31
Figura 3 - Processo de oxidação do polipirrol.	33
Figura 4 - Molécula da urease ⁴⁶	36
Figura 5 - Mecanismo de catálise da uréia pela urease.	37
Figura 6 - Diferentes tipos de imobilização enzimática.	39
Figura 7 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática.	43
Figura 8 - Gráfico duplo-recíproco de Lineaweaver-Burk.	44
Figura 9 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.	50
Figura 10 - Perturbação imposta a um sistema pela técnica de voltametria cíclica e o voltamograma obtido.	51
Figura 11 - Vibrações moleculares impostas pelo infravermelho.	53
Figura 12 - Desenho esquemático da coluna de MEV.	54
Figura 13 - Digrama que representa o princípio de funcionamento do AFM ⁹²	55
Figura 14 - Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes modos de trabalho do microscópio de força atômica ⁸⁹	56
Figura 15 - Esquema do arranjo experimental da MCQE ⁹⁵	57
Figura 16 - Efeito da concentração de uréia como substrato sobre a velocidade enzimática...68	
Figura 17 - Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs. o inverso da concentração de uréia para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis – Menten.	68
Figura 18 - Efeito da concentração de uréia como substrato sobre a velocidade enzimática...69	
Figura 19 - Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs. o inverso da concentração de uréia para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis – Menten.	70
Figura 20 - Efeito da concentração da urease, de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4	71
Figura 21 - Efeito do volume de extrato bruto de 0 a 200 μL sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) , no filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4	72
Figura 22 - Efeito do pH sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7), no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de urease e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4	73
Figura 23 - Efeito do pH sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7), o filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 100 μL de extrato bruto e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4	74
Figura 24 - Efeito da temperatura sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7), no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de urease e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4	75

Figura 25 - Efeito da temperatura sobre a resposta amperométrica, para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7), no filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L ⁻¹ de pirrol, 100 µL de extrato bruto e 0,2 mol L ⁻¹ de LiClO ₄	76
Figura 26 - Voltametrias cíclicas dos eletrodos de Pt durante: (A) síntese dos filmes de PPI (a), PPI/urease (b) e PPI/extrato bruto (c), em uma solução aquosa contendo 0,1 mol L ⁻¹ pirrol e 0,2 mol L ⁻¹ de LiClO ₄ ; (B) resposta eletroquímica dos filmes de PPI (—), PPI/urease (___) e PPI/extrato bruto (___) em uma solução aquosa contendo tampão fosfato a pH 7.	78
Figura 27 - Gráfico de densidade de corrente com o número de ciclos durante a síntese dos filmes de (a) PPI e (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto.	79
Figura 28 - Respostas eletroquímicas dos filmes de PPI/urease (A) e PPI/extrato bruto (C) em uma solução aquosa contendo tampão fosfato a pH 7 e solução de uréia em diferentes concentrações; curvas analíticas de densidade de corrente vs. concentração de uréia para os filmes de PPI/urease (B) e PPI/extrato bruto (D).	81
Figura 29 - Espectros de FTIR para os filmes de (A) PPI, (B) PPI/urease e (C) PPI/extrato bruto sintetizados sobre Pt.	83
Figura 30 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de (A) PPI com um aumento de 10.000x, (B) e (C), PPI/urease e (D) e (E), PPI/extrato bruto com aumento de 5000x e (c) 10.000x, respectivamente.	86
Figura 31 - Imagens de microscopia de força atômica dos filmes sintetizados com 3 ciclos de : (A) PPI; (B) PPI/extrato bruto, (C) PPI/urease e dos filmes sintetizados com 10 ciclos: (D) PPI, (E) PPI/ extrato bruto (F) PPI/urease.	87
Figura 32 - Curvas eletrogravimétricas na forma de (a) frequência vs. potencial e (b) Δm vs. potencial, durante o processo de formação do filme de PPI sobre eletrodos de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L ⁻¹ de LiClO ₄ , 0,03 mol L ⁻¹ de pirrol, v = 20 mV s ⁻¹	91
Figura 33 - Curvas eletrogravimétricas na forma de: (A) frequência vs. potencial e (B) Δm vs. potencial, durante o processo de formação do filme de PPI/urease sobre eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L ⁻¹ de LiClO ₄ , 0,03 mol L ⁻¹ de pirrol e 200µg/mL de urease e v = 20 mV s ⁻¹	93
Figura 34 - Curvas eletrogravimétricas na forma de: (a) frequência vs potencial e (b) Δm vs potencial, durante o processo de formação do filme de PPI/extrato bruto sobre eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de 0,1 mol L ⁻¹ de LiClO ₄ , 0,03 mol L ⁻¹ de pirrol e 30 µL de extrato bruto de urease e v = 20 mV s ⁻¹	94
Figura 35 - Curvas de Δm vs número de ciclos para os filmes de (a) PPI, (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto, sintetizados sobre o eletrodo de Au em cristal de quartzo.	95
Figura 36 - Curvas analíticas obtidas a partir das respostas amperométricas durante a detecção de uréia a diferentes concentrações no eletrodo de: (a) PPI, (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia	96
Figura 37 - Curva analítica obtidas a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia no eletrodo de (A) PPI/urease e (B) PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia	97
Figura 38 - Curva analítica obtida a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008 mol L ⁻¹) no eletrodo de PPI/urease em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.	99
Figura 39 - Curva analítica obtida a partir das respostas potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0,0 a 0,006 mol L ⁻¹) no eletrodo de PPI/urease em uma solução tampão fosfato a pH 7.	100
Figura 40 - Curvas analíticas obtidas a partir das respostas (A) amperométrica e (B) potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia nos eletrodos de	

PPI/urease em uma solução tampão fosfato a pH 7.....	102
Figura 41 - Curva analítica obtida a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008 mol L ⁻¹) no eletrodo de PPI/extrato bruto, em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.....	104
Figura 42 - Curva analítica obtida a partir das respostas potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008mol L ⁻¹). no eletrodo de PPI/extrato bruto, em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.....	105
Figura 43 - Curvas analíticas obtidas a partir das respostas: (A) amperométrica e (B) potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia nos eletrodos de PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.....	106
Figura 44 – Perfil da estabilidade dos biossensores potenciométricos de: (a)PPI/urease e (b) PPI/extrato bruto em função do número de determinações obtidas em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia (50mmol L ⁻¹).	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais tecidos utilizados para extração de enzimas	38
Tabela 2 Métodos convencionais de imobilização ²⁸	41
Tabela 3 - Atribuições das frequências de FTIR para o filme de PPI.	84
Tabela 4 - Atribuições das frequências de FTIR para os filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto.....	84
Tabela 5 - Valores da rugosidade Rms (nm) para os filmes de PPI e PPI/urease.	89
Tabela 6 - Valores da rugosidade Rms (nm) para os filmes de PPI e PPI/extrato bruto.....	89
Tabela 7 - Valores de LQ e LD para os diferentes métodos de detecção e em diferentes números de ciclos para o filme de PPI/urease.	103
Tabela 8 - Valores de LQ e LD para os diferentes métodos de detecção e em diferentes números de ciclos para o filme de PPI/extrato bruto.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ECS: Eletrodo de calomelano saturado

PPI: Polipirrol

K_m: Constante de Michaelis-Menten

V_{max}: Velocidade Máxima

(S): Substrato

(P): Produto

FTIR: Infravermelho por Transformada de Fourier

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

AFM: Microscopia de Força Atômica

MCQE : Microbalança de Cristal de Quartzo Eletroquímica

C_f: fator de sensibilidade do cristal

Δm: variação de massa

ET: Eletrodo de trabalho

ER: Eletrodo de referência

CE: Contra eletrodo

Pt: Platina

rpm: Rotação por minuto

t: Tempo

VC: Voltametria cíclica

Rms: Rugosidade

Sumário

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	23
1. Motivação e objetivos.....	23
1.1 Definições e propriedades dos biossensores	24
1.2 Métodos de transdução	25
1.2.1 Biossensores amperométricos	27
1.2.2 Biossensores potenciométricos	28
CAPÍTULO 2 POLÍMEROS CONDUTORES COMO SUPORTES EM BIOSSENSORES	31
CAPÍTULO 3 ENZIMAS EMPREGADAS COMO ELEMENTO DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO	35
3.1 Feijão de porco (Jack Bean) como fonte de urease (extrato bruto).....	37
3.2 Métodos de imobilização enzimática	38
3.3 Cinética enzimática	41
3.4 Biossensores para detecção de uréia	45
CAPÍTULO 4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS ENZIMÁTICOS	49
4.1 Técnicas eletroquímicas	50
4.1.1 Voltametria cíclica	50
4.1.2 Eletrodos de referência.....	51
4.2 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR	52
4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	53
4.4 Microscopia de força atômica - AFM	55
4.4.1 Modo de operação (AFM).....	56
4.5 Microbalança de Cristal de Quartzo – MCQE	57
CAPÍTULO 5 EXPERIMENTAL.....	61
5.1 Reagentes	61
5.2 Procedimento experimental.....	62
5.2.1 Eletropolimerização e detecção.....	62
5.2.2 Extração da urease - feijão de porco	62
5.2.3 Determinação da atividade e dos parâmetros cinéticos da urease e do extrato bruto ..	63
5.2.4 Caracterização por FTIR	64
5.2.5 Caracterização por Microscopia eletrônica de varredura - MEV	64
5.2.6 Caracterização por Microscopia de Força Atômica – AFM	64
5.2.7 Caracterização por Microbalança de Cristal de Quartzo Eletroquímica - MCQE	65
CAPÍTULO 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.1 Parâmetros cinéticos.....	67

6.1.1 Urease (enzima livre).....	67
6.1.2 Extrato bruto	69
6.1.3 Comparação entre os parâmetros cinéticos: urease e extrato bruto	70
6.2 Otimização dos parâmetros funcionais do biossensor	71
6.2.1 Resposta dos biossensores em função da concentração da enzima	71
6.2.2 Efeito do pH.....	73
6.2.3 Efeito da temperatura.....	74
6.3 Síntese e resposta eletroquímica dos filmes de PPI , PPI/urease e PPI/extrato bruto	76
6.4 Determinação do potencial ótimo da enzima.....	80
6.5 FTIR.....	82
6.6 Microscopia eletrônica de varredura - MEV	85
6.7 Microscopia de força atômica – AFM	86
6.8 Microbalança de cristal de quartzo eletroquímica - MCQE	90
6.8.1 Comparação entre as medidas de MCQE para urease e para o extrato bruto	94
6.9 Uso dos biossensores para a detecção de uréia.....	96
6.10 Limite de detecção	97
6.11 Uso do eletrodo de PPI/urease como biossensor para a detecção de uréia.....	98
6.12 Uso do eletrodo de PPI/extrato bruto como biossensor para a detecção de uréia	104
CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS	113

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

Este capítulo apresenta os aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de biossensores, além dos objetivos e a motivação para a realização deste trabalho.

Para a apresentação dos resultados obtidos, esta tese foi dividida nos seguintes capítulos: *Capítulo 1*, apresentando os principais conceitos e aplicações de biossensores; *Capítulo 2*, que apresenta uma breve discussão sobre os polímeros conjugados aplicados como matrizes em biossensores e as suas propriedades elétricas, destacando as propriedades do polipirrol (PPI). No *Capítulo 3* contêm conceitos sobre enzimas e cinética enzimática; *Capítulo 4*, que apresenta as técnicas de caracterização aplicadas ao sistema polímero/enzima utilizadas neste trabalho; *Capítulo 5*, são apresentados os materiais e métodos utilizados na preparação dos sistemas polímero/enzima, além da parte experimental; *Capítulo 6*, que apresenta e discute os resultados obtidos sobre a confecção, caracterização e aplicação dos biossensores enzimáticos e finalizando com o *Capítulo 7*, onde são apresentadas as conclusões finais desta tese e as perspectivas para trabalhos futuros

1. Motivação e objetivos

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e o baixo custo computacional, há hoje uma demanda significativa por novos sensores em busca de uma melhor precisão nos resultados de análises em tempo real, aplicados nos setores de saúde, veterinária, agricultura, industrial e no controle de poluentes.

Sensores têm sido usados há muitos anos na detecção de gases, tais como o oxigênio, dióxido de carbono, óxido nitroso e alguns íons, tais como K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , I^- , F^- e Cl^- . Recentemente, a detecção de compostos orgânicos que incluem glicose, lactato e etanol, é realizada por meio de sensores, chamados de biossensores¹. Assim, diversas enzimas estão

sendo utilizadas na construção de biossensores para aplicação em análises clínicas, uma vez que oferecem estabilidade, seletividade e baixo custo

Na área de bioanalítica, um dos desafios é a detecção rápida e simultânea de vários compostos de diferentes fontes, a partir de amostras clínicas, alimentos, ambientais² e, em especial, amostras que contenham uréia por meio de diferentes técnicas. A função metabólica renal é determinada pela quantidade de uréia no sangue e na urina, ocasionando sérios riscos à saúde³. Estes fatos impulsionam, cada vez mais, a busca por estudos mais elaborados visando facilitar diagnósticos clínicos.

O foco deste trabalho é o estudo de biossensores amperométricos e potenciométricos à base de extrato bruto de feijão de porco (*Jack Bean*) e urease purificada (comercial) como fontes enzimáticas. Essa comparação será realizada a fim de propiciar a construção de biossensores, tendo como base o extrato bruto, que apresenta como vantagem o baixo custo.

Com o propósito de contribuir para esses estudos, os objetivos deste trabalho foram:

- Otimizar a resposta dos biossensores a partir das variações dos seguintes parâmetros: concentração de enzima, pH, temperatura;
- Determinar os parâmetros cinéticos para os biossensores e obter os valores da constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade de reação enzimática (V_{max});
- Caracterizar esses eletrodos enzimáticos e confirmar a presença da urease purificada (comercial) e do extrato bruto imobilizado nas matrizes poliméricas;
- Avaliar as respostas dos biossensores na detecção de uréia;
- Comparar a eficiência dos biossensores em relação aos transdutores utilizados e à natureza da enzima imobilizada (urease purificada e como extrato bruto).

1.1 Definições e propriedades dos biossensores

O primeiro biossensor desenvolvido por Clark e Lions em 1962 era conhecido como eletrodo enzimático⁴. Esse biossensor utilizava a glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida, em eletrodos de Pt e detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução. Assim, quantificou-se a variação da concentração de oxigênio

dissolvido que, por sua vez, era proporcional à concentração de glicose⁵. Desde então, diversos tipos de biossensores têm sido preparados visando os mais diversos tipos de análises clínicas, praticidade e resultados mais rápidos e precisos.

Um biossensor tem como principal característica a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, e um transdutor, que converte um sinal biológico em elétrico. Assim, é possível verificar diferenças de concentração do analito^{1,6} (Figura 1) que estão relacionadas às mudanças de massa, absorção ou emissão de luz, temperatura ou estado de oxidação⁷. O princípio básico de funcionamento de um biossensor enzimático envolve reações enzimáticas em um substrato, que podem ser monitoradas por meio de um transdutor durante a quantificação dos produtos finais formados. O transdutor é um dispositivo elétrico que responde à medida que o sinal é eletronicamente amplificado, armazenado e, então, exibido.

Figura 1 - Diagrama que representa o princípio de funcionamento de um biossensor⁸.

1.2 Métodos de transdução

Os principais métodos de transdução podem ser: eletroquímicos (amperométrico,

potenciométrico, condutométrico e impedanciométrico), óptico, acústico e termométrico.

Os maiores problemas para o desenvolvimento de biossensores mais eficientes são a limitada estabilidade do receptor e a resistência difusional da matriz usada para confinar o receptor próximo ao transdutor. Além disto, há ainda a necessidade de amplificação do sinal a ser detectado, sem que haja interferências. Dessa forma, dependendo da natureza das interações bioquímicas com o analito, um transdutor mais adequado às características do dispositivo deve ser adaptado ao biossensor¹.

Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para uso em análises clínicas e se baseiam no preparo de eletrodos quimicamente modificados com materiais biológicos imobilizados.

A detecção eletroquímica pode ser do tipo:

- (i) Amperométrica, quando ocorre transferência de cargas após a aplicação de um potencial ou rampa de potencial e, neste caso, uma corrente é gerada pela oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho. Esta corrente é medida e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativa⁹;
- (ii) Potenciométrica, quando se mede diferenças de potencial após a aplicação de valores de corrente fixas ou rampas;
- (iii) Condutométrica, quando há mudanças na condutância entre os eletrodos;
- (iv) Impedanciométrica, quando se detecta a variação da impedância no eletrodo^{10,11}.

Os transdutores potenciométricos e amperométricos são relativamente simples e estão em um estágio mais avançado de pesquisa em relação aos outros transdutores citados. Estes fatores somados justificam a busca por biossensores versáteis, de baixo custo e com uma seletividade específica a partir da utilização de polímeros condutores como camada ativa e de enzimas em suas fontes naturais.

1.2.1 Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos são assim denominados devido ao seu mecanismo de transdução. Durante as medidas amperométricas, um potencial é mantido constante entre o eletrodo de trabalho (ET) e o eletrodo de referência (ER). A corrente gerada pela oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho é medida e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas. No caso de biossensores enzimáticos, esse princípio de detecção é baseado em processos de transferência eletrônica entre o sítio ativo de uma enzima imobilizada e um eletrodo de trabalho¹², podendo haver alterações do estado de oxidação tanto do analito, quanto das espécies envolvidas na reação.

Como o uso contínuo do eletrodo enzimático pode causar a perda de sensibilidade da superfície do eletrodo, as enzimas oxidoredutases são as mais adequadas para estes biossensores, desde que a transferência de elétrons esteja envolvida no processo de transdução. Essas enzimas utilizam o oxigênio molecular como receptor de elétrons e produzem peróxido de hidrogênio pela reação com o analito¹³. Esses biossensores chegam a um estado estacionário de corrente, mas nunca alcançam o equilíbrio¹⁴.

Os biossensores amperométricos se classificam em três gerações, podendo ser de primeira, segunda e terceira geração, de acordo com o processo envolvido na transferência de carga, reconhecimento do analito, geração e processamento do sinal.

O primeiro relato a respeito de processos de transferência eletrônica direta entre um eletrodo e um material biológico foi em 1977 por Eddows and Hill e Yeh and Kuwana, em que se utilizou o citocromo c imobilizado em eletrodos de ouro (Au) e óxido de estanho dopado com índio (ITO). Em 1979, um grupo russo¹⁵ demonstrou que a transferência eletrônica direta enzima/eletrodo só é possível por meio do uso de enzimas tais como a lacase e a peroxidase, que utilizam o oxigênio e o peróxido de hidrogênio como agentes oxidantes e redutores para a transferência direta de elétrons¹⁵.

A partir de outros estudos, pode-se comprovar que o acoplamento entre enzima e eletrodo não ocorre por transferência direta de elétrons, mas se baseia na eletroatividade do substrato ou do produto da reação enzimática. Porém, este tipo de sistema apresenta problemas de interferências devido à necessidade de potenciais muito altos. Este embasamento é o que caracteriza os biossensores de primeira geração¹⁵.

