UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INTERUNIDADES EM CIÊNCIAS E ENGENHARIA DE MATERIAIS
GRUPO DE POLÍMEROS BERNHARD GROSS

VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DO CONTRA-ÍON USADO NA ELETROSSÍNTESE DO POLIPIRROL
EM SUA RESPOSTA COMO BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO APÓS
IMOBILIZAÇÃO DA POLIFENOL OXIDASE**

São Carlos

2009

VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DO CONTRA-ÍON USADO NA ELETROSSÍNTESE DO POLIPIRROL
EM SUA RESPOSTA COMO BIOSENSOR ELETROQUÍMICO APÓS
IMOBILIZAÇÃO DA POLIFENOL OXIDASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Débora Gonçalves

São Carlos

2009

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Rodrigues, Valquiria da Cruz

Influência do contra-íon na eletrossíntese do polipirrol em sua resposta como biossensor eletroquímico após imobilização da polifenol oxidase/ Valquiria da Cruz Rodrigues; orientador Débora Gonçalves -- São Carlos, 2009.

73 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais. Área de Concentração:Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo

1. Biossensores. 2. Polifenol Oxidase (PFO). 3. Polipirrol (PPI) 4. Catecol. 5. Pirogalol. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Valquiria da Cruz Rodrigues Barioto

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia
de Materiais da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Engenharia de Materiais.
Área de Concentração: Desenvolvimento,
Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 16/07/2009

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Lucia Helena Mascaro

Instituição: UFSCar

Assinatura

Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto

Instituição: IQSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Artur de Jesus Motheo

Instituição: IQSC/USP

Assinatura

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido, companheiro
e amigo Víctor Luiz
Por seu amor carinho e incentivo
E ao nosso bebê, o pequeno Víctor,
Um presente que Deus nos deu.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho:

A minha orientadora profa. Débora Gonçalves pelos ensinamentos, confiança e paciência ao longo desse período.

À profa. Lucia Helena Mascaro, pelas discussões e dicas no início do trabalho.

Ao meu Marido Victor por todo seu apoio e por acreditar na minha capacidade, o que foi fundamental para a minha formação.

Aos meus pais Valdomiro e Geracy por estarem sempre ao meu lado e por me darem a oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus irmãos, sobrinhos, cunhadas e tias pelos momentos felizes que passamos juntos e por tudo que eles representam na minha vida.

Aos meus sogros Lucia e Victor por todo o apoio durante este período.

Aos amigos Marli, Miguel, Paty e Thiago, pela grande amizade e companheirismo durante todo tempo.

Ao amigo Fábio que foi fundamental no início deste trabalho.

Aos amigos André Brisolari, Juliana Coatrini e Rodrigo (Guidoval) pela ajuda que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos do grupo de polímeros do IFSC e em especial aos amigos da sala 18: Adriana Pavinato, Analine, Andrey, Alexandre, Marcela, Rodrigo Pagliai, Rafael, Vananélia e Washington, pela amizade e pelos momentos de risos e descontração.

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

Às bibliotecárias pela atenção e competência demonstrada durante este período.

A Cnpq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Neste trabalho, foram fabricados biossensores amperométricos a partir do uso da polifenol oxidase (PFO), obtida do abacate como fonte enzimática, imobilizada em filmes de polipirrol (PPI) e que foram eletrossintetizados em meio de três diferentes eletrólitos de suporte (NaCl e NaClO_4 e NaDDS). O método de imobilização enzimática foi o da adsorção, sendo a solução de enzima adicionada à solução com o pirrol e o eletrólito durante o processo de eletropolimerização.

Os filmes de PPI/PFO foram caracterizados por técnicas eletroquímicas, principalmente por voltametria cíclica. A detecção de compostos fenólicos (catecol e pirogalol) foi realizada pela técnica de cronoamperometria após se variar a concentração do analito. A morfologia dos filmes foi estudada por microscopia de força atômica (AFM), sendo observado que a presença da enzima no filme polimérico assim como o uso de diferentes eletrólitos de suporte levou a diferenças na superfície dos filmes. Além disto, verificou-se que o biossensor construído a partir do uso do NaCl , apresentava uma resposta mais eficiente, ou seja, ele foi capaz de detectar catecol e pirogalol em um menor limite de detecção.