O princípio de funcionamento de um biossensor de segunda geração se baseia no uso

de mediadores ou de cofatores que atuam na transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo. Com isto, busca-se melhorar os parâmetros analíticos visando uma melhora na eficiência do biossensor¹⁵⁻¹⁶. Os mediadores eletrônicos, que podem ser materiais orgânicos, inorgânico, polímeros condutores ou complexos de metais de transição, surgiram na tentativa de diminuir o alto potencial proporcionado pelos de primeira geração. No entanto, a presença de mediadores pode facilitar a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato, causando interferências durante a detecção¹⁵.

Os biossensores de terceira geração se caracterizam pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo sem o uso de mediadores, sob baixos potenciais. Esta classe de biossensores é a mais atrativa pela possibilidade de se obter um dispositivo simplificado, minituarizado e, ainda, com uma boa sensibilidade e seletividade, já que operam em potenciais mais próximos ao da enzima, diminuindo assim, efeitos de interferentes^{15,17}.

1.2.2 Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos são construídos a partir do uso de eletrodos de íons seletivos ou de transistores de efeito de campo sensíveis a íons. Um eletrodo enzimático é considerado um eletrodo de íons específicos, pois uma enzima reage com uma substância específica e os produtos dessa reação são detectados por eletrodos seletivos a íons, tal como o de pH. O principal sinal de saída, neste caso, deve-se aos íons acumulados no eletrodo decorrente da reação enzimática, sendo a corrente que flui por esse eletrodo igual ou próxima a zero¹⁴.

Os eletrodos de íons seletivos mais empregados são aqueles baseados em membranas poliméricas. Estes sensores são muito utilizados em todos os tipos de análises clínica para a determinação de eletrólitos no sangue e em amostras fisiológicas e, ainda, em amostras ambientais. O princípio de funcionamento dos transdutores potenciométricos segue a Lei de Nernst¹⁸:

$$Potencial = k + \frac{2,303RT}{zF} \log a_i \quad (1)$$

A potenciometria é um método simples e direto de se converter energia química em energia elétrica, sendo o logaritmo da atividade do íon de interesse diretamente proporcional ao potencial observado. Dessa forma, a sensibilidade, que equivale à inclinação da reta para esta relação, depende da temperatura e da carga do íon (z), K é um termo de potencial, R e F são a constante universal dos gases e a constante de Faraday. A relação logarítmica entre o potencial observado e a atividade do íon mostra que pequenas alterações de concentração do analito provocam pequenas mudanças no potencial medido¹⁸.

CAPÍTULO 2 POLÍMEROS CONDUTORES COMO SUPORTES EM BIOSENSORES

Este capítulo apresenta uma breve discussão a respeito dos polímeros conjugados aplicados como matrizes em biossensores e as suas propriedades elétricas, destacando as propriedades do polipirrol (PPI).

Os polímeros mais utilizados como matrizes em biossensores enzimáticos são os condutores, tais como polianilina, politiofeno, polipirrol e os seus derivados⁶. Esses polímeros podem ser usados em biossensores eletroquímicos e possibilitam o desenvolvimento de novos materiais com maior sensibilidade e seletividade¹⁹.

Apesar de serem inerentemente isolantes, os polímeros, que são conjugados, podem apresentar valores de condutividade acima de 1000 S cm^{-1} após um processo de dopagem química ou eletroquímica²⁰. A estrutura dos polímeros se caracteriza por uma alternância de ligações saturadas e insaturadas, fazendo com que os elétrons π sejam deslocalizados ao longo da cadeia polimérica principal.

Os átomos que formam as ligações nestes polímeros são hibridizados na forma $sp^2 + p_z$ (Figura 2) e os elétrons da cadeia principal são unidos por ligações σ formadas a partir de orbitais sp^2 de cada átomo participante da ligação saturada C-C. Já as ligações insaturadas C=C são formadas pela sobreposição de orbitais p_z ou também chamados de orbitais “p puros”²⁰.

(a) Ligações σ : C-C e C-H

(b) Ligações π : C=C

Figura 2 - Formação da ligação (a) σ a partir da sobreposição dos orbitais sp^2 e (b) π em um plano perpendicular ao plano da cadeia principal constituída pela ligação σ ²⁰.

Como os polímeros conjugados possuem elétrons π deslocalizados ao longo da cadeia

C=C, estes podem ser removidos ou adicionados, formando um íon polimérico, durante um processo de dopagem química ou eletroquímica²¹. Este processo de dopagem envolve uma reação de transferência de cargas entre o polímero e o agente dopante. À medida que essas cargas são removidas ou adicionadas à cadeia polimérica, ocorrem mudanças tanto na geometria do polímero, quanto de alguns parâmetros, tais como no ângulo de torção e do comprimento das ligações²². Em se tratando de um processo de dopagem eletroquímica, o nível de dopagem será determinado pelo valor do potencial aplicado a um eletrodo de trabalho modificado com o polímero, fazendo com que a sua relativamente baixa condutividade (na faixa de 10^{-10} a 10^{-5} S cm⁻¹) aumente e resulte em mudanças em suas propriedades elétricas, magnéticas, ópticas e estruturais²³⁻²⁴.

Dentre os polímeros condutores, o polipirrol (PPI) é um dos mais estudados, já que as suas favoráveis propriedades físicas, elétrica, ópticas e alta estabilidade química permitem que ele encontre aplicações em dispositivos eletrônicos, baterias e sensores²⁵. Além disso, o pirrol pode ser oxidado a relativamente baixos potenciais, quando comparado aos outros monômeros (tiofenos, benzeno e anilina) e em diferentes meios.

O PPI pode ser sintetizado quimicamente e eletroquimicamente. A principal vantagem da síntese química é a produção de um polímero na forma de um pó em grandes quantidades e a baixo custo, o que é difícil de ser obtido a partir da síntese eletroquímica. Por outro lado, a síntese eletroquímica origina um material na forma de um filme, com melhores propriedades condutoras para aplicação em dispositivos eletrônicos e com a possibilidade de se obter compósitos e blendas dotados de melhores propriedades mecânicas²⁶.

Durante a síntese eletroquímica, o fluxo de uma corrente anódica passa através de uma solução contendo o monômero, pirrol, o solvente e o eletrólito e promovem a obtenção rápida de um filme polimérico em um substrato. Esse processo pode ocorrer em meio aquoso ou não aquoso em uma atmosfera inerte, possibilitando a formação de um filme de PPI condutor diretamente no eletrodo²⁶.

A síntese eletroquímica apresenta como vantagem a possibilidade do controle de parâmetros de síntese, tal como da espessura do filme polimérico. Além disso, há a vantagem do procedimento ser rápido, fácil e limpo, já que pode ser realizado em meio aquoso, diferentemente de outros monômeros²⁶.

Uma das propostas de mecanismo de eletrooxidação do pirrol pode ser vista na Figura 3, onde há o crescimento em cadeia via acoplamento das espécies oxidadas. Inicialmente o monômero é oxidado e gera um radical cátion. Em seguida, ocorre a dimerização do monômero com o acoplamento de dois radicais cátions. O dímero é oxidado mais facilmente

devido ao aumento da estabilidade propiciada pela sua estrutura; então, novamente o monômero é reoxidado e se acopla ao trímero. O crescimento da cadeia é finalizado quando o radical cátion torna-se pouco reativo ou se no caso do final da estrutura em cadeia ser estericamente bloqueado²⁶.

Figura 3 - Processo de oxidação do polipirrol²⁷.

O PPI também é relativamente estável e apresenta uma biocompatibilidade com diversas enzimas para a construção de biossensores, tais como a glicose-oxidase, glicose-desidrogenase, colesterol-oxidase, colestol-esterase, glutamato-desidrogenase, frutose-desidrogenase, urease e tirosinase²⁸.

CAPÍTULO 3 ENZIMAS EMPREGADAS COMO ELEMENTO DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO

As enzimas são componentes de extrema importância para a fabricação de biossensores como elementos de reconhecimento biológico pela alta sensibilidade e seletividade que as reações enzimáticas apresentam²⁹⁻³⁰.

Os biossensores enzimáticos são empregados atualmente na medição da taxa de glicose no sangue³¹, uréia, ácido úrico³², triglicerídeos³³, colesterol, compostos fenólicos, dentre outros³⁴⁻³⁵.

Uma das enzimas muito estudadas em biossensores por ser de fácil imobilização, é a urease, que foi a primeira metaloenzima a ser isolada na forma cristalina³⁶, quando foi demonstrada a sua natureza proteica e a presença do níquel em sua estrutura³⁷. Após ser extraída a partir da *Klebsiella aerogenes*, teve a sua estrutura molecular resolvida por cristalografia³⁸. Como sendo um trímero do trímero de 540 kDa. As ureases vegetais são hexâmeros ou trímeros de uma subunidade de 90 kDa, com 2 átomos de níquel por subunidade³⁹.

A urease atua como um catalisador altamente eficiente durante a hidrólise da uréia e tem sido utilizada, sobretudo, quando extraída das sementes de leguminosas e de várias bactérias e fungos³⁰. A sequência de alinhamento dos aminoácidos em sua cadeia, porém, revela que, mesmo se extraídas de diferentes fontes, as ureases são similares e se diferenciam somente por uma, duas ou três cadeias de peptídeos. Assim sendo, assume-se que a urease extraída de diferentes fontes possui uma estrutura comum e ativa que atua sob o mesmo mecanismo de catálise durante a hidrólise da uréia⁴⁰.

Assim sendo, a construção de biossensores para detecção de uréia são de extrema importância, pois a uréia é um bioproduto monitorado no sangue como indicador de função renal⁴¹⁻⁴² e um elevado nível causa insuficiência renal⁴³.

A uréia é amplamente encontrada na natureza e a sua análise é de interesse na química de alimentos e no monitoramento ambiental, já que está presente em solos e águas contaminadas³⁰. Muitos sensores de uréia têm sido desenvolvidos, tais como os sensores amperométricos, condutométricos, ópticos, potenciométricos e de gás, para a análise de amônia ou de pH¹⁹. A hidrólise da uréia contida nos fertilizantes é muito rápida e resulta na volatilização improdutiva do nitrogênio, que pode tornar as plantas contaminadas por amônia⁴⁴. Dessa forma, durante a detecção, a uréia é catalizada pela urease, formando CO₂ e

NH_3 como produtos da reação

A Figura 4 mostra a molécula da urease composta por histidinas e coordenada por dois átomos de Ni. A estrutura cristalina do centro ativo da urease contém duas moléculas de água e é coordenada a um grupo OH^- . A especificidade da enzima está intimamente relacionada à forma do seu centro ativo.

Figura 4 - Molécula da urease⁴⁶.

De acordo com a molécula da urease, o primeiro centro metálico de Ni da urease é coordenado a dois átomos de nitrogênio histidínicos e a um átomo de oxigênio do aminoácido lisina. A uréia coordena-se durante a reação de catálise na posição, provavelmente ocupada por uma molécula de água. A esfera de coordenação do segundo átomo de Ni é composta por dois átomos de nitrogênio histidínicos e por três átomos de oxigênio, sendo dois deles provenientes de resíduos dos aminoácidos aspartato e lisina e um proveniente de uma molécula de água^{38,45}.

Um dos mecanismos propostos para a catálise da uréia pela urease está mostrado na Figura 5, onde ocorre a eliminação de duas moléculas de H_2O pela urease. Em seguida, o átomo de $\text{Ni}_{(1)}$ polariza o grupo carbonila da uréia e ativa o carbono para um ataque nucleofílico. O átomo de $\text{Ni}_{(2)}$ liga-se um grupo OH^- por meio do ataque do grupo OH^- ao carbono parcialmente positivo da carbonila da molécula de uréia. O grupo amina, NH_2 , da uréia é protonado pela histidina e é eliminado, formando ácido carbâmico que, por sua vez, forma amônia e CO_2 ⁴⁶, de acordo com a reação da Figura 5.

Figura 5 - Mecanismo de catálise da uréia pela urease⁴⁶.

3.1 Feijão de porco (Jack Bean) como fonte de urease (extrato bruto)

Devido à grande variedade de tecidos vegetais, o Brasil constitui uma fonte inesgotável de enzimas que podem ser utilizadas no desenvolvimento dos biossensores, devido às suas propriedades analíticas atraentes e por serem de fácil manuseio, além do baixo custo⁴⁷. Tecidos vegetais enzimáticos requerem uma preparação simples em relação à enzimas puras e ainda apresenta a vantagem de estarem presentes em seu ambiente natural. Ainda, o tempo de vida desses tecidos que contém enzimas é muito maior em relação ao tempo de vida de enzimas purificadas, melhorando o custo-benefício. A tabela 1 lista os principais tecidos utilizados para extração de enzimas, como por exemplo, a urease.⁴⁸

Tabela 1 Principais tecidos utilizados para extração de enzimas

Analito	Tecido enzimático	Elemento sensível
Piruvato	milho	CO ₂
Uréia	feijão de porco	NH ₃
Fosfato	batata	O ₂
Dopamina	banana	O ₂
Tirosina	beterraba	O ₂
Cisteína	Pepino	NH ₃
Catecol	Abacate, abobrinha	O ₂ /H ₂ O ₂

O Feijão de porco é uma leguminosa cultivada em regiões tropicais e equatoriais que possui um crescimento anual ou bianual, com crescimento inicial lento. É indicado para adubação verde, cobertura verde em cultura perene e controle de invasoras, suportando secas prolongadas e resistente à altas temperaturas⁴⁹. A partir do feijão de porco, pode-se extrair a urease (*Canavalia Ensiformis*).

Estudos fitoquímicos demonstraram que a *Canavalia Ensiformis* apresenta uma série de compostos de diferentes classes, como saponinas, cianoglicosídeos, terpenóides, alcalóides, taninos, entre outros, sendo que de sua planta tem se extraído os princípios ativos que agem como inseticidas, herbicidas e fungicidas⁵⁰.

Estudos realizados por Nogueira, et. al., mostraram que o extrato bruto do feijão de porco pode ser usado como fonte de urease para uso em biossensores para detecção de uréia em amostras de leite e fertilizantes.

3.2 Métodos de imobilização enzimática

O processo de imobilização enzimática é de fundamental importância para o bom desempenho dos biossensores. Uma grande quantidade de enzima ativa deve estar ligada à superfície do eletrodo³⁵, fazendo com que as biomoléculas imobilizadas apresentem maior estabilidade e maior eficiência se comparadas às enzimas em solução³⁰. Além disso, deve-se buscar um aumento no tempo de vida dos biossensores, controlando a temperatura e a variação de pH, sem que ocorra uma perda considerável da atividade catalítica. Neste caso, há

a possibilidade de reutilização da enzima, tornando-a mais resistente às mudanças ambientais⁵¹.

A fim de se obter biossensores mais eficientes e estáveis, são utilizados métodos de imobilização enzimática baseados no aprisionamento de moléculas em suportes sólidos, polímeros ou membranas. Os métodos de imobilização mais empregados se baseiam em ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. A imobilização por adsorção física é uma das mais simples e envolve fracas interações entre o suporte e a enzima; a química, por sua vez, envolve a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte⁵¹⁻⁵².

Os principais procedimentos empregados na imobilização de enzimas são: (a) adsorção; (b) encapsulamento; (c) ligação covalente e (d) ligação covalente cruzada. Estes métodos estão representados na Figura 6.

Figura 6 - Diferentes tipos de imobilização enzimática⁵³.

O processo de imobilização por adsorção física é um método simples, rápido e de baixo custo e se baseia em interações físicas entre a enzima e a matriz, que pode ser polimérica⁵⁴⁻⁵⁵. Essas interações podem ser do tipo Van der Waals ou eletrostática, dipolo-dipolo ou por ligações de hidrogênio⁵⁶⁻⁵⁷ quando a enzima interage com a matriz por meio de seus domínios hidrofóbicos; ou ainda, pode permanecer armadilhada aos poros da matriz polimérica. A grande vantagem da imobilização por adsorção é que não há a necessidade da presença de reagentes para a imobilização, além disto, a matriz pode ser regenerada, já que não ocorre nenhuma modificação do componente biológico, que propicia a máxima retenção da atividade enzimática. O processo de imobilização por adsorção física é um método simples, rápido e de baixo custo e se baseia em interações físicas entre a enzima e a matriz, que pode ser polimérica, podendo ser aplicado em filmes de PPI e urease⁵⁸.

A encapsulação é outro método de imobilização enzimática baseado no confinamento da enzima em uma membrana, que se localiza na superfície de um eletrodo e apresenta uma porosidade controlada para a livre difusão do analito e dos produtos de reação. Podem-se citar alguns exemplos de membranas, tais como náilon, nitrato de celulose, acetato de celulose, resinas, dentre outros. Este método apresenta como desvantagem a possibilidade de crescimento de microorganismos na superfície do eletrodo⁵⁶.

Os métodos de oclusão se baseiam no confinamento da enzima em espaços intersticiais de um gel, permitindo a livre difusão do substrato de baixo peso molecular e dos produtos de reação, como exemplos podem ser citados: gel, poliacrilamida, alcoóis polivinílicos, grupos catiônicos e aniônicos, dentre outros. A única desvantagem é a perda da atividade enzimática pela formação de radicais livre^{55-56,59}.

Uma técnica bastante utilizada de imobilização se baseia na enzima ligada ao suporte por meio de ligações covalentes entre os grupos funcionais da do suporte. A desvantagem deste procedimento é a possibilidade de uma mudança conformacional nos sítios ativos das moléculas da enzima^{55,60-61} e, ainda, a não regeneração da matriz, o que pode provocar a perda da atividade⁵⁴. Já o processo de imobilização por ligação covalente cruzada se baseia na formação de um sistema reticulado enzima-enzima, que requer o uso de agentes bifuncionais, tal como o glutaraldeído, que irá reagir com grupos aminas da enzima. A desvantagem deste procedimento é a formação de barreiras de difusão, que pode provocar tempos de resposta maiores para o biossensor^{55,62}.

A Tabela 2 mostra os principais métodos de imobilização, bem como, as vantagens e desvantagens apresentadas pelos métodos e suas aplicações

Tabela 2 Métodos convencionais de imobilização²⁸

Método	Vantagens	Desvantagens	Exemplo
Adsorção física	Matriz pode ser regenerada; Baixo custo;	Forças de interação susceptíveis à mudanças de pH, temperatura e força iônica;	Adsorção de glicose oxidase em polímeros condutores para detecção de glicose;
Encapsulação	Confinamento físico do material biológico próximo ao transdutor; Baixo custo;	Alta barreira de difusão;	Aprisionamento da urease e glutamato-dehidrogenase em filmes de PPI/polivinilsulfonato para detecção de uréia;
Ligação cruzada	Mínima perda da atividade enzimática;	Matriz torna-se tóxica devido aos produtos formados;	Glutaraldeído como agente entrecruzante para detecção de lactato;
Ligação covalente	Baixa resistência à difusão; Estável sob condições adversas;	Matriz torna-se tóxica devido aos produtos formados;	Glucose-oxidase imobilizada em ácido poli(o-amino benzóico) para detecção de glicose;

3.3 Cinética enzimática

O estudo sobre a cinética enzimática é importante para se compreender as propriedades gerais das enzimas, bem como o seu mecanismo de ação. Este tópico trata os principais conceitos envolvidos na cinética enzimática, entre eles, os modelos da cinética de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

Em 1913, foi desenvolvida por Michaelis-Menten uma teoria geral das reações enzimáticas, bem como a cinética dessas reações e, mais tarde, em 1925, Briggs e Haldane deram continuidade aos estudos sobre a cinética⁶³.

A teoria de Michaelis-Menten considera que uma enzima (E) se combina com um substrato (S), para formar um complexo intermediário composto por enzima e substrato (ES). Em seguida, este complexo se quebra para formar o produto (P) e regenerar a enzima. Para uma reação enzimática, envolvendo apenas um substrato, tem-se a seguinte expressão geral, onde k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes de reação inicial, de acordo com a eq. (2).

A relação entre a velocidade inicial de uma reação catalisada pela enzima e a concentração de substrato é expressa pela equação de Michaelis-Menten²⁹. Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade da reação enzimática é expressa em função de $V_{\max}$, que é a velocidade máxima, quando toda enzima está presente na forma de (ES); e em função de K_m , a constante de Michaelis-Menten, que é a concentração do substrato na qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, ou seja, a constante de dissociação equações (3) e (4):

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (4)$$

Os valores de K_m e de $V_{\max}$ podem ser obtidos a partir do gráfico da velocidade de reação em função da concentração do substrato, como mostra a Figura 7.

Figura 7 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática⁶⁴.

Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade da reação enzimática aumenta com o aumento da concentração de substrato até atingir um valor limite; a partir deste ponto, a adição de mais substrato não afeta a velocidade. Quando a velocidade de reação atinge metade da velocidade máxima, $V = V_{máx}/2$, o coeficiente de Michaelis-Menten (K_m) é igual à concentração de substrato, isto é, $K_m = [S]$. O valor de K_m irá indicar o grau de afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_m , maior será a afinidade da enzima pelo substrato. No caso de biossensores, o valor de K_m é um parâmetro quantitativo importante que não depende da concentração de enzima²⁹.

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em outras equações que são mais úteis para a análise dos resultados experimentais. Uma delas é obtida substituindo os valores de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, eq. (5):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{max} [S]} \quad (5)$$

Rearranjando a eq. (6) temos:

$$\frac{1}{V_0} \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (6)$$

Dessa forma, a equação de Michaelis-Menten pode ser reescrita (linearização) para que os valores de K_m e $V_{\max}$ sejam obtidos graficamente. Ao ser traçado um gráfico de $1/V_0$ em função de $1/[S]$, obtém-se uma reta com coeficiente angular de $K_m/V_{\max}$, com intersecção de $1/V_{\max}$ no eixo de $1/V_0$ e de $-1/K_m$ no eixo de $1/[S]$ ²⁹. Esse é a chamada de equação de Lineweaver-Burk como mostra a Figura 8.

Figura 8 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk⁶⁵.

A atividade catalítica é afetada por vários fatores, tais como: presença de inibidores, pH e temperatura. Esses fatores podem modificar a velocidade da reação catalítica e conduzir a uma não-linearidade da equação de Michaelis-Menten. Assume-se então, um fator de correção da equação, que passa a ser denominada de representação de Hill⁶⁶ (eq. 7).

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \left[\frac{K_m^{app}}{[S]} \right]^\alpha} \quad (7)$$

Sendo que α representa o desvio do comportamento ideal da equação de Michaelis-Menten, representada por K_m^{app} , v é a velocidade da reação enzimática, V_{max} é a velocidade máxima da reação para uma determinada concentração de enzima.

3.4 Biossensores para detecção de uréia

Neste tópico, será apresentada uma revisão bibliográfica a respeito dos biossensores para detecção de uréia, destacando as principais matrizes utilizadas e os métodos de imobilização enzimática mais empregados.

De acordo com a literatura, a maioria dos biossensores para a detecção de uréia podem ser construídos por meio da imobilização da urease em diferentes matrizes e são baseados na detecção de amônia ou HCO_3^- .

Os polímeros são ótimos suportes para imobilização da urease e outras enzimas. Há algumas matrizes citadas em trabalhos na literatura que são empregadas para a imobilização da urease, como o polipirrol e seus derivados, que serão discutidos posteriormente, a polianilina⁶⁷, pani(urease)-nafion⁶⁸, poliéster funcionalizado com nanopartículas de Au⁶⁹ e fosfolípidos (DPPG)⁷⁰.

Vários tipos de transdutores já foram estudados na área de biossensores, em especial para a detecção de uréia. Os primeiros trabalhos publicados foram a respeito de biossensores baseados em eletrodos de amônia, de pH e fibra óptica. Posteriormente, surgiram os biossensores amperométricos⁵⁴, potenciométricos⁵⁴, condutométricos⁷¹ e piezoelétricos⁷².

Foram desenvolvidos biossensores de fibra óptica para a detecção de amônia, sendo a urease imobilizada em membranas de teflon por meio de ligações cruzadas com glutaraldeído e albumina de soro bovino (BSA). A faixa linear de uréia foi entre 0,5 e 25 mmol L⁻¹ em amostras clínicas⁷³. Em outro trabalho, a urease foi imobilizada em membranas de biodina c, sendo utilizado um transdutor óptico por fluorescência, com alta estabilidade e baixo limite de detecção em relação à maioria das aplicações clínicas, entre 0,03 a 0,06 mmol L⁻¹⁷⁴.

Pela técnica de análise por injeção em fluxo, um biossensor de uréia com urease covalentemente ligada diretamente à membrana do eletrodo íon-seletivo de amônio foi

desenvolvido. Este biossensor permitiu a determinação de uréia dentro da faixa linear de 0,5 - 8 mmol L⁻¹. Nos resultados da determinação de uréia em tempo real, as amostras de soro humano corroboraram com aqueles obtidos por métodos de análises clínicas de rotina⁷⁵.

Outro trabalho apresentou um biossensor potenciométrico de pH com a técnica de injeção em fluxo, construído por géis foto-curáveis (PVA-SBQ) para imobilizar a urease⁴³.

A partir de 1996 foram publicados os primeiros trabalhos em que se utilizou o PPI como suporte para a imobilização da urease. Nestes trabalhos, foram utilizados filmes de PPI e seus derivados para aplicação em biossensores, a partir dos mais diversos métodos de transdução para a detecção da uréia como analito.

Foi construído um biossensor para a detecção amperométrica de uréia pela técnica de análise por injeção em fluxo. Neste caso, a urease foi imobilizada por adsorção em filmes de PPI. Esse dispositivo apresentou um limite de detecção muito baixo e a resposta linear foi obtida entre 3 e 15 mg L⁻¹ de uréia⁷⁶.

Um outro biossensor amperométrico foi também desenvolvido para a determinação quantitativa da uréia em solução aquosa. O princípio é baseado no uso de moléculas de hemateína que são sensíveis ao pH. A urease foi covalentemente imobilizada ao copolímero poli(N-3-aminopropilpirrol-co-pirrol) sobre ITO. O eletrodo apresentou uma faixa de resposta linear de 0,16-5,02 mmol L⁻¹ de uréia em meio aquoso. O tempo de resposta foi de 40 s para chegar a 80% da atividade da enzima, que foi mantida por cerca de 2 meses⁷⁷.

Também foi construído um biossensor de pH tendo a urease, modificada com poliânions, imobilizada em filmes de PPI eletroinativo. Este biossensor apresentou uma resposta linear de potencial entre 3×10^{-4} mol L⁻¹ e 3×10^{-2} mol L⁻¹ de uréia⁷⁸.

Os biossensores potenciométricos para detecção de uréia, tendo o PPI como suporte de imobilização de urease foram fabricados a partir de 1997. Em um dos primeiros trabalhos, imobilizou-se a urease por adsorção em uma matriz de PPI eletroinativo e a resposta, na presença de uréia, foi analisada pela variação de pH. As condições de eletropolimerização foram otimizadas e, portanto, o biossensor apresentou uma resposta Nernstiana com uma inclinação de 31,8 mV década⁻¹ acima da faixa de concentração de 10^{-4} mol L⁻¹ a 0,3 mol L⁻¹ de uréia⁷⁹.

Um biossensor potenciométrico à base de albumina de soro bovino (BSA) e PPI foi desenvolvido para a análise quantitativa da uréia em solução aquosa. A urease foi covalentemente ligada às aminas livres presentes sobre a superfície de BSA, por sua vez, ligadas ao PPI. Foi constatado que o eletrodo respondia a uma baixa concentração de uréia com maior número de detecção. O eletrodo apresentou uma resposta linear de $6,6 \times 10^{-6}$ a 7,5

$\times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de uréia. Estes resultados indicaram uma ligação eficiente covalente da enzima com aminas livres das moléculas de BSA sobre a superfície de filmes de PPI, o que eleva o tempo de vida do eletrodo⁸⁰. Dessa forma, diferentemente dos outros polímeros condutores ou suportes utilizados para imobilização, o PPI é o mais indicado devido a sua solubilidade em meio aquoso e fácil preparo. Os polímeros condutores, cujos monômeros são solúveis em água, são os mais apropriados para a imobilização enzimática, pois apresentam a vantagem de não desnaturarem a enzima e permitem ainda o controle da espessura, uma alta velocidade de transferência eletrônica e biocompatibilidade, vantagens apresentadas pelo PPI⁸¹. Dessa forma, diferentemente dos outros polímeros condutores ou suportes utilizados para imobilização, o PPI é o mais indicado devido a sua solubilidade em meio aquoso e fácil preparo. Os polímeros condutores, cujos monômeros são solúveis em água, são os mais apropriados para a imobilização enzimática, pois apresentam a vantagem de não desnaturarem a enzima e permitem ainda o controle da espessura, uma alta velocidade de transferência eletrônica e biocompatibilidade, vantagens apresentadas pelo PPI⁸².

Dessa forma, diferentemente dos outros polímeros condutores ou suportes utilizados para imobilização, o PPI é o mais indicado devido a sua solubilidade em meio aquoso e fácil preparo. Os polímeros condutores, cujos monômeros são solúveis em água, são os mais apropriados para a imobilização enzimática, pois apresentam a vantagem de não desnaturarem a enzima e permitem ainda o controle da espessura, uma alta velocidade de transferência eletrônica e biocompatibilidade, vantagens apresentadas pelo PPI⁸³.

CAPÍTULO 4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE ELETRODOS ENZIMÁTICOS

Neste capítulo, são apresentadas as técnicas de caracterização empregadas no sistema polímero/enzima estudado neste trabalho, bem como: voltametria cíclica, FTIR, microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM) e microbalança de cristal de quartzo eletroquímica (MCQE).

O preparo de eletrodos enzimáticos a partir do uso de polímeros condutores e enzimas é relativamente simples, de baixo custo e requer uma mínima quantidade de amostra para se obter um considerável limite de detecção, alcançado por meio de uma resposta muito rápida. A caracterização da superfície desses eletrodos é de extrema importância, a fim de se compreender suas estruturas e composição, proporcionando resultados mais eficientes. Sendo assim, a compreensão da estrutura básica da matéria tem se apresentado como um desafio ao longo do tempo, o que permite com que se compreendam as suas propriedades⁸⁴⁻⁸⁵. Para a caracterização estrutural dos eletrodos, podem-se empregar medidas de espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). As técnicas eletroquímicas são bastante utilizadas para se detectar substâncias de interesse por serem relativamente simples e rápidas e por permitir uma análise mais detalhada das reações envolvidas entre substrato-elemento biológico. Como exemplos destas técnicas podem ser citadas a cronoamperometria, voltametria cíclica e cronopotenciometria.

Para uma melhor compreensão da morfologia e topografia dos polímeros usados como matrizes enzimáticas, são utilizadas as técnicas de microscopia, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (AFM). Já para quantificar variações de massas no eletrodo enzimático, a microbalança de cristal de quartzo eletroquímica é um instrumento prático e indispensável.

4.1 Técnicas eletroquímicas

4.1.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica qualitativa que gera informações sobre processos redox das espécies eletroativas e permite com que se estude os mecanismos e as velocidades dessas reações. As informações sobre o analito são obtidas a partir do registro de corrente em função do potencial aplicado durante a sua eletrólise, que ocorre em uma célula eletroquímica constituída pelo eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência (Figura 9)^{86,90}.

Como a área do eletrodo de trabalho e do contra-eletrodo são diferentes, o eletrodo de trabalho se polarizará e o de referência, por possuir uma área maior, não se polarizará, mantendo o seu potencial constante. Dessa forma, um sinal de excitação de potencial contra um eletrodo de referência é aplicado em uma célula eletroquímica e esse sinal origina uma resposta característica de corrente. O potencial é repetido ciclicamente entre valores extremos de potencial aplicado, partindo de um potencial inicial, E_1 , até atingir o potencial máximo, E_{max} , decrescendo até o valor de potencial final, E_f ⁸⁶.

Figura 9 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.

O potencial e a corrente resultantes são registrados simultaneamente em uma curva de corrente vs. potencial denominada voltamograma cíclico (Figura 10).

Figura 10 - Perturbação imposta a um sistema pela técnica de voltametria cíclica e o voltamograma obtido.

4.1.2 Eletrodos de referência

O papel do eletrodo de referência é manter um potencial constante em relação ao potencial de uma meia-célula⁹⁰.

Os eletrodos de calomelano consistem de Hg metálico em contato com uma solução saturada de calomelano, Hg_2Cl_2 , contendo também uma solução de KCl. A vantagem deste eletrodo é que os íons $\text{Hg}_{(\text{II})}$ reagem com um número menor de componentes das amostras em relação aos íons Ag^+ , que reagem até com proteínas e podem levar ao entupimento da junção entre o eletrodo e a solução do analito. O potencial de eletrodo para esta meia célula é determinado pela reação⁹⁰:

Os eletrodos de Ag/AgCl contém um fio de Ag imerso em uma solução de KCl 3,5

mol L⁻¹ ou saturada. Esses eletrodos têm a vantagem de poderem ser usados em temperaturas acima de 60°C. O potencial do eletrodo é definido pela semi-reação⁹⁰:

4.2 Espectroscopia de infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A espectroscopia de infravermelho é um método instrumental para a caracterização de amostras, por meio da análise dos grupos funcionais presentes. Seu mecanismo é dependente da interação de moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética⁸⁷.

Esta técnica apresenta como vantagem, além da simplicidade e rapidez, a possibilidade de ser aplicada na identificação de amostras em estado gasoso, líquido ou sólido⁸⁷⁻⁸⁸. Também é possível a realização de análises quantitativas devido à intensidade das bandas serem proporcionais à concentração do componente.

A interação da onda eletromagnética na região do infravermelho é referente aos modos vibracionais das moléculas presentes na amostra (Figura 11). As vibrações moleculares podem ser classificadas em deformações axiais e deformações angulares e somente as vibrações que levam à alteração do momento de dipolo da molécula são observadas no infravermelho convencional⁸⁸.

Figura 11 - Vibrações moleculares impostas pelo infravermelho⁸⁹.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica de extrema importância na caracterização de materiais. Apresenta vantagens, como a extensa faixa que o espectro é contido, entre 400 e 4000 cm^{-1} . Além disso, os espectros apresentam resoluções extremamente altas de até $0,001\text{ cm}^{-1}$. Várias varreduras resultam na diminuição do ruído e ocasiona a obtenção de espectros de alta qualidade⁸⁸.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Em muitos campos da Química, Ciência dos Materiais, Geologia e Biologia, um conhecimento específico sobre a natureza das superfícies de sólidos é de grande importância. Dessa forma, para se realizar uma análise mais completa dos materiais, é necessário que se faça uma análise da imagem de sua superfície, que nos dá informações a respeito de suas propriedades, bem como de sua microestrutura e defeitos⁹⁰.

Porém, a observação direta da morfologia de um material está limitada ao poder resolvente do olho humano, que é cerca de $70\text{ }\mu\text{m}$, ou seja, a distância mínima de separação que deve existir entre dois pontos para que as imagens sejam projetadas em sensores diferentes da retina do olho e, assim, percebidas separadamente. Assim, a função do microscópio é produzir uma imagem ampliada do objeto que possa ser percebida pelo sistema olho-cérebro, sendo essencial a variação de intensidade luminosa ou de cor na imagem⁹¹.

Uma das técnicas mais empregadas para a caracterização de materiais é a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Essa técnica permite estudar sobre as características morfológicas e topográficas de diferentes superfícies², produzindo imagens de alta resolução, sem a perda de nitidez. A preparação de amostra e a obtenção das imagens são relativamente simples, o que faz da MEV ser uma das técnicas mais utilizadas em pesquisas com materiais⁹¹. A MEV se apresenta como a técnica mais adequada para uma análise mais detalhada de morfologia, pois se podem alcançar aumentos superiores ao da microscopia ótica. Em análises de materiais, o aumento é da ordem de 10.000 vezes⁹².

O princípio de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura (Figura 12) consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento de tungstênio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial, permitindo, assim, a variação da aceleração dos elétrons e o aquecimento do filamento. A parte positiva em relação ao filamento do microscópio atrai fortemente os elétrons gerados, resultando em uma aceleração em direção ao eletrodo positivo. A correção do percurso dos feixes é realizada pelas lentes condensadoras e pelo diafragma, reduzindo o diâmetro do feixe e focalizando-os sobre a amostra. A objetiva ajusta o foco dos feixes de elétrons antes que eles atinjam a amostra analisada⁹¹.

Figura 12 - Desenho esquemático da coluna de MEV⁹³.

4.4 Microscopia de força atômica - AFM

Nesta técnica de microscopia, AFM, a interação atômica entre uma ponta de prova situada na extremidade de uma alavanca e a superfície é usada para mapear a topografia do material, conforme o movimento de um elemento piezoelétrico (PZT), que muda a posição relativa ponta-superfície.

O princípio de funcionamento do microscópio de força atômica (Figura 13) baseia-se em um cantilever que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior se encontra uma ponta com dimensão da ordem de micra. Para percorrer a amostra a fim de se obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento, as cerâmicas piezoelétricas, que realizam movimentos nas três dimensões (x,y,z). Durante essa varredura, emprega-se também um sistema de alinhamento com feixe de laser, que incide sobre o cantilever e reflete em um sensor de quatro quadrantes. O sensor fornece informações de localização para o sistema, que corrige a posição do cantilever, mantém o contato com a amostra durante a varredura e permite a obtenção da imagem^{91,94}.

Figura 13 - Digrama que representa o princípio de funcionamento do AFM⁹⁴.

Durante a varredura, forças de atração ou repulsão podem atuar, sendo que as forças de atração podem ter origem em fatores físicos, como capilaridade e interação de Van der Waals; ou químicos, como afinidade entre o cantilever e a amostra e as forças de repulsão

devem-se às interações coulômbicas. Assim, a imagem obtida na AFM é resultante da convolução da topografia real da amostra com a forma da agulha do cantilever⁹⁰.