Palavras-chave: Biossensores, Polifenol oxidase (PFO), Polipirrol (PPI), Catecol, Pirogalol.

ABSTRACT

In this study amperometric biosensors were manufactured from the use of polyphenol oxidase (PPO) obtained from avocado as a source of enzyme immobilized in polypyrrole (PPY) films that were electrosynthesized with three different support electrolytes (NaCl, NaClO₄ and NaDDS). The method of enzyme immobilization was the adsorption. The PPO was added in the solution containing pyrrole and electrolyte during electropolymerization. The PPY/PPO films were characterized by electrochemical techniques mainly by cyclic voltammetry. Detection of phenolic compounds (catechol and pyrogallol) was performed by the technique of chronoamperometry after varying the concentration of the analyte. The morphology of the films was studied by the atomic force microscopy (AFM) and observed that the presence of the enzyme in the polymer film and the use of different electrolytes support led to differences in the surface of films. However it was found that the biosensor constructed from the use of NaCl showed more efficient response and it was able to detect catechol and pyrogallol in a lower limit of detection.

Keywords: Biosensors, Polyphenol oxidase (PPO), Polypyrrole (PPY), Catechol, Pyrogallol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de um biossensor.	19
Figura 2 -	Mecanismo das reações em eletrodos enzimáticos para a determinação de compostos fenólicos. E_{red} e E_{ox} são os potenciais das formas reduzidas e oxidadas, respectivamente, das enzimas, CF = composto fenólico ⁹ .	20
Figura 3 -	Modelo esquemático do sítio ativo da (PFO) ¹⁸ .	21
Figura 4 -	Representação do esquema estrutural da PFO. Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO_figure.jpeg#filelinks .	22
Figura 5 -	Ciclo catalítico da PFO na oxidação de mono e difenóis a o-quinona na presença de oxigênio.	23
Figura 6 -	Alguns métodos de imobilização de enzimas.	24
Figura 7 -	Estrutura de alguns polímeros condutores.	26
Figura 8 -	Monitoramento eletrônico do acoplamento entre as moléculas.	27
Figura 9 -	Mecanismo de reação proposto para o processo de eletropolimerização do pirrol.	28
Figura 10 -	Esquema representativo da interface eletrodo/solução eletrólito: (a) para espécie eletroativa; (b) para espécie eletrocatalítica.	30
Figura 11 -	Estruturas químicas e dados sobre: (a) catecol, (b) pirogalol (c) monômero pirrol.	32
Figura 12 -	Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.	33
Figura 13 -	Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática ³² .	35
Figura 14 -	Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk ⁴⁰ .	36
Figura 15 -	Voltamograma cíclico típico mostrando a perturbação e a resposta corrente-voltagem, sendo J_{pa} e J_{pc} as densidades de corrente de pico anódica e catódica, respectivamente.	37

Figura 16	Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Pt em meio de uma solução aquosa de 0,07 mol L ⁻¹ de pirrol e 0,1 mol L ⁻¹ de eletrólito suporte: a) NaClO ₄ , b) NaCl, c) NaDDS. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.	40
Figura 17 -	Curva de corrente máxima em função de números de ciclos obtidos pelos voltamogramas cíclicos.	41
Figura 18 -	Estudo da concentração da enzima polifenol oxidase de 10 a 50 U mL ⁻¹ sobre a resposta amperométrica para catecol 3,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7) e 0,1mol L ⁻¹ de eletrólito suporte: a) NaClO ₄ , b) NaCl, c) NaDDS.	44
Figura 19 -	Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,1 mol L ⁻¹) em tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L ⁻¹).	45
Figura 20 -	Curvas cinéticas de Abs. vs tempo obtidas a partir do uso de diferentes concentrações de catecol a uma quantidade