Em estudos de polímeros, o uso da AFM tem se difundido, devido ao custo e manutenção do equipamento ser inferior aos microscópios eletrônicos modernos, além de permitir obter informações sobre a morfologia, distribuição de fases em blendas e compósitos, dados tribológicos, conformação de cadeias poliméricas, dentre outras aplicações⁹⁵.

4.4.1 Modo de operação (AFM)

Existem várias formas de obter-se imagens com um microscópio de força atômica. Quando se pretende analisar materiais mais maleáveis e facilmente deformáveis pela ponta, como é o caso de materiais biológicos, polímeros, amostras muito rugosas, utiliza-se frequentemente o modo intermitente (TappingMode) (Figura 14). Neste, a agulha do cantilever vibra em alta frequência e entra em contato com a superfície da amostra ao fim de alcançar um ciclo de oscilação. Quando forças de interação ou gradientes de força são estabelecidos entre a ponta e a amostra, a amplitude da oscilação é atenuada⁹⁰.

Figura 14 - Mapa de forças entre amostra e agulha em função da distância, caracterizando os diferentes

modos de trabalho do microscópio de força atômica⁹¹.

4.5 Microbalança de Cristal de Quartzo – MCQE

A microbalança de cristal de quartzo (MCQ) é um equipamento (Figura 15) muito empregado na caracterização da superfície de eletrodos. O princípio de funcionamento de uma MCQ se baseia na mudança de massa, perda ou ganho, que ocorre na superfície de um eletrodo de cristal de quartzo (piezoelétrico) com um depósito condutor, como o Au e pode ocorrer nas fases gasosas e líquidas durante processos de oxidação e redução⁹⁶⁻⁹⁷, como ocorre em filmes de PPI⁹⁸, devido à entrada e saída de eletrólitos suporte¹²⁵.

Figura 15 - Esquema do arranjo experimental da MCQE⁹⁷.

Durante as medidas voltamétricas, a solução permanece em contato com esse disco que atua como eletrodo de trabalho⁹⁹. Basicamente, o cristal de quartzo piezoelétrico possui as faces conectadas a um circuito elétrico onde se aplica um potencial, resultando em uma deformação mecânica¹⁰⁰ e a geração de um campo elétrico responsável pela vibração do cristal em determinada frequência de ressonância, F . Oscilações com amplitudes paralelas à superfície do cristal ocorrem se um potencial alternado é aplicado ao cristal de quartzo e em

frequências suficientemente altas, da ordem de 5-10 MHz.

O cristal interage com a solução resultando em mudanças de massa, Δm , em sua superfície, responsáveis pelo deslocamento da frequência de ressonância, Δf , do cristal, que é afetado pela densidade e condutividade específica do líquido. Quando essas propriedades são constantes, a frequência do cristal aumenta com a diminuição da massa do eletrodo¹⁰¹. Assim, quando uma das faces do cristal é colocada em contato com uma solução eletrolítica, ela passa a ter a função de eletrodo de trabalho, em uma cela eletroquímica convencional¹⁰⁰.

No caso dos polímeros condutores, podem ser estudados tanto os fenômenos de transporte de íons durante a sua síntese eletroquímica, quanto o processo de dopagem/desdopagem de um filme já depositado sobre o cristal. Esta associação da MCQ com Eletroquímica é geralmente denominada MCQE (microbalança de cristal de quartzo eletroquímica)¹⁰².

Na área de biossensores, a MCQE é uma poderosa ferramenta para monitorar e quantificar enzimas imobilizadas em diferentes matrizes. A partir da variação na frequência do cristal de quartzo, é possível se obter a massa de material adsorvido sobre o eletrodo por meio da equação de Saurbrey, que converte frequência em massa (eq. 08).

$$\Delta f = -2,27 \times 10^{-6} F_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad (8)$$

onde Δf é a mudança de frequência medida, F_0 é a frequência fundamental do cristal de quartzo, A é a área recoberta do eletrodo e Δm , a variação de massa devido à deposição na superfície. Neste trabalho, foi utilizada a equação simplificada de Sauerbrey, de acordo com a eq. (9).

$$\Delta f = -Cf * \Delta m \quad (9)$$

onde Δf é a mudança de frequência medida, Δm é a variação de massa por unidade de área e C_f , que equivale a $56,6 \text{ Hz } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^2$, é o fator de sensibilidade do cristal.

Embora a MCQE tenha sido muito utilizada para se medir variações de massa no ar ou sob vácuo, o seu uso em líquidos é mais recente. Os experimentos com a MCQE permitem se obter, simultaneamente, parâmetros eletroquímicos, tais como corrente, potencial, cargas e variações da frequência de ressonância do cristal, que podem ser associadas diretamente às mudanças em massa no cristal⁹⁶.

CAPÍTULO 5 EXPERIMENTAL

Este capítulo tem como objetivo, apresentar as informações a respeito dos métodos aplicados para a construção e caracterização dos eletrodos enzimáticos usados como biossensores, bem como dos métodos de detecção e as condições experimentais e reagentes empregados para a obtenção dos resultados.

5.1 Reagentes

Os reagentes foram adquiridos comercialmente e utilizados como recebidos: pirrol (previamente destilado) (Aldrich); LiClO_4 anidro, como eletrólito de suporte (VETEC Química Fina); urease (Sigma Aldrich); Feijão de porco (fonte de urease usada como extrato bruto); polyclar 10 (ISP do Brasil); uréia (Synth); tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7.

O extrato bruto do feijão de porco foi estocado em um refrigerador por um período de uma semana, em frascos lacrados e protegidos da luz e da ação do oxigênio.

O Polyclar, denominado como Polivinilpirrolidona (PVP), é um agente estabilizador em sucos, vinhos e cerveja, além de ser de fácil remoção. O bom desempenho deste agente protetor é atribuído à sua baixa solubilidade e à formação de ligação de hidrogênio entre os substratos naturais e o polímero¹⁰³.

O tampão fosfato de sódio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) utilizado neste trabalho opera na faixa de pH entre 5,8 e 8,0, de acordo com Sigma-Aldrich. A atividade enzimática é dependente do pH utilizado e pode resultar em mudanças nesta atividade, caso o pH utilizado não seja o mais apropriado para o meio da enzima. Dessa forma, a escolha de um tampão apropriado é um parâmetro de extrema importância. De acordo com a literatura, foi realizado um estudo com quatro tipos de tampões, fosfato de sódio, fosfato de potássio, Tris-HCl e sódio-borato-HCl, e seus efeitos foram investigados para uso em biossensores. Observou-se que o tampão fosfato de sódio apresentou-se mais eficiente para ser empregado em biossensores¹⁰⁴.

5.2 Procedimento experimental

5.2.1 Eletropolimerização e detecção

A eletropolimerização do pirrol foi realizada em uma célula com entrada para três eletrodos, tendo Pt e Au como eletrodos de trabalho, Pt como contra-eletródo e calomelano saturado (ECS) como eletródo de referência. Foi aplicada uma varredura de potenciais entre -1,0 a 1,0 V vs. ECS, a 50 mV s^{-1} , em uma solução aquosa contendo pirrol ($0,1\text{ mol L}^{-1}$) e o eletrólito suporte, LiClO_4 ($0,2\text{ mol L}^{-1}$), durante 10 e 5 ciclos.

A imobilização da urease e do extrato bruto em filmes de PPI foi realizada pelo método da adsorção, onde a urease ($300\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e o extrato bruto ($100\text{ }\mu\text{L}$), foram adicionados juntamente com a solução de polimerização do pirrol. Foi aplicada uma varredura de potenciais entre -1,0 a 1,0 V vs. ECS, a 50 mV s^{-1} , durante 5 e 10 ciclos.

A detecção da uréia foi estudada por meio de medidas de cronoamperometria e cronopotenciometria em uma solução (10 mL) de tampão fosfato ($0,1\text{ mol L}^{-1}$ a pH 7) e uréia como analito em diferentes concentrações. Nas medidas de cronoamperometria, foi aplicado um potencial de -0,28 V e durante as medidas de cronopotenciometria foi aplicada uma corrente de 1 mA. Para tais medidas, utilizou-se um potenciostato/galvanostato EG&G-PAR, modelo 283.

5.2.2 Extração da urease - feijão de porco

A extração da urease foi realizada pela trituração de 25 g de feijão de porco, seguida da agitação por 3 min em um liquidificador com 100 mL de solução tampão $0,1\text{ mol L}^{-1}$ a pH 7 e 2,5 g de polyclar. Filtrou-se a solução que em seguida, foi colocada em um frasco e centrifugado a 4°C e a 15.000 rpm, por 1 hora. Após a centrifugação, foram retiradas alíquotas do sobrenadante, armazenando-as, em seguida, em geladeira⁴⁷.

5.2.3 Determinação da atividade e dos parâmetros cinéticos da urease e do extrato bruto

A atividade da urease e do extrato bruto, bem como os seus parâmetros cinéticos, foram determinados pelo procedimento proposto pela Sigma-Aldrich, que consiste do método titrimétrico.

Inicialmente uma solução de uréia a diferentes concentrações juntamente com uma solução de urease, foram colocadas para reagir por 5 minutos em meio a solução tampão fosfato, pH 7. Após o tempo de reação, esta solução básica, devido à formação de íons NH_3 , foi titulada com HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até o ponto de viragem, da coloração alaranjada para a coloração rosada, em meio ao indicador alaranjado de metila. O volume de HCl gasto na titulação equivale à quantidade de amônia formada na catálise da uréia, pela urease, durante os 5 minutos.

Também foi realizado o branco, mas sem que houvessem decorridos os 5 minutos de reação, ou seja, misturou-se uréia (diferentes concentrações) e urease e, em seguida, titulou-se a solução com HCl. O volume de HCl gasto não variou devido a reação não ter sido decorrida durante os 5 minutos, não havendo tempo necessário para a produção de NH_3^+ .

Dessa forma, tem-se que:

$$V_{HCl} = V_{HCl} - V_{HCl\text{branco}}$$

$$\frac{\text{Unidades}}{mL_{enzima}} = \frac{0,1 \text{ mol L}^{-1} V_{HCl} * (1000) * (df)}{5 \text{ min.} * (0,1 \text{ ml})_{enzima}} \quad (10)$$

Assim, uma unidade de enzima ativa irá liberar $1 \text{ } \mu\text{mol}$ de amônia por minuto e equivalem a 1 I.U. ou 0,054 Summer.

5.2.4 Caracterização por FTIR

As medidas de FTIR foram realizadas no Grupo de Polímeros Bernhard Gross. Utilizou-se um equipamento com Transformada de Fourier e as medidas foram realizadas por reflectância. As medidas de FTIR foram realizadas com um espectrômetro da Thermo Nicolet – Nexus 470/FT-IR de 400 a 2000 cm^{-1} , realizando 32 varreduras nos filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto depositados em Pt

5.2.5 Caracterização por Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Para a realização das medidas de MEV, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura, o Digital Scanning Microscope, DSM 960 da Zeiss West Germany no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do IFSC/USP.

As amostras foram fixadas com fita dupla-face em suportes de Al, recobertas com uma camada de Au de aproximadamente 20 nm de espessura e posicionadas em uma câmara a vácuo para a retirada da umidade. Essa camada de Au deve ser suficientemente fina para que o feixe atinja, sem que haja absorção pela amostra e suficientemente espessa para fazer o contato elétrico e gerar uma imagem. Após as amostras estarem recobertas com a camada condutora e posicionadas no porta-amostra, ele foi levado ao aparelho de MEV.

5.2.6 Caracterização por Microscopia de Força Atômica – AFM

As medidas de AFM foram realizadas no microscópio do IFSC/USP. Para essas medidas os filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto foram eletrodepositados sobre lâminas com filmes de Au, após 10 e 3 ciclos de varredura por voltametria cíclica, conforme descrito no item 5.2.1.

5.2.7 Caracterização por Microbalança de Cristal de Quartzo Eletroquímica - MCQE

As medidas com a MCQE foram realizadas durante a síntese eletroquímica do filme de PPI. Os filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto foram depositados no cristal de quartzo utilizando $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 , $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $200 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ de urease, para o filme de PPI/urease, e $30 \text{ } \mu\text{L}$ de extrato bruto enzimático para o filme de PPI/extrato bruto, por 10 ciclos de varredura. Devido a geometria da célula eletroquímica utilizada na microbalança, o eletrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl.

CAPÍTULO 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados referentes à preparação e caracterização dos filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto. Os parâmetros cinéticos da urease e do extrato bruto, a otimização dos biossensores e o seu comportamento na presença de urease perante diferentes métodos de transdução serão exemplificados e comparados.

6.1 Parâmetros cinéticos

A cinética e a atividade enzimática foram monitoradas por meio de titulação, variando-se o volume de HCl necessário para neutralizar a reação de catálise da uréia pela urease, de acordo com a eq. (10). Este monitoramento foi realizado para diferentes concentrações de uréia.

6.1.1 Urease (enzima livre)

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos a partir do gráfico da velocidade de reação em função da concentração do substrato (uréia), como mostra a Figura 16, a partir de uma concentração fixa de enzima de $0,004 \text{ g ml}^{-1}$. Essa velocidade da reação está intimamente relacionada à atividade enzimática e conseqüentemente, à concentração de amônia liberada por minuto.

Conforme se observa na Figura 16, a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração do substrato até atingir um valor limite (V_{max}) de aproximadamente $1650 \text{ } \mu\text{mol de amônia min}^{-1}$, indicando uma cinética de ordem zero. A partir de então, o aumento da concentração de uréia não afeta mais a velocidade de reação quando ela atinge a metade do seu valor máximo, ou seja, $V = V/2$. Neste caso, a constante de Michaelis-Menten é igual à concentração do substrato ($K_m = S$) e o valor de K_m obtido foi de $0,0029 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 16 - Efeito da concentração de uréia como substrato sobre a velocidade enzimática.

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) também foram obtidos pelo método de Lineweaver-Burk (Figura 17). Foram encontrados os valores de K_m equivalente a $0,0023 \text{ mol L}^{-1}$ e V_{max} de $1628 \text{ μmol de amônia min}^{-1}$ para a enzima livre (não imobilizada). A proximidade dos resultados obtidos para os valores de K_m foram satisfatórios e indicam que a cinética da urease obedece à equação de Michaelis-Menten.

Figura 17 - Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs. o inverso da concentração de uréia para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis – Menten.

6.1.2 Extrato bruto

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} também foram obtidos para o extrato bruto como mostra a Figura 18. As medidas foram realizadas a partir do uso de uma concentração fixa de extrato bruto de 100 μL .

Na Figura 18 pode se observar que a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração do substrato até atingir um valor limite de aproximadamente 1540 μmol de amônia min^{-1} . A partir daí, o aumento da concentração de substrato não afeta mais a velocidade e a constante de Michaelis é igual à concentração do substrato ($K_m = S$). Dessa forma, o valor de K_m obtido foi de 0,003 mol L^{-1} , onde $V = V/2$.

Figura 18 - Efeito da concentração de uréia como substrato sobre a velocidade enzimática.

Os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) também foram analisados no método de Lineweaver-Burk (Figura 19). Foram encontrados os valores de 0,0036 mol L^{-1} para K_m e 1162 μmol de amônia min^{-1} para V_{max} para a urease na forma de extrato bruto. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois se verificou que a urease, como presente no extrato bruto também obedece à equação de Michaelis-Menten.

Figura 19 - Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs. o inverso da concentração de uréia para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis – Menten.

6.1.3 Comparação entre os parâmetros cinéticos: urease e extrato bruto

De acordo com a literatura, a urease extraída do feijão de porco exibe um comportamento de Michaelis-Menten bastante simples. Normalmente, os valores de K_m estão na faixa entre 2,9 e 3,6 mM, como foi mostrado para a urease extraída do feijão de porco¹⁰⁵.

O parâmetro K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato; quanto menor é o seu valor, maior será a afinidade enzima/substrato, o que influencia na sensibilidade do biossensor. Os valores obtidos de K_m são condizentes com a literatura e bastantes semelhantes. Assim, pode-se concluir que tanto a urease em sua forma purificada, quanto o extrato bruto, apresentam afinidades próximas pela uréia e, portanto, há de se esperar que esse não seja um fator que determine que a enzima seja a mais sensível e seletiva. Somente com a complementação com outros resultados, é possível dizer sob qual forma da enzima realmente se alcança uma maior afinidade pelo substrato.

6.2 Otimização dos parâmetros funcionais do biossensor

6.2.1 Resposta dos biossensores em função da concentração da enzima

Um dos parâmetros de otimização do biossensor investigado foi a quantidade de enzima imobilizada que produz uma resposta mais eficiente, ou seja, um maior valor de densidade de corrente.

A fim de se aumentar a eficiência do biossensor é preciso conhecer a quantidade de enzima necessária para o seu melhor funcionamento, já que uma alta quantidade de enzima imobilizada pode causar uma diminuição nas respostas dos biossensores devido à repulsão eletrostática provocada pelas cargas presentes na cadeia da enzima.

O efeito da variação da concentração da urease purificada (comercial) e do extrato bruto nas respostas de corrente dos biossensores foi estudado a partir das curvas amperométricas de filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto em meio a diferentes concentrações de uréia, de acordo com as Figuras 20 e 21.

Na Figura 20 pode-se observar a curva analítica de densidade de corrente vs. concentração de urease para o filme de PPI/urease. Nela se observa um aumento na densidade de corrente catódica com o aumento na concentração de urease usada na imobilização.

Figura 20 - Efeito da concentração da urease, de 0 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7) no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L^{-1} de pirrol e 0,2 mol L^{-1} de LiClO_4 .

A partir da concentração de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de urease, observa-se uma estabilização na densidade de corrente devido à superoxidação do filme de PPI e também ao limite na difusão da uréia para o filme de PPI/urease. Assim, este valor é o limite do valor de concentração a ser utilizado para esse tipo de biossensor, ou seja, a que apresenta um maior valor de densidade de corrente e, conseqüentemente, uma melhor resposta.

Na Figura 21 pode-se observar a curva analítica amperométrica de densidade de corrente vs. volume de extrato bruto para o filme de PPI/extrato bruto. Com o aumento do volume de extrato bruto imobilizado no filme de PPI, há um aumento na densidade de corrente.

Figura 21 - Efeito do volume de extrato bruto de 0 a 200 μL sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), no filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 .

A partir do volume de 100 μL de extrato bruto, ocorreu uma diminuição na densidade de corrente, sendo este valor de volume ideal para ser utilizado nesse tipo de biossensor.

6.2.2 Efeito do pH

O estado de ionização de resíduos de aminoácidos do sítio ativo reflete no pH ótimo de uma enzima devido à presença de cadeias laterais desses aminoácidos atuando como ácidos ou bases fracas, impedindo, portanto, o desempenho funcional da enzima. Esses grupos devem permanecer em um estado adequado para manter a conformação do sítio ativo²⁹.

As enzimas se encontram parcialmente desnaturadas em valores de pHs distantes do pH ótimo, ou seja, apresentam uma atividade máxima em determinada faixa de pH. O pH do meio usado nas medidas de detecção de uréia a partir de filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto foi variado a partir do uso de uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; o efeito provocado pelos diferentes valores de pH na densidade de corrente pode ser observado nas Figuras 22 e 23.

Figura 22 - Efeito do pH sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol, 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de urease e 0,2 mol L⁻¹ de LiClO₄.

O valor máximo da densidade de corrente durante a detecção de uréia foi a pH 7,0 e, portanto, este é o valor de pH ótimo para a urease. Acima deste pH, a enzima é desnaturada devido à desprotonação no sítio ativo. Em pH inferior a 7,0, a urease também pode estar desnaturada e, assim, reduzir a atividade enzimática.

Este valor está condizente com trabalhos publicados sobre a imobilização da urease em filmes de PPI^{106,110}.

Na Figura 23 é possível se observar que o máximo de densidade de corrente durante a detecção de uréia em filmes de PPI/extrato bruto foi a pH 7,0. Acima ou abaixo deste pH, a enzima é desnaturada devido à desprotonação no sítio ativo.

Figura 23 - Efeito do pH sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7), o filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol, 100 μL de extrato bruto e 0,2 mol L⁻¹ de LiClO₄.

Dessa forma, uma solução de tampão fosfato, 0,1 mol L⁻¹, a pH 7,0, foi considerada a ideal para ser usada em todas as etapas de sínteses deste trabalho.

6.2.3 Efeito da temperatura

Como as enzimas são agentes catalisadores, as suas reações, bem como a sua atividade catalítica dependem da temperatura, já que um aumento na temperatura implica em um aumento na velocidade da reação. Além disto, altas temperaturas podem provocar desnaturação da enzima, o que pode acarretar na desaceleração da velocidade de reação¹⁰⁷ e, conseqüentemente, mau desempenho dos biossensores enzimáticos. Como toda enzima possui uma temperatura ótima para que seja alcançado o máximo de atividade catalítica em um longo período de tempo, este parâmetro é de extrema importância na caracterização e confecção dos

biossensores.

O efeito da temperatura nos filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto sobre o desempenho do biossensor foi investigado e é ilustrado nas Figuras 24 e 25.

Figura 24 - Efeito da temperatura sobre a resposta amperométrica para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7), no filme de PPI/urease eletrossintetizado em uma solução de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ de urease e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 .

Em geral, com o aumento da temperatura, há um aumento na velocidade da reação e consequentemente, da resposta do biossensor. No entanto, para temperaturas acima da ideal, a enzima pode ser desnaturada e esse comportamento pode ser observado na Figura 24, onde o filme de PPI/urease apresenta uma resposta amperométrica de maior densidade de corrente entre 35°C e 40°C semelhante ao relato de outros trabalhos da literatura^{106,108}. Assim, a temperatura entre 35°C e 40°C é a ideal para se trabalhar com a urease e se obter um biossensor mais eficiente.

O efeito da temperatura no filme de PPI/extrato bruto sobre o desempenho do biossensor foi investigado e pode ser visto na Figura 25.

Figura 25 - Efeito da temperatura sobre a resposta amperométrica, para uma concentração fixa de uréia de 50 mmol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7), no filme de PPI/extrato bruto eletrossintetizado em uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de pirrol, 100 μL de extrato bruto e 0,2 mol L⁻¹ de LiClO₄.

Observa-se que, com o aumento da temperatura, ocorre um aumento na densidade de corrente, ou seja, a resposta do biossensor torna-se mais eficiente com a temperatura até 35°C, equivalente à temperatura ótima de funcionalidade do biossensor com extrato bruto. A partir dessa temperatura, a enzima na forma de extrato bruto tende a perder sua atividade catalítica, consequentemente, a eficiência do biossensor começa a ser comprometida. Dessa forma, a temperatura em torno dos 35°C é a ideal para a construção dos biossensores estudados neste trabalho, pois promove a máxima atividade catalítica da urease. Tanto para a urease purificada quanto para o extrato bruto, essa faixa de temperatura é a ideal para o emprego do biossensor.

6.3 Síntese e resposta eletroquímica dos filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto

Os filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto foram preparados pela técnica da voltametria cíclica em uma solução aquosa contendo pirrol e LiClO₄, na ausência e presença de urease e extrato bruto. As sínteses foram realizadas até serem atingidos 10 ciclos

completos, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os últimos ciclos voltamétricos obtidos durante o preparo dos filmes podem ser vistos na Figura 26A.

Os voltamogramas cíclicos obtidos durante as sínteses eletroquímicas dos filmes de PPI em presença de urease purificada e de extrato bruto apresentaram uma maior densidade de corrente (Figuras 26A (a) e 26A (c)) se comparados aos voltamogramas cíclicos do eletrodo em meio a pirrol, na ausência da enzima (Figura 26A (a)).

Após 10 ciclos, as cargas finais obtidas durante a preparação dos filmes PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto foram de $27,8 \text{ mC cm}^{-2}$, $31,4 \text{ mC cm}^{-2}$ e $33,9 \text{ mC cm}^{-2}$, respectivamente. Estes resultados indicam que filmes mais espessos e mais eletroativos foram obtidos com a incorporação da enzima.

As respostas voltamétricas dos filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto em uma solução livre de monômero podem ser observadas na Figura 26B.

O filme de PPI apresenta um comportamento redox típico do PPI em meio aquoso como tem sido descrito na literatura⁹⁸. Os processos redox apresentados para o filme de PPI foram em $0,45 \text{ V}$, $0,0 \text{ V}$ e $-0,62 \text{ V vs. ECS}$, os quais dão lugar a pares redox bem definidos em $-0,27 \text{ V}$ e $-0,60 \text{ V vs ECS}$, referentes aos processos redox do filme na presença da urease (Figura 26B (a) e (b)).

A resposta voltamétrica do filme de PPI/extrato bruto foi obtida em uma solução livre de monômero como mostra a Figura 26B (c). Nela observa-se que quando há imobilização do extrato bruto na matriz de PPI, os processos redox observados em $0,45 \text{ V}$, $0,0 \text{ V}$ e $-0,62 \text{ V vs. ECS}$ referentes ao filme de PPI dão origem a processos redox em $-0,28 \text{ V}$ e $-0,62 \text{ V vs ECS}$, em potenciais mais negativos.

A natureza eletroativa de urease já foi descrita em dois casos, quando adsorvida em Hg ¹⁰⁹ e imobilizada em filmes de PPI¹¹⁰. Neste último caso, os filmes foram preparados por polimerização galvanostática de pirrol sobre eletrodos de Au. Neste caso, observou-se uma contribuição da matriz PPI à resposta eletroquímica do filme com a enzima, diferentemente do que se verificou aqui, onde apenas a urease e o extrato bruto contribuíram para a definição da resposta eletroativa do filme.

Figura 26 - Voltametrias cíclicas dos eletrodos de Pt durante: (A) síntese dos filmes de PPI (a), PPI/urease (b) e PPI/extrato bruto (c), em uma solução aquosa contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pirrol e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 ; (B) resposta eletroquímica dos filmes de PPI (—), PPI/urease (—) e PPI/extrato bruto (—) em uma solução aquosa contendo tampão fosfato a pH 7.

Com estes resultados, pode-se concluir que tanto a presença da urease, quanto do extrato bruto, favorecem o processo de oxidação catalítica, com os valores de densidade de corrente aumentando linearmente com o número de ciclos até o final da síntese, conforme Figura 27. No caso da eletropolimerização do pirrol sem a presença da enzima, a densidade de corrente atinge valores quase constantes depois de alguns ciclos, precisamente após 7 ciclos, o que indica um processo de crescimento mais lento e a formação de um filme mais fino.

Figura 27 - Gráfico de densidade de corrente com o número de ciclos durante a síntese dos filmes de (a) PPI e (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto.

Pode-se concluir que tanto o filme de PPI/urease quanto o filme de PPI/extrato bruto apresentaram comportamentos eletroquímicos semelhantes. A resposta do extrato bruto apresentou uma densidade de corrente máxima durante a síntese, equivalente a $14 \mu\text{A cm}^{-2}$, enquanto que a densidade máxima de corrente apresentada durante a imobilização da urease, foi de $12 \mu\text{A cm}^{-2}$. As respostas eletroquímicas tanto do filme de PPI/urease quanto do de PPI/extrato bruto foram semelhantes, com apenas um pequeno deslocamento do pico catódico do filme de PPI/extrato bruto para potenciais um pouco mais negativos. Essas pequenas diferenças podem ser atribuídas ao extrato bruto possuir agregados de proteínas em sua composição, o que contribui para tais processos. Dessa forma, pode-se dizer que a urease purificada e a urease na forma de extrato bruto favorecem o processo redox durante a síntese do PPI e isso comprova a imobilização enzimática de ambos os tipos de enzimas, apesar do extrato bruto contribuir mais para os processos redox durante a imobilização devido à sua maior eletroatividade.

6.4 Determinação do potencial ótimo da enzima

A partir da análise do comportamento redox dos filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto foi possível determinar o potencial ótimo de ativação da urease e do extrato bruto pela resposta eletroquímica dos filmes em meio a tampão e à diferentes concentrações de uréia.

Analisando-se o comportamento redox do filme de PPI/urease em meio à solução tampão, observou-se a presença dos processos redox em -0,27 V e -0,60 V *vs.* ECS (Figura 26B (a)). A partir daí, comparou-se com a resposta eletroquímica do filme de PPI/urease na presença de uréia, a fim de se verificar possíveis modificações desses pares redox provocados pela presença da uréia.

Observou-se um deslocamento do pico de oxidação de -0,27 V *vs.* ECS para um potencial mais negativo, por volta de -0,32 V *vs.* ECS ao final da adição de diferentes concentrações de uréia. Assim, verificou-se que o processo catalítico da urease ocorre ao redor de -0.32 V *vs.* ECS, quando em meio a uréia (Figura 28A).

A curva analítica de densidade de corrente do pico de oxidação em função da concentração de uréia pode ser vista na (Figura 28B), de 10^{-6} mol L⁻¹ a 10^{-2} mol L⁻¹, adicionada a cada ciclo. Verificou-se que houve um aumento linear na densidade de corrente do pico catódico, com a concentração de uréia, porém, com uma sensibilidade de 0,0869 μ A cm⁻².

Figura 28 - Respostas eletroqumicas dos filmes de PPI/urease (A) e PPI/extrato bruto (C) em uma soluo aquosa contendo tampo fosfato a pH 7 e soluo de uria em diferentes concentraes; curvas analticas de densidade de corrente vs. concentrao de uria para os filmes de PPI/urease (B) e PPI/extrato bruto (D).

Em relao ao filme de PPI/extrato bruto, o processo redox em -0,28 V vs. ECS. referente ao processo redox do extrato bruto (Figura 28C) foi deslocado para potenciais mais negativos, em -0,36 V vs. ECS, ao final da adio de diferentes concentraes de uria por ciclo. Neste caso, tambm foi construda a curva analtica de densidade de corrente do pico de oxidao em funo da concentrao de uria (Figura 28D), de 10^{-6} mol L^{-1} a 10^{-2} mol L^{-1} , adicionada a cada ciclo, e que provocou um aumento linear na densidade de corrente do pico catdico com a concentrao de uria, apresentando uma sensibilidade de $0,04775 \mu\text{A cm}^{-2}$.

Dessa forma, o filme de PPI/urease apresentou uma resposta de corrente mais alta,

devido à sua maior sensibilidade durante esse estudo de detecção, que equivale à $0,0869 \mu\text{A cm}^{-2}$, ou seja, 58% de diferença percentual em relação ao filme de PPI/extrato bruto.

6.5 FTIR

A primeira análise feita para caracterizar os filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto foi por FTIR. O espectro do IV mostrado na Figura 29A apresenta as bandas características do PPI, como os estiramentos em 1688 cm^{-1} das ligações C=C do anel do pirrol, 1542 cm^{-1} das ligações C-C e C-N do anel do pirrol, deformação da ligação C-N correspondente ao estiramento do anel pirrol em 1152 cm^{-1} , de acordo com Tabela 3, indicando portanto, a estrutura do PPI.

Os espectros do IV mostrados nas Figuras 29B e 29C apresentam as bandas características da urease (purificada e extrato bruto), como os estiramentos de C=O de amida I, deformação N-H de amida II, estiramento C-N e N-H de amida III, estiramento da ligação N-H em amida IV, estiramento da ligação N-H em amida VI e deformação de C-H de grupos CH_2 , de acordo com o insert da Figura 29A, do espectro da urease.

Bandas referentes à amida I e amida II são características de proteínas e polipeptídeos. A absorção associada com a banda amida I leva à vibrações de estiramento da ligação C=O e a da amida II, leva principalmente às vibrações de flexão da ligação N-H. Assim, os estiramentos, C=O e N-H, estão envolvidos na ligação de hidrogênio que ocorre entre os diferentes elementos da estrutura secundária. Uma dificuldade em analisar as bandas de amida I em estruturas secundárias é que seu deslocamento é pequeno quando comparado à largura intrínseca da banda, pois em vez de uma série de picos bem resolvidos para cada tipo de estrutura secundária, há uma gama de picos irregulares são observados¹¹¹.

As frequências apresentadas nos espectros de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto foram comparadas entre si e com dados da literatura (Tabelas 3 e 4).

Os espectros de IV dos filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto apresentam bandas mais intensas se comparados ao espectro do PPI. Isso se deve à sobreposição de bandas na mesma região ocorridas em ambos os espectros, pois os grupos N-H e C-N estão presentes tanto na estrutura do PPI quanto em estruturas de proteínas, como é o caso da urease e do extrato bruto. O indício da presença das bandas características das estruturas enzimáticas e as suas sobreposições devido ao aumento da % de reflectância indicam que a urease em ambas

as formas, purificada e extrato bruto, podem estar imobilizadas no filme de PPI. Essas bandas sobrepostas e deslocadas para maiores números de ondas são as de deformação de C-H de grupos CH_2 , de deformação N-H de amida II e as de estiramento da ligação N-H em amida VI.

Ainda, como a urease e qualquer outra proteína possuem cargas negativas e positivas em sua superfície, devido à presença de grupos de aminoácidos em suas extremidades de NH_3^+ e COO^- , ela se adsorve na superfície do PPI que, por sua vez, possui cargas positivas. Dessa forma, essa adsorção pode estar promovendo modificações nas ligações do tipo C-C e C-N do anel de pirrol devido ao deslocamento para maiores números de ondas das bandas em 1542 cm^{-1} para 1546 cm^{-1} e 1579 cm^{-1} para a urease purificada e extrato bruto, respectivamente, e da banda em 1152 cm^{-1} para 1156 cm^{-1} no espectro da urease purificada.

Figura 29 - Espectros de FTIR para os filmes de (A) PPI, (B) PPI/urease e (C) PPI/extrato bruto sintetizados sobre Pt.

Tabela 3 - Atribuições das frequências de FTIR para o filme de PPI.

Frequência das bandas de PPI (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência ¹¹²⁻¹¹³
1688	Estiramento da ligação C=C do anel de pirrol	1690
1458 e 538	Vibrações típicas do anel de polipirrol	1463 e 543
1542	Estiramento das ligações C-C e C-N do pirrol e 2,5-substituídos pirrol	1546-1543 cm ⁻¹
1293 e 1152	Estiramento da ligação =C-H no plano	1296 e 1170
1152	Deformação da ligação C-N correspondente ao estiramento do anel pirrol	1154-1149 cm ⁻¹
1082 e 773	Estiramento da ligação =C-H fora do plano	1088 e 783
970	Estiramento fora do plano da ligação = C-H indicando a polimerização do pirrol	966-968 cm ⁻¹
913	Deformação vibracional da ligação C-H no plano e fora do plano.	913 - 908 cm ⁻¹

Tabela 4 - Atribuições das frequências de FTIR para os filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto.

Frequência das bandas de urease (literatura) (cm ⁻¹)	Frequência das bandas de extrato bruto (cm ⁻¹)	Frequência das bandas de urease comercial (cm ⁻¹)	Atribuições	Referência ¹¹⁴
1629	1609/1626	1663	C = O de amida I	1700-1600
1546	1579	1544	Deformação N-H de amida II	~1550-1500
	1237	1305	Estiramento C-N e N-H de amida III	1320-1200
709	697		Estiramento da ligação N-H em amida IV	700-600
			Estiramento fora do plano da ligação N-H em amida V	~730
	537	536	Estiramento da ligação N-H em amida VI	~600
1460	1469	1463	Deformação de C-H de grupos CH ₂	1450-1340

6.6 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

Os filmes de PPI apresentam uma estrutura típica do tipo “cauliflower” quando sintetizados em meio a ClO_4^- ¹¹⁵⁻¹¹⁶. Essa é uma estrutura globular, não uniforme e sem nenhuma orientação¹¹⁷⁻¹¹⁸. Na imagem do filme de PPI (Figura 30A), com um aumento de 10.000x, observa-se esse tipo de morfologia, que é típica do filme de PPI.

De acordo com a literatura, a imagem de MEV do filme de PPI, eletrossintetizado eletroquimicamente, apresenta várias morfologias e dependendo da densidade de corrente utilizada; há a do tipo esferóide e também uma morfologia mais cristalina do tipo agulhas¹¹⁹.

Quando preparados eletroquimicamente, sob diferentes potenciais no estado oxidado, os filmes de PPI apresentam uma morfologia com grãos de diâmetros microesféricos, ou seja, uma estrutura do tipo “cauliflower”, com pequenos grãos e outros grãos menores, em escala nanométrica¹²⁰.

Após a imobilização da urease, é possível se observar nas imagens, de resolução de 5.000x e 10.000x, respectivamente, do filme de PPI/urease (Figuras 30 B e 30 C) a presença de esferas distribuídas homogeneamente pela superfície do filme, que podem caracterizar uma morfologia diferente pela presença da enzima imobilizada, com um tamanho de 0,5 μm . Pode-se observar ainda que, após a imobilização, o filme se tornou mais plano, alterando a morfologia “cauliflower”. Isso se deve ao aumento do volume do filme pelo preenchimento das cavidades entre os glóbulos com a enzima, o que o tornou mais rugoso, comprovando assim, a modificação da superfície com a presença da enzima imobilizada.

Na literatura foi apresentada uma imagem de microscopia de filmes de PPI/urease e se propôs que a imobilização era comprovada pela mudança na morfologia, causada por mudanças no tamanho dos núcleos do PPI¹¹⁰. No presente trabalho, a presença da urease provocou um aumento no tamanho dos grânulos do filme de PPI e a presença de pequenas esferas fez com que aumentasse a rugosidade do filme.

Após a imobilização do extrato bruto no filme de PPI, é possível se observar uma imagem do filme de PPI/extrato bruto, de resolução de 5.000x e 10.000x nas Figuras 30 D e 30 E, respectivamente. Essa microscopia mostra a morfologia típica do PPI, “cauliflower” (Figura 30 D), e também esferas ou grânulos distribuídos pela superfície do filme (Figura 30 E), que podem caracterizar uma segunda morfologia devido à presença do extrato bruto imobilizado, com um tamanho de 1,0 μm .

Como ocorreu durante a imobilização da urease, pode-se observar que a morfologia típica do PPI foi alterada dando lugar a um filme menos plano.

Figura 30 - Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de (A) PPI com um aumento de 10.000x, (B) e (C), PPI/urease e (D) e (E), PPI/extrato bruto com aumento de 5000x e (c) 10.000x, respectivamente.

6.7 Microscopia de força atômica – AFM

Os filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto foram estudados por AFM e as suas morfologias foram investigadas utilizando o modo “tapping-mode” (Figura 31).

Figura 31 - Imagens de microscopia de força atômica dos filmes sintetizados com 3 ciclos de : (A) PPI; (B) PPI/extrato bruto, (C) PPI/urease e dos filmes sintetizados com 10 ciclos: (D) PPI, (E) PPI/extrato bruto (F) PPI/urease.

Nas imagens da Figura 31, as regiões mais escuras correspondem aos “vales”: quanto mais clara for a região, maior é a altura do ponto observado, que corresponde ao máximo do eixo Z.

Como mostrado nas Figuras 31 A e 31 D, a morfologia do filme de PPI

eletrossintetizado em meio ao ânion ClO_4^- é do tipo globular, a qual parece sugerir que um crescimento restrito do polímero em certas direções preferenciais⁹⁸.

De acordo com a literatura, há trabalhos que mostram imagens de AFM de filmes de PPI com uma espessura de 100, 500, 1000 nm e acima de 4000 nm. Com uma espessura de 100 nm, a morfologia do filme de PPI é independente da natureza do dopante. Nos outros casos, há a presença de partículas globulares ordenadas de PPI. Assim, a influência do ânion se dá com o aumento da espessura, a partir de 100 nm, quando há modificações na superfície globular, tornando-a mais rugosa. Esse efeito é claramente observado na presença de ClO_4^- , que provoca a formação de uma morfologia conhecida como “cauliflower”, bastante rugosa e com um aumento na altura e diâmetro dos glóbulos, onde um crescimento vertical é preferencial. O ânion ClO_4^- quando dopante em filmes de PPI de espessura entre 80, 450, 990 e 8200 nm, leva valores de rugosidades entre 9,5, 16,3, 22,2 e 24,9 nm, respectivamente¹²¹⁻¹²². Dessa forma, o tamanho e a forma do ânion dopante tem um papel fundamental na construção da conformação do pirrol, oligômeros e na estrutura do polímero¹²³.

No estado reduzido do PPI, o aumento da rugosidade pode ser resultado do aumento do volume, o qual pode ser atribuído à entrada do ânion na superfície do filme de PPI. No estado oxidado, a força de interação entre as cadeias vizinhas resulta em uma compacta estrutura polimérica. Com o avanço da oxidação, seguida da entrada de ânions na matriz polimérica, as forças atrativas são substituídas por fortes forças coulombianas entre os pólarons emergentes e isso leva ao aumento da distância entre as cadeias poliméricas, aumentando o volume do filme. Ainda foi relatado que a presença de poros melhora a condutividade iônica. Por outro lado, a presença de ânions volumosos não é o único fator que contribui para o aumento da rugosidade, ou seja, a espessura da superfície também contribui. Filmes mais espessos são mais rugosos¹²⁴.

Pode-se observar nas Figuras 31 C e 31 F as imagens dos filmes de PPI/urease sintetizados com 3 e 10 ciclos, respectivamente. Comparando-se com as imagens do PPI das Figuras 31 A e 31 D, também sintetizado com 3 e 10 ciclos, observa-se que o filme de PPI/urease apresenta semelhanças com o filme de PPI. Isso se deve à presença da morfologia do tipo globular, que é típica de filmes de PPI, e de uma alta rugosidade, como mencionada anteriormente.

Com a presença da urease, ocorreu um aumento na rugosidade do filme quando sintetizado com 10 ciclos de varredura, que pode estar relacionado ao aumento do volume provocado pela repulsão entre as cadeias poliméricas devido a inserção da urease adsorvida no filme de PPI.

O filme de PPI/urease sintetizado com 3 ciclos apresentou uma rugosidade inferior ao sintetizado com 10 ciclos, pois a espessura do filme influencia a rugosidade. Os valores da rugosidade podem ser comparados na Tabela 5:

Tabela 5 - Valores da rugosidade Rms (nm) para os filmes de PPI e PPI/urease.

Filmes	Rugosidade - Rms (nm)
PPI - 10 ciclos	333
PPI - 3 ciclos	261
PPI/urease 10 ciclos	437
PPI/urease 3 ciclos	264

Pode-se observar nas Figuras 31B e 31E as imagens dos filmes de PPI/extrato bruto sintetizados com 3 e 10 ciclos. O filme de PPI/extrato bruto também apresentou uma morfologia globular, típica de filmes de PPI. Por sua vez, a rugosidade do filme PPI/extrato bruto é superior, o que favoreceu pelo aumento do volume da cadeia polimérica. Os filmes sintetizados com 10 ciclos são mais rugosos por serem mais espessos e conterem maior número de íons dopantes e cadeias poliméricas. Os valores da rugosidade podem ser comparados na Tabela 6:

Tabela 6 - Valores da rugosidade Rms (nm) para os filmes de PPI e PPI/extrato bruto.

Filmes	Rugosidade - Rms (nm)
PPI – 10 ciclos	333
PPI - 3 ciclos	261
PPI/extrato bruto 10 ciclos	545
PPI/extrato bruto 3 ciclos	274

Dessa forma, a adsorção física, tanto da urease, quanto do extrato bruto, pode estar levando à repulsão entre as cadeias poliméricas ou, ainda, à interação entre os pólarons do

PPI, fazendo com que aumente o volume da cadeia polimérica provocando um aumento no volume dos filmes.

A rugosidade dos filmes de PPI/extrato bruto foi maior do que a do filme de PPI/urease, de acordo com as Tabelas 3 e 4. Isso pode ser explicado devido à presença de impurezas contidas no extrato bruto e à outras formas iônicas em sua constituição, fazendo com que um maior número de moléculas contribuísse para a repulsão das cadeias poliméricas.

6.8 Microbalança de cristal de quartzo eletroquímica - MCQE

Nesta seção, serão descritos os resultados obtidos a partir do uso da técnica de eletrogravimetria. Nas Figuras 32 A e 32 B são apresentadas as curvas de variação de massa e frequência *vs* potencial, respectivamente, obtidas durante a síntese do filme de PPI, a uma varredura do potencial de 0,0 a 0,8V *vs*. ECS.

Observa-se, na Figura 32 A, uma grande variação de frequência nos ciclos iniciais durante a síntese do filme de PPI. Isso é causado por um crescimento lento do filme de PPI, que se estabiliza a partir do sétimo ciclo devido ao maior consumo de monômero em solução. O polímero passa a apresentar um crescimento mais significativo com o tempo, fazendo com que o cristal passe a ter sua vibração diminuída. A partir da eq.(9), foi possível converter essa variação de frequência em variação de massa ocorrida na superfície do eletrodo.

Esta variação de frequência observada está relacionada ao aumento de massa depositada sobre o eletrodo, para cada ciclo, provocada pelo aumento da cadeia polimérica, (Figura 32B)

Figura 32 - Curvas eletrogravimétricas na forma de (a) frequência *vs.* potencial e (b) Δm *vs.* potencial, durante o processo de formação do filme de PPI sobre eletrodos de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 , $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

De acordo com a literatura, as variações de massa podem ser atribuídas à entrada e saída de íons do eletrólito suporte¹²⁵, ClO_4^- , no filme. Durante a eletropolimerização do pirrol, há a formação de cargas positivas na cadeia polimérica, denominadas pólarons e bipólarons,

que são compensadas pela incorporação de ânions (ClO_4^-) da solução eletrolítica. Com os sucessivos ciclos, o ganho de massa do eletrodo tende a aumentar pelo aumento da espessura do filme, tendo início a 0,6 V *vs.* AgCl. Este é o comportamento esperado para o processo de formação de filmes de PPI quando analisado por medidas de MCQE¹²⁶. Ao final, o eletrodo teve um ganho de massa de $3,43 \mu\text{g cm}^{-2}$, valor superior ao da literatura para uma deposição de PPI/heparina, que teve um ganho de massa equivalente a $1,73 \mu\text{g}^{127}$.

Nas Figuras 33A e 33B são apresentadas as curvas eletrogravimétricas obtidas durante a síntese dos filmes de PPI/urease. O filme de PPI/urease apresentou um crescimento mais rápido nos ciclos iniciais, seguido de um decréscimo a partir do quinto ciclo. Esse comportamento pode ser observado nas curvas de variação de frequência *vs.* potencial da Figura 35 (b), elucidado pela alta variação de frequência dos ciclos iniciais. Esse ganho de massa pode ser atribuído conjuntamente ao processo de dopagem do filme de PPI devido à entrada de íons do eletrólito suporte.

Desta maneira, ocorreu a formação do filme de PPI e a imobilização da urease no cristal de quartzo, acarretando um aumento de massa no eletrodo de Au, com um ganho de massa de $5 \mu\text{g cm}^{-2}$.

Figura 33 - Curvas eletrogravimétricas na forma de: (A) frequência *vs.* potencial e (B) Δm *vs.* potencial, durante o processo de formação do filme de PPI/urease sobre eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 , $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol e $200 \mu\text{g/mL}$ de urease e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Nas Figuras 34A e 34B são apresentadas as curvas eletrogravimétricas obtidas durante a síntese dos filmes de PPI/extrato bruto. Nelas, observa-se um pequeno aumento de massa nos ciclos iniciais de síntese, seguido de um decréscimo a partir do sexto ciclo (Figura 35 (c)), que caracteriza a formação do filme de PPI e a imobilização do extrato bruto no eletrodo de Au.

Esse ganho de massa também pode ser atribuído à entrada e saída de eletrólito suporte (ClO_4^-) no filme¹²⁵ e à adsorção do extrato bruto ao filme de PPI. Ao final da eletrodeposição,

o eletrodo de PPI/extrato bruto obteve um ganho de massa equivalente a $3,96 \mu\text{g cm}^{-2}$.

Figura 34 - Curvas eletrogravimétricas na forma de: (a) frequência vs potencial e (b) Δm vs potencial, durante o processo de formação do filme de PPI/extrato bruto sobre eletrodo de Au em cristal de quartzo, em meio de uma solução aquosa de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de LiClO_4 , $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol e $30 \mu\text{L}$ de extrato bruto de urease e $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

6.8.1 Comparação entre as medidas de MCQE para urease e para o extrato bruto

A Figura 35 mostra as curvas de variação de massa em função do número de ciclos para os filmes de PPI, PPI/ urease e PPI/extrato bruto.

O filme de PPI/urease teve um ganho de massa, até o quarto ciclo, de $5\mu\text{g cm}^{-2}$. Subtraindo a massa de PPI, equivalente a $3,43\mu\text{g cm}^{-2}$, pode-se prever que a quantidade de urease imobilizada no filme de PPI foi de $1,57\mu\text{g cm}^{-2}$

Para o filme de PPI/extrato bruto, houve um ganho de massa equivalente a $3,96\mu\text{g cm}^{-2}$, que decaiu a partir do sexto ciclo de crescimento. Como consequência dos $3,43\mu\text{g cm}^{-2}$ de massa para o filme de PPI, pode-se prever que a quantidade de extrato bruto imobilizado no filme de PPI foi de $0,53\mu\text{g cm}^{-2}$. O valor de massa total do filme de PPI/extrato bruto corresponde à massa não somente da enzima, mas também de proteínas e outros componentes biológicos. Neste caso, pode-se concluir que não apenas a urease está imobilizada no filme de PPI, mas também os outros constituintes do extrato bruto que não foram purificados.

Figura 35 - Curvas de Δm vs número de ciclos para os filmes de (a) PPI, (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto, sintetizados sobre o eletrodo de Au em cristal de quartzo.

Era de se esperar que a urease fosse mais eficiente durante a imobilização enzimática em filmes de PPI, isso pode ser explicado devido ao ganho de massa obtido nas medidas de MCQE, que foi maior em relação ao ganho de massa do extrato bruto. Porém, o extrato bruto se mostrou mais estável pelo constante aumento de massa, com o número de ciclos, até o quinto ciclo da síntese.

6.9 Uso dos biossensores para a detecção de uréia

Os eletrodos modificados PPI/urease e PPI/extrato bruto foram utilizados para a detecção de uréia por meio de cronoamperometria e cronopotenciometria. A partir dos valores de limite de detecção (LD) e limite quantificação (LQ), foi possível se presumir qual método de transdução é mais adequado ao sistema para se detectar uréia.

Inicialmente, os eletrodos PPI/urease e PPI/extrato bruto foram utilizados em um teste de detecção, que teve como objetivo demonstrar realmente se a resposta do biossensor era referente ao processo de catálise enzimática. Para isto, foram comparados os valores de densidade de corrente para os dois eletrodos, PPI/urease e PPI/extrato bruto e para o filme de PPI sem a presença de urease e extrato bruto imobilizados.

Observa-se, nas Figuras 36 (b) e 36 (c), que para ambos os eletrodos com a urease imobilizada (purificada e extrato bruto), há uma variação significativa de densidade de corrente com a concentração de uréia, que se estabiliza acima de $0,003 \text{ mol L}^{-1}$ até a saturação dos sítios ativos da enzima.

Figura 36 - Curvas analíticas obtidas a partir das respostas amperométricas durante a detecção de uréia a diferentes concentrações no eletrodo de: (a) PPI, (b) PPI/urease e (c) PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia .

O mesmo procedimento foi adotado para o filme de PPI (Figura 36 (a)) sem a presença

da urease imobilizada, sendo que, neste caso, não foram observadas mudanças significativas nos valores de densidade de corrente com a concentração de uréia, muito pelo contrário, uma diminuição das mesmas. Dessa forma, pode-se comprovar que as respostas de densidade de corrente se devem às atividades dos eletrodos PPI/urease e PPI/extrato bruto pela presença das enzimas imobilizadas, que são responsáveis pelas reações catalíticas, e não aos processos redox típicos da matriz de PPI.

6.10 Limite de detecção

Inicialmente, foi obtido o limite mínimo de detecção dos biossensores de PPI/urease e PPI/extrato bruto, a partir de medidas cronoamperométricas para $300\mu\text{g mL}^{-1}$ de urease e $100\mu\text{L}$ de extrato bruto, respectivamente, variando-se a concentração de uma solução de uréia (Figura 37).

Figura 37 - Curva analítica obtidas a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia no eletrodo de (A) PPI/urease e (B) PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia .

A Figura 37 mostra as curvas analítica contendo os valores de densidade de corrente em relação ao logaritmo da concentração de uréia para os eletrodos de PPI/urease e PPI/extrato bruto.

O primeiro sinal de corrente do filme de PPI/urease foi a partir de uma concentração de 10^{-7} mol L⁻¹ de uréia, que aumentou mais rapidamente até um valor de 10^{-4} mol L⁻¹ e estabilizou-se para as demais concentrações. Portanto, este biossensor apresentou uma linearidade crescente de resposta entre 10^{-7} e 10^{-2} mol L⁻¹ de uréia.

No caso do filme de PPI/extrato bruto, a resposta foi semelhante à obtida para o filme de PPI/urease dentro de uma margem de erro esperada entre as medidas. No entanto, a resposta de corrente decaiu bruscamente a partir de 10^{-2} mol L⁻¹ de uréia.

6.11 Uso do eletrodo de PPI/urease como biossensor para a detecção de uréia

O eletrodo de PPI/urease foi empregado como biossensor para detecção de uréia, utilizando-se a cronoamperometria e a cronopotenciometria como métodos de transdução em uma concentração de ordem de milimolar de analito durante a detecção. Também foram calculados os limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), segundo a IUPAC:

$$LD = \frac{3 \times SD}{\text{inclinação}} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10 \times SD}{\text{inclinação}} \quad (9)$$

Os resultados obtidos pela técnica de cronoamperometria, após se aplicar um potencial de -0,28 V vs. ECS nos filmes de PPI/urease para a detecção de uréia podem ser vistos na Figura 38.

Figura 38 - Curva analítica obtida a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008 mol L⁻¹) no eletrodo de PPI/urease em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.

Como o filme de PPI está em contato direto com a urease, a interface PPI/urease tende a ser recoberta pelas espécies NH_3^+ formadas durante a reação enzimática em presença de uréia, pois a amônia é um sub-produto da reação de hidrólise da uréia e pode ser quantificada pelo aumento na densidade de corrente com a variação da concentração de uréia.

Para o filme de PPI/urease, o aumento na densidade de corrente se mostra linear até uma concentração de uréia de 0,002 mol L⁻¹; acima deste valor, a reação de hidrólise da uréia se tornou menos eficiente devido aos processos oxidativos que ocorrem na superfície do eletrodo enzimático e, neste caso, pode estar ocorrendo uma saturação da urease pela ocupação de seus sítios disponíveis no filme para a uréia. Sendo assim, este processo define uma cinética de ordem zero, quando a concentração de uréia já não interfere tanto na detecção. A partir daí, ocorre uma estabilização no processo para uma concentração de uréia acima de 0,005 mol L⁻¹ e já não há interferência na detecção, predominando uma densidade de corrente constante com o tempo.

A Figura 39 mostra a resposta cronopotenciométrica do filme de PPI/urease obtida a uma corrente constante aplicada de 1 mA.

Figura 39 - Curva analítica obtida a partir das respostas potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0,0 a 0,006 mol L⁻¹) no eletrodo de PPI/urease em uma solução tampão fosfato a pH 7.

Da mesma forma que a detecção amperométrica, amônia também está sendo formada na superfície do eletrodo durante a catálise enzimática e ela pode ser quantificada pelo aumento do potencial com a concentração de uréia.

Na Figura 39, pode-se observar uma linearidade da resposta de potencial até 0,003 mol L⁻¹ de uréia; acima deste valor, ocorre a saturação dos sítios ativos da urease e, então, define-se uma cinética de ordem zero. Para uma concentração de uréia acima de 0,004 mol L⁻¹, o potencial passa a ser constante com o tempo, que se justifica pela possível presença de incrustações na superfície do eletrodo pelos produtos da reação e pela saturação dos sítios ativos da urease.

As respostas dos dois eletrodos perante diferentes métodos de transdução são similares exceto pela inclinação das curvas a baixas concentrações de uréia e estabilização do valor do potencial a partir da concentração de 0,005 mol L⁻¹.

Quando são comparados os valores do limite de quantificação (LQ) e do limite de detecção (LD), o filme de PPI/urease no modo potenciométrico apresentou um menor LD (0,00074 mol L⁻¹) do que no modo amperométrico (0,0021 mol L⁻¹) e um menor valor de LQ (Tabela 5). Assim, quando se aplica um potencial constante, a detecção é mais eficiente para a detecção de uréia, pois a curva potenciométrica apresenta uma melhor linearidade devido ao

menor desvio padrão obtido no início da medida. A detecção potenciométrica permite detectar menores concentrações de analito em relação à amperométrica, com certo limite de confiabilidade e isto se deve a o fato de que durante a catálise da uréia pela urease há a formação de sub-produtos na forma de íons, como NH_3^+ . Esses íons contribuem para a variação de potencial durante a detecção, já que a urease é uma hidrolase que catalisa reações de hidrólise, atuando na quebra de ligações do tipo peptídica ou do tipo C-N. Enzimas oxirredutases são mais sensíveis a detecções amperométricas, já que catalisam reações de oxiredução, que provocam transferência de elétrons durante reações de catálise, onde os elétrons provenientes desse processo são quantificados em forma de densidade de corrente.

Dessa forma, devido aos resultados da MCQE terem indicados que, a partir do quinto ciclo de síntese e imobilização, há o início de uma perda significativa de massa nos eletrodos enzimáticos, que pode estar relacionada ao desprendimento tanto de PPI e moléculas de enzimas adsorvidas, quanto de Au, foi feita a síntese e imobilização enzimática até o quinto ciclo, antes que houvesse essa perda de massa, a fim de se comparar a eficiência dos biossensores construídos com 10 e 5 ciclos de varredura (Figura 40 A e 40 B).

Figura 40 - Curvas analticas obtidas a partir das respostas (A) amperomtrica e (B) potenciomtricas durante a deteco de diferentes concentraes de uria nos eletrodos de PPI/urease em uma soluo tampo fosfato a pH 7.

Os valores de LQ e LD esto mostrados na Tabela 7, obtidos aps 10 e 5 ciclos de sntese e imobilizao.

Tabela 7 - Valores de LQ e LD para os diferentes métodos de detecção e em diferentes números de ciclos para o filme de PPI/urease.

Parâmetros	Amperométrico		Potenciométrico	
	10 ciclos	5 ciclos	10 ciclos	5 ciclos
LQ/ mol L⁻¹	0,0071	0,0051	0,0024	0,00196
LD/ mol L⁻¹	0,0021	0,0015	0,00074	0,00059
Coef. Correlação linear (R)	0,891	0,940	0,988	0,990

Observando os resultados da Tabela 7, pode-se definir qual é o método eletroquímico de detecção mais eficiente para os filmes de PPI/urease e ainda, prognosticar que até o quinto ciclo de síntese e imobilização torna o biossensor amperométrico mais sensível, com menor valor de LD, ou seja, menores concentrações são possíveis de serem detectadas e quantificadas, com certo limite de confiabilidade. Quando são comparados os valores do limite de detecção (LD), o filme de PPI/urease no modo potenciométrico apresentou um menor LD (0,00059 mol L⁻¹) do que no modo amperométrico (0,0015 mol L⁻¹) e um menor valor de LQ

A detecção potenciométrica se mostrou mais eficiente do que a amperométrica, pela possibilidade de se detectar menores concentrações de uréia, da ordem de 10⁻⁴ mol L⁻¹, ao contrário da amperométrica, que detecta concentrações da ordem de milimolar. Dessa forma, o biossensor poteciométrico é mais sensível do que o amperométrico, quando produzidos biossensores a partir de 5 ciclos de síntese, pois até o quinto ciclo não há perda de massa considerável e assim, maiores quantidades de enzimas estão imobilizadas, potencializando a atividade catalítica. Ainda observa-se que os valores de coeficiente de correlação linear (R) apresentam-se mais elevados, próximos da unidade, durante a detecção potenciométrica, o que significa uma correlação mais perfeita positiva entre as variáveis.

6.12 Uso do eletrodo de PPI/extrato bruto como biossensor para a detecção de uréia

O eletrodo de PPI/extrato bruto foi testado para o uso em biossensores, utilizando-se também da cronoamperometria e a cronopotenciometria como métodos de transdução. Também foram calculados os limite de detecção (LD) (eq.(8)) e de quantificação (LQ) (eq.(9)) para esta detecção, segundo a IUPAC:

Os resultados obtidos pela técnica de cronoamperometria, após se aplicar um potencial de -0,28 V vs. ECS nos filmes de PPI/extrato bruto para a detecção de uréia, podem ser vistos na Figura 41.

Para o filme de PPI/extrato bruto, o aumento na densidade de corrente com a variação da concentração de uréia é linear até uma concentração de uréia de 0,003 mol L⁻¹. Acima deste valor, a reação de hidrólise se torna menos eficiente e, a partir de 0,006 mol L⁻¹, pode estar ocorrendo a saturação dos sítios ativos da urease contida em seu extrato bruto pela uréia, com a concentração de uréia já não interferindo mais na detecção.

Para uma concentração de uréia acima de 0,006 mol L⁻¹, já não há interferência na detecção, predominando uma densidade de corrente constante com o tempo.

Figura 41 - Curva analítica obtida a partir das respostas amperométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008 mol L⁻¹) no eletrodo de PPI/extrato bruto, em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.

A Figura 42 mostra a resposta cronopotenciométrica do filme de PPI/extrato bruto a uma corrente constante aplicada de 1 mA. Da mesma forma que para a detecção amperométrica, a amônia é quantificada pelo aumento do potencial com a concentração de uréia.

Pode-se observar uma linearidade do sinal até 0,003 mol L⁻¹ de uréia. Para uma concentração de uréia acima de 0,005 mol L⁻¹, o potencial é constante com o tempo. Em altas concentrações de uréia, o potencial assume valores quase constantes, que se justifica pela presença de incrustações da superfície do eletrodo com os produtos da reação.

Quando são comparados os valores do limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD), o biossensor potenciométrico aplicado ao filme de PPI/extrato bruto apresentou um menor LD (0,00049 mol L⁻¹) do que o amperométrico (0,00068 mol L⁻¹) e um menor valor de LQ (Tabela 6). Assim, como ocorreu com o filme de PPI/urease, a detecção potenciométrica é mais eficiente. Isso se deve pela curva potenciométrica apresentar uma melhor linearidade no início da medida. Além disso, a detecção potenciométrica permite a detecção de menores concentrações de analito com certo limite de confiabilidade.

Figura 42 - Curva analítica obtida a partir das respostas potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia (0 a 0,008 mol L⁻¹), no eletrodo de PPI/extrato bruto, em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.

O mesmo foi realizado com o filme de PPI/extrato bruto, em relação aos resultados da MCQE. Como a partir do quinto ciclo de síntese e imobilização, há o início de uma perda significativa de massa no eletrodo enzimático, foi feita a síntese e imobilização do extrato bruto até o quinto ciclo, para uma posterior comparação da eficiência do biossensor com 10 e 5 ciclos (Figura 43).

Os valores de LQ e LD estão mostrados na Tabela 8, realizadas após 10 e 5 ciclos de síntese e imobilização.

Figura 43 - Curvas analíticas obtidas a partir das respostas: (A) amperométrica e (B) potenciométricas durante a detecção de diferentes concentrações de uréia nos eletrodos de PPI/extrato bruto em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7.

Tabela 8 - Valores de LQ e LD para os diferentes métodos de detecção e em diferentes números de ciclos para o filme de PPI/extrato bruto.

Parâmetros	Amperométrico		Potenciométrico	
	10 ciclos	5 ciclos	10 ciclos	5 ciclos
LQ/ mol L⁻¹	0,00290	0,00200	0,00163	0,00170
LD/ mol L⁻¹	0,00068	0,00061	0,00049	0,00051
Coef. Correlação linear (R)	0,987	0,993	0,989	0,992

Observando os dados da Tabela 8, pode-se concluir também que, na presença de extrato bruto, a detecção potenciométrica foi mais eficiente que a amperométrica, devido ao transdutor potenciométrico propiciar um menor limite de detecção, ao biossensor. Dessa forma, o biossensor potenciométrico para o filme de PPI/extrato bruto é mais sensível que o amperométrico por detectar menores concentrações do analito. Ainda neste caso, o biossensor potenciométrico aplicado ao filme de PPI/extrato bruto apresentou um menor LD (0,00051 mol L⁻¹) do que o amperométrico (0,00061 mol L⁻¹) (Tabela 8).

Os valores de coeficiente de correlação linear (R) foram próximos e apresentam-se próximos à unidade, durante as detecções, o que significa uma correlação mais perfeita positiva entre as variáveis em todas as detecções.

A Figura 44 apresenta a dependência do potencial com o número de determinações para os filmes de PPI/urease e PPI/extrato bruto, eletrossintetizados com 5 ciclos de varredura.

Observa-se que ambos os filmes apresentaram reprodutibilidade semelhante até 12 determinações, apresentando um pequeno decaimento a partir da sexta determinação para o filme de PPI/urease e a partir da sétima determinação, para o filme de PPI/extrato bruto.

Figura 44 – Perfil da estabilidade dos biossensores potenciométricos de: (a)PPI/urease e (b) PPI/extrato bruto em função do número de determinações obtidas em uma solução contendo tampão fosfato a pH 7 e uréia (50mmol L⁻¹).

Comparando-se os biossensores PPI/urease e PPI/extrato bruto, pode-se observar que o filme de PPI/extrato bruto apresenta um menor limite de detecção encontrado, tanto para o transdutor amperométrico, quanto para o potenciométrico, de acordo com as Tabelas 7 e 8.

O baixo custo e o bom desempenho do biossensor com o extrato bruto permitem com que este seja uma opção viável para a construção de biossensores para detecção de uréia, quando se comparado com a utilização da urease, uma enzima de alto custo, além de proporcionar uma boa estabilidade durante as medidas.

De acordo com a literatura, os biossensores potenciométricos de PPI/urease apresentaram um limite de detecção da ordem de 5×10^{-4} mol L⁻¹¹²⁸ e, em outros trabalhos, $1,4 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹¹⁹.

Já os biossensores amperométricos, onde a urease foi imobilizada quimicamente, apresentaram um limite de detecção de $0,22 \times 10^{-3}$ a $0,58 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹⁵⁸ e foi linear até uma concentração acima de 100×10^{-3} mol L⁻¹ de uréia⁵⁸.

Ainda, os biossensores com a urease imobilizada em outras matrizes, diferentes do PPI, como em matrizes de PVC-COOH, apresentaram um limite de detecção da ordem de $0,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e uma linearidade de $0,5 \times 10^{-3}$ a 8×10^{-3} mol L⁻¹. Neste caso, utilizou-se a análise por injeção em fluxo como método de detecção⁷⁵. Em outros trabalhos, quando se

imobilizou o extrato bruto de Jack Bean, foi obtido um limite de detecção da ordem de $6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ¹²⁹.

Em derivados de PPI, como o copolímero poli(N-3-aminopropil pirrol-co-pirrol), onde a urease foi imobilizada covalentemente, os biossensores apresentaram uma resposta linear de $0,16 \times 10^{-3}$ a $5,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e um limite de detecção foi de $0,02 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ⁷⁷.

Dessa forma, o biossensor apresentado neste trabalho foi relativamente sensível se comparado aos trabalhos da literatura. O biossensor, mesmo formado com extrato bruto de urease imobilizado por adsorção, apresentou uma sensibilidade próxima aos biossensores formados com urease purificada, como mostra a literatura. Isso se deve ao fato de que quando a enzima se aproxima de suas condições naturais, mais se potencializa o tempo de atividade da enzima, que se relaciona ao pH, quantidade de água, co-fatores e outros componentes que estão presentes no meio nativo da enzima e que possibilitam uma maior estabilidade e atividade. Assim, provavelmente a urease como extrato bruto pode estar em um meio mais propício para a sua atividade, diferentemente da urease purificada (comercial).

CAPÍTULO 7 CONCLUSÕES

Os biossensores preparados neste trabalho se mostraram eficientes para a detecção de uréia. A partir do uso da técnica de voltametria cíclica, foi possível se obter as respostas eletroativas dos filmes de PPI, PPI/urease e PPI/extrato bruto e, assim, o potencial ótimo em cada caso para a detecção da uréia. Filmes de PPI/extrato bruto mostraram-se mais eletroativos em relação aos filmes de PPI/urease.

Com as técnicas de FTIR, MEV e AFM, foi possível se verificar a ocorrência da imobilização da urease e do extrato bruto nos eletrodos de PPI. Pela análise da morfologia (MEV e AFM), observou-se que a presença da urease e do extrato bruto influenciam na morfologia e na rugosidade dos filmes. Filmes de PPI/extrato bruto apresentaram-se mais rugosos.

Pelo uso da microbalança de cristal de quartzo aplicada aos eletrodos modificados de PPI, PPI/ urease e PPI/extrato bruto, pôde-se quantificar a presença da urease e do extrato bruto imobilizados com eficiência até o quinto ciclo de eletrossíntese. Dessa forma, verificou-se que a urease (purificada e na forma do extrato bruto) foi imobilizada com maior eficiência quando no estado purificado.

Os métodos eletroquímicos de detecção permitiram com que se obtivesse uma eficiência satisfatória, tanto para filme de PPI/urease, quanto de PPI/extrato bruto. O biossensor amperométrico apresentou uma maior sensibilidade durante a detecção quando se utilizou 5 ciclos de eletrossíntese. Para esses filmes, observou-se ainda, que o modo de transdução potenciométrico proporcionou uma maior sensibilidade do que o modo amperométrico, pois o limite de detecção obtido foi menor. Além disso, as curvas potenciométricas apresentaram uma maior linearidade no início da detecção, proporcionando assim, maior estabilidade e confiabilidade para os biossensores, para se quantificar concentrações mais baixas do analito.

Analisando a eficiência da urease empregada na forma purificada e no extrato bruto, o extrato bruto, além de proporcionar biossensores com um comportamento redox mais pronunciado por conta dos valores de densidade de corrente serem mais elevados em relação à urease, ele permite com que os filmes sejam mais rugosos, comportamento observado pelas medidas de microscopia (MEV e AFM). No entanto, menores quantidades de massa foram imobilizadas na superfície dos eletrodos de PPI com o extrato bruto.

Durante a obtenção das curvas analíticas, observou-se que o extrato bruto imobilizado em filmes de PPI proporcionou um biossensor mais sensível (menor LD) e mais estável durante o tempo.

Dessa forma, pode-se concluir que os filmes mais rugosos formados pelo extrato bruto, contribuíram para a melhor aplicabilidade do biossensor e que a quantidade de massa imobilizada influencia na detecção de uréia apenas quando se tem a certeza de que todos os sítios ativos enzimáticos estão voltados para a superfície do eletrodo.

Esses bons resultados obtidos com o biossensor de extrato bruto podem estar relacionados às interações mais eficientes do extrato bruto com a matriz polimérica e também devido ao extrato bruto se encontrar em suas condições naturais, que potencializa o tempo de sua atividade enzimática. O método de transdução por cronopotenciometria aplicado juntamente à essas condições propiciaram esses resultados obtidos.

Dessa forma, pode-se concluir que é possível se utilizar a urease extraída do feijão de porco como um elemento de reconhecimento biológico, pois, além da vantagem do baixo custo, obtém-se confiabilidade nos resultados durante a detecção da uréia.

REFERÊNCIAS

-
- 1 DESHPANDET, M.V.; AMALNERKAR, D.P. Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 18, n. 4, p. 623-649, 1993.
 - 2 PEREIRA, F.C.; BERGAMO, E.P.; ZANONI, M.V.B.; MORETTO, L.M.; UGO, P. Aplicações de nanoeletrodos como sensores na química analítica. **Química Nova**, v. 29, n.5, p.1054-1060, 2006.
 - 3 GYORGY, E.; SIMA, F.; MIHAILESCU, I.N.; SMAUSZ, T.; HOPP, B.; PREDOL, D.; SIMA, L.E.; PETRESCU, S.M. Biomolecular urease thin films grown by laser techniques for blood diagnostic applications. **Material Science and Engineering C**, v. 30, n. 4, p. 537-541, 2010.
 - 4 GEORGE, J.; MENONU C.S. Electrical and optical properties of electron beam evaporated ITO thin films. **Surface and Coatings Technolog**, v. 132, n. 1, p. 45-48, 2000.
 - 5 UPDIKE, S. J., HICKS, G. P. The enzyme electrode. **Nature**, v. 214, n. 5092, p. 986, 1967.
 - 6 HULANICKI, A.; GLAB, S., INGMAN, F. Chemical Sensors-definition and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247, 1991.
 - 7 THEÂVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R.A., WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333, 1999.
 - 8 Biossensor. Disponível em:
<http://naturlink.sapo.pt/article.aspx?menuid=6&cid=11345&bl=1&viewall=true>. Acesso em 10 JAN. 2010.
 - 9 GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; JANOS VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.
 - 10 STRADIOTTO, N.R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M.V.B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 14, n.2, p. 159-73, 2003.

-
- 11 WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 1-2, p. 47-53, 1999.
- 12 SCHUHMANN, W.; ZIMMERMANN, H.; HABERMULLER, K.; LAURINAVICIUS, V. Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces : reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes. **Faraday Discussion**, v. 116, p. 245-255, 2000. DOI: 10.1039/B001546f
- 13 SCHUHMANN, W. Amperometric enzyme biosensors based on optimised electron-transfer pathways and non-manual immobilisation procedures. **Molecular Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 425-441, 2002.
- 14 POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors – principles and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 6, n. 1, p. 57–64, 2008.
- 15 GORTON, L.; LINDGREN, A.; LARSSON, T.; MUNTEANU, F.D.; RUZGAS, T.; GAZARYAN, I. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 1, p. 91–108, 1999.
- 16 SCHELLER, F.W.; SCHUBERT, F.; NEUMANN, B.; PFEIFFER, D.; HINTSCHE, R.; DRANSFELD, I.; WOLLENBERGER, U.; RENNEBERG, R.; WARSINKE, A. Second Generation biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 6, n.3, p. 245-253, 1991.
- 17 DI, J.; BI, S.; ZHANG, M. Third-generation superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol–gel thin film on gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 11, p. 1479–1486, 2004.
- 18 BAKKER, E.; BHAKTHAVATSALAM, V.; GEMENE, K.L. Beyond potentiometry: Robust electrochemical ion sensor concepts in view of remote chemical sensing. **Talanta**, v. 75, n. 3, p. 629–635, 2008.
- 19 ROVER, L.J. **Construção e avaliação de biossensor amperométrico para salicilato usando salicilato de hidroxilase imobilizada em matriz de polipirrol com glutaraldeído**. 1999. 120 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

20 SOARES, J. C. **Síntese e caracterização voltamétrica e espectroscópica de filmes de poli-p-fenileno e derivados**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

21 GREENHAN H., FRIEND R.H. Semiconducting device physics of conjugated polymers. **Physics of the solid state**, v. 49, n. 1, p. 1 -149, 1996.

22 FURUKAWA Y.; TASUMI, M. **Modern Polymer Spectroscopy**. New York: Wiley – VCH, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527613922.fmatter/pdf>. Acesso em: 15 NOV 2008.

23 HEEGER A.J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. **Synthetic Metals**, v. 125, n. 1, p. 23-42, 2002.

24 MC DIAMIRD A. G. Synthetic Metals: a novel role for organic polymers. **Synthetic Metals**, v. 125, n. 1, p. 11-22, 2002.

25 LINFORD R.G. **Electrochemical science and technology of polymers**. Londres: Elsevier Applied Science, 1987. v.1.

26 RODRÍGUEZ, J.; GRANDE, H. J.; OTERO, T. F. Polypyrrole: from basic research to technological applications. In: NALWA, H.S. (Ed). **Handbook of organic conductive molecules and polymers**. New York: John Wiley & Sons, 1977. v. 2, cap. 10, p. 415-467.

27 ATEH, D. D.; NAVSARIA, H. A.; VADGAMA, P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of Royal Society Interface**, v. 3, n. 11, p. 741-752, 2006.

²⁸ Gerard , M.; Chaubey, A.; B.D. Malhotra . Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17 , n. 5, p. 345–359, 2002.

29 LEHNINGER, A.L: **Princípios da bioquímica**. 4a ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

30 LUCA, G. C.; REIS, B. F. Sistema em fluxo para determinação espectrofotométrica de uréia em plasma de sangue animal empregando leguminosa como fonte natural da enzima urease. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 191, 2001.

-
- 31 NEWMAN, J.; TURNER, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2435–2453, 2005.
- 32 ARSLAN, F. An Amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole film. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5492-5550, 2008.
- 33 NARANG, J.; MINAKSHI; BHAMBI, M.; PUNDIR, C.S. Fabrication of an amperometric triglyceride biosensor based on PVC membrane. **Analytical Letters**, v. 43, n. 1, p. 1-11, 2010
- 34 MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. **Sensors and Actuators B**, v. 91, n. 1-3, p. 117–127, 2003.
- 35 ROSATTO, S.S.; FREIRE, R.S.; DÚRAN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- 36 SUMMER, J.B.; SUMNER, J. B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 69, n. 21, p. 435-44, 1926.
- 37 DIXON, N. E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R. L., ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. **Journal of American Chemical Society**, v. 97, n. 14, p. 4131–4133, 1975.
- 38 JABRI, E.; CARR, M. B.; HAUSINGER, R. P.; KARPLUS, P. A. The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science**, v. 268, n. 5213, p. 998-1004, 1995.
- 39 Urease. Disponível em: <HTTP://www.ufrgs.br/lapotrox/urease%20KA.htm>. Acesso em: 13 Jun. 2010.
- 40 PEARSON, M.A.; MICHEL, L.O.; HAUSINGER, R.P.; KARPLUS, P.A. Structures of cys319 variants and acetohydroxamate-inhibited *klebsiella aerogenes* urease. **Biochemistry**, v. 36, n. 26, p. 8164–8172, 1997.
- 41 LAKARD, B.; HERLEM, G.; LAKARD, S.; ANTONIOU; A.; FAHYS, B. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 7, p. 641-651, 2004.

42 SAHNEY, R.; ANAND, S.; PURI, B. K. Enzyme coated glass pH-electrode: its fabrication and applications in the determination of urea in blood samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 542, n. 2, p. 157–161, 2005.

43 WANG, J.Q.; CHOU, J.C.; SUN, T.P.; HSIUNG, S.K.; HSIUNG, G.B. pH-based potentiometrical flow injection biosensor for urea. **Sensors and Actuators B**, v. 91, n. 1-3; p. 5-10, 2003.

44 KRAJEWSKA, B.; ZABORSKA, W. Jack bean urease: the effect of active-site binding inhibitors on the reactivity of enzyme thiol groups. **Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 355–365, 2007

45 LIPPARD, STEPHEN J. At last - the crystal structure of urease. **Science**. v. 268, n. 268, p. 996 - 997, 1995.

46 Catálise da uréia. Disponível em:

http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Urease-e.htm Acesso em: 20 Jan. 2010.

47 FATIBELLO, O. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.

48 EGGINS, B.R.: **Biosensors: An Introduction**. USA: John Wiley & Sons, inc., 1996

49 Feijão de porco. Disponível em:

http://www.seprotec.com.br/produtos_cobertura_feijaop.asp. Acesso em: fev. 2011.

50 MENDONÇA, R.L. **Determinação de aleloquímicos por HPLC/UV-VIS em extratos aquosos de sementes de Canavalia Ensiformis e estudo da atividade alelopática**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

51 KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.

52 KRAJEWSKA, B. Review Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 59, n. 1, p. 22–40, 2009.

53 VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicação de lípases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

54 SINGH, M.; VERMA, N.; GARG, A. K.; REDHU, N. Urea biosensors. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 134, n. 1, p. 345–351, 2008.

55 MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

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

57 KARUBE, I.; SYDENHAM, P. H.; THOM, R. **Handbook of Measurement Science**. New York: Editora Wiley, 1992.

58 MASSAFERA, M. P.; TORRESI, S. C. Urea amperometric biosensors based on a multifunctional bipolymeric layer: Comparing enzyme immobilization methods **Sensors and actuators B: chemical**, v. 137, n. 2, p. 476-482, 2009.

59 WANG, B.; ZHANG, J.; DONG, S. Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 15, n. 7-8, p. 397–402, 2000.

60 DIAZ, A. N.; PEINADO, M. C. R. Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorimetric analysis, **Sensors and Actuators B**, v. 39, n. 38-39, p. 426-431, 1997.

61 YANG, Y.; YANG, M.; WANG, H.; JIANG, J.; SHEN, G.; YU, R. An amperometric horseradish peroxidase inhibition biosensor based on a cysteamine self-assembled monolayer for the determination of sulfides. **Sensors and Actuators B**, v. 102, n. 1, p. 162–168, 2004.

62 NUNE, G.S.; JEANTY, G.; MARTY, J.L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides. Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 1, p. 107–115, 2004.

63 BRIGGS, G. E.; HALDANE, J. B. S. A note on the kinetics of enzyme action. **Journal Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 338-339, 1925.

64 BRUNO, L.; BARRA, G.; MANSUR, H.; ORÉFICE, R. L. Imobilização de proteínas do veneno do escorpião *Tyrtius Serrulatus* em blenda condutora de polianilina-poli (metacrilato de hidroxietila). **Polímeros**, v. 14, n. 3, p. 156-161, 2004.

65 PEIXOTO, C. R. M. **Imobilização e estudo eletroquímico dos complexos [Co(sepulcrato)]³⁺ e [Ru(edta)H₂O]** sobre superfície de sílica gel modificada. 1996. 101p. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

66 LOWRY, J. P.; MCATEER, K.; ATRASH, S.S.E.; DUFF, A.; O'NEILL, R. D. Characterization of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes in vitro and in vivo: homogeneous interference by ascorbic acid in hydrogen peroxide detection. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1754-1761, 1994. Doi: 10.1021/ac00082a025.

67 LASKA, J.; WLODARCZYK, J.; ZABORSKA, W. Polyaniline as a support for urease immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 6, n. 6, p. 549–553, 1999.

68 LUO, Y.C; JING-SHAN DO, J. S. Urea biosensor based on PANi(urease)-Nafion/Au composite electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 1, p. 15–23, 2004.

69 TIWARI, A.; ARYAL, S.; PILLA, S.; GONGA, 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.

70 CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; NOBRE, T. N.; ZANIQUELLI, M. E. D.; ZUCOLOTO, V.; OLIVEIRA, O. N. J. Using phospholipid Langmuir and Langmuir–Blodgett films as matrix for urease immobilization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 1, p. 100–108, 2008.

71 SHEPPARD JR, N. F.; MEARS, D. J.; Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 11, n. 10, p. 967-979, 1996.

72 YANG, Z.; SI, S.; DAI, H.; ZHANG, C. Piezoelectric urea biosensor based on immobilization of urease onto nanoporous alumina membranes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 3283–3287, 2007.

73 RHINES, T. D.; ARNOLD, M. A. Fiber-Optic biosensor for urea based on sensing of ammonia gas **Analytica Chimica Acta**, v. 227, p. 387-396, 1989. Doi: 10.1016/S0003-2670(00)82682-3.

74 WOLFBEIS, O.S.; HONG LI, H. Fluorescence optical urea biosensor with an ammonium optrode as transducer. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 8, n. 3-4, p. 161-166, 1993.

75 WALCERZ, I.; GI, S.; KONCKI, R. Potentiometric enzyme electrode in a flow injection system for the determination of urea in human serum samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1-2, p. 129-137, 1998.

76 ADELOJU, S. B.; SHAW, S. J.; WALLACE, G. G. Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea. **Analytica Chimica Acta**, v. 323, n. 1-3, p. 107-113, 1996.

77 RAJESH; BISHT, V.; TAKASHIMA, W.; KANETO, K. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly(N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film. **Biomaterials**, v. 26, n. 17, p. 3683-3690, 2005.

78 OSAKA, T.; KOMABA, S.; SEYAMA, M.; TANABE, K. High-sensitivity urea sensor based on the composite film of electroinactive polypyrrole with polyion complex. **Sensors and Actuators B**, v.36, n. 1-3, p. 463-469, 1996.

79 KOMABA, S.; SEYAMA, M.; MOMMA, T.; OSAKA, T. Potentiometric biosensor for urea based on electropolymerized electroinactive polypyrrole. **Electrochimica Acta**, v. 42, n. 3, p. 383-388, 1997.

80 AHUJA, T.; MIR, I.A.; KUMAR, D.; RAJESH. Potentiometric urea biosensor based on BSA embedded surface modified polypyrrole film. **Sensors and actuators: chemical B**, v. 134, n. 1, p. 140-145, 2008.

81 COCHE-GUERETE, L.; COSNIER, L.; INNOCENT, C.; MAILLEY, P. Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, n. 1, p. 23-30, 1995.

82 COCHE-GUERETE, L.; COSNIER, L.; INNOCENT, C.; MAILLEY, P. Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, n. 1, p. 23-30, 1995.

83 COCHE-GUERETE, L.; COSNIER, L.; INNOCENT, C.; MAILLEY, P. Development of amperometric biosensors based on the immobilization of enzymes in polymer films electrogenerated from a series of amphiphilic pyrrole derivatives. **Analytica Chimica Acta**, v. 311, n. 1, p. 23-30, 1995.

84 ESCOLA BRASILEIRA DE ESTRUTURA ELETRÔNICA, 9., 2004, Salvador. Polímeros na era da nanotecnologia: controle molecular em filmes nanoestruturados. **Material didático**. Salvador, 2004. 11 a 16 de Julho.

85 RAM, M.K.; BERTONCELLO, P.; DING, H.; PADDEU, S.; NICOLINI, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 849-856, 2001.

86 DENARO, A. F. **Fundamentos de Eletroquímica**. São Paulo: Editora Bliicher Ltda, 1974.

87 SOLOMONS, T.W.G.; CRAIG FRYHLE. C. **Química Orgânica**. 6a ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 1996.

88 Silverstein, R.M.; WEBSTER, F.X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000, 460 p. v.6.

89 Infravermelho. Disponível em: [<http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>]. Acesso em: 10 Ago. 2010.

90 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5a ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2002.

91 CANEVAROLO, S. V. **Técnica de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

92 MALISKA, A.M. **Microscopia Eletrônica de Varredura**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina - Laboratório de Caracterização Microestrutural e Análise de Imagens, 2003.

93 Microscopia eletrônica de varredura. Disponível em: <http://fap.if.usp.br/~lff/mev.html>. Acesso em: 25 Jul. 2010.

94 FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137-142, 2006.

95 KUNDU, P. P.; BISWAS, J.; KIMA, H.; CHOE, S. Influence of film preparation procedures on the crystallinity, morphology and mechanical properties of LLDPE films.

European Polymer Journal, v. 39, n. 8, p. 1585-1593, 2003.

96 TANAKA, H.; NAKAMURA, M; UETA, F.; YOSHIHARA, S.; SHIRAKASHI, T. Special issue: reliability testing and environmental testing standards: evaluating ionic migration in lead-free solder using the QCM method. **Espec Technology Report**, n. 12, p. 17, 2001.

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

98 MABROUK, P.A. Oxidative electropolymerization of pyrrole from neat monomer solution. **Synthetic Metals**, v. 150, n. 1, p. 101-105, 2005.

99 BUND, A. Application of the quartz crystal microbalance for the investigation of nanotribological processes. **Journal of Solid State Electrochemical**, v. 8, n. 3, p. 182–186, 2004.

100 JEFFREY, M. I.; ZHENG, J.; RITCHIE, I. M. The development of a rotating electrochemical quartz crystal microbalance for the study of leaching and deposition of metals. **Measurement Science and Technology**, v. 11, n. 5, p. 560-567, 2000.

101 NOMURA, T.; IJIMA, M. Electrolytic determination of nanomolar concentrations of silver in solution with a piezoelectric quartz crystal. **Analytica Chimica Acta**, v. 131, p. 97-102, 1981. Doi: 10.1016/S0003-2670(01)93538-x.

102 FERREIRA, E. R. A. **Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação como biossensores amperométricos na análise de compostos fenólicos**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais)- Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

¹⁰³ FATIBELLO, O, VIEIRA, I.C.; K.O. Lupetti. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de aborbrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v. n. 1, p. 39-43, 2003.

¹⁰⁴ TOPÇU, S.; SEZGINTURK, M.K.; DINÇKAYA, E. Evaluation of a new biosensor-based mushroom (*Agaricus bisporus*) tissue homogenate: investigation of certain phenolic compounds and some inhibitor effects. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p.592-597, 2004.

105 KRAJEWSKA, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review . **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 9-21, 2009.

106 ADELOJU, S.B.; SHAW, S. J. Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea: part 2. analytical optimisation. **Analytica Chimica Acta**, v. 281, n. 3, p. 621-627, 1993.

107 CAMPBELL, M. K. **Bioquímica Básica**. 5a ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

108 ABDULLA, H.M; GREENWAY, G.M.; PLATT, A.E. Biosensing with coated-wire electrodes: part 2. urea sensors. **Analyst**, v. 114, n. 12, p. 1575-1578, 1989.

109 ALMARIO, A. A. A.; CÁCERES, L. R. T. Study of kinetic formation and the electrochemical behavior of polypyrrole films. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 1, p. 14-19, 2009.

110 ADELOJU, S. B.; SHAW, S. J.; WALLACE, G. G. Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea: part 1. incorporation of urease. **Analytical Chimica Acta**, v. 281, n. 3, p. 611-620, 1993.

111 FTIR de proteínas. Disponível em:
http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf Acesso em : 21 Fev. 2011.

112 VISHNUVARDHAN, T. K.; KULKARNI, V. R.; BASAVARAJA, C.; RAGHAVENDRA, S. C. Synthesis, characterization and a. c. conductivity of polypyrrole/Y₂O₃ composites, Bull. **Journal of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 77–83, 2006.

113 CHEN, W.; LI, X.; XUE, G.; WANG, Z.; ZOU, W. Magnetic and conducting particles: preparation of polypyrrole layer on Fe₃O₄ nanospheres. **Applied Surface Science**, v. 218, n. 1-4, p. 215–221, 2003.

114 OGURA, K.; NAKAOKA, K.; NAKAYAMA, M.; KOBAYASHI, M.; FUJII, A. Thermogravimetry/mass spectrometry of urease-immobilized sol-gel silica and the application of such a urease-modified electrode to the potentiometric determination of urea. **Analytical Chimica Acta**, v. 384, n. 2, p. 219-225, 1999.

115 POUZET, S.; LE BOLAY, N.; RICARD, A. Electrochemical synthesis and characterization of polypyrrole deposited on porous electrode. **Synthetic Metals**, v. 55, n. 2-3, p. 1495-1500, 1993.

116 HERRASTI, P.; OCÓN, P. Polypyrrole layers for steel protection. **Applied Surface Science**, v. 172, n. 3-4, p. 276-284, 2001.

117 JEONG, R.A.; LEE, G.J.; KIM, H.S.; AHN, K.; LEE, K.; KIM, K.H. Physicochemical properties of electrochemically prepared polypyrrole perchlorate. **Synthetic Metals**, v. 98, n. 1, p. 9-15, 1998.

118 DEEPA, M.; SHAHZADA AHMAD, S. Polypyrrole films electropolymerized from ionic liquids and in a traditional liquid electrolyte: a comparison of morphology and electro-optical properties. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 10, p. 3288-3299, 2008.

119 ASHRAFI, A.; GOLOZAR, M. A.; MALLAKPOUR, S. Morphological investigations of polypyrrole coatings on stainless steel. **Synthetic Metals**, v. 156, n. 18-20, p. 1280-1285, 2006.

120 EBRAHIM, S. M.; ABD-EL LATIF, M. M.; GAD, A. M.; SOLIMAN, M. M. Cyclic voltammetry and impedance studies of electrodeposited polypyrrole nanoparticles doped with 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid sodium salt. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 15, p. 4100-4105, 2010.

121 SILK, T.; HONG, Q.; TAMM, J.; COMPTON, R.G. AFM studies of polypyrrole film surface morphology I. The influence of film thickness and dopant nature. **Synthetic Metals**, v. 93, n. 1, p. 59-64, 1998.

122 SILK, T.; HONG, Q.; TAMM, J.; COMPTON, R.G. AFM studies of polypyrrole film surface morphology II. roughness characterization by the fractal dimension analysis. **Synthetic Metals**, v. 93, n. 1, p. 65-71, 1998.

123 TAMM, J.; JOHANSON, U.; MARANDI, M.; TAMM, T.; TAMM, L. Study of the properties of electrodeposited polypyrrole films. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 40, n. 3, p. 344-348, 2004.

124 PÉREZ, T.H.; MORALES, M.; BATINA, N.; SALMÓN, M. Effect of the electrosynthesis method on the surface morphology of the polypyrrole film an atomic force microscopy study. **Journal of the Electrochemical Society**, v. 148, n. 5, p. 369-375, 2001.

125 TORRESI, R.M.; TORRESI, S.I.C; MATENCIO, T.; DE PAOLI, M.A. Ionic exchanges in dodecylbenzenesulfonate-doped polypyrrole part II: electrochemical quartz crystal microbalance study. **Synthetic Metals**, v. 72, n. 3, p. 283-287, 1995.

126 LIM, J. Y.; PAIK, WOON-KIE.; YEO, IN-HYEONG. A study on ion transports and growth of conducting polypyrrole with electrochemical quartz crystal microbalance. **Synthetic Metals**, v. 69, n. 1-3, p. 451-454, 1995.

127 ZHOU, D.; TOO, C. O.; WALLACE, G.G. Synthesis and characterization of polypyrrole/heparin composites. **Reactive & Functional Polymers**. v. 39, n. 1, p. 19-26, 1999.

128 HERNANDEZ, E.C.; WITKOWSKI, A.; DAUNERT, S.; BACHAS, L.G. Potentiometric enzyme electrode for urea based on electrochemically prepared polypyrrole membranes. **Mikrochimica Acta**, v. 121, n. 1-4, p. 63-72, 1995.

129 SILVA, F.V.; NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B.; REIS, B. F.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. M. B. S.; LIMA, .L. F. C. Potentiometric determination of urea by sequential injection using Jack bean meal crude extract as a source of urease. **Talanta**, v. 53, n. 2, p. 331-336, 2000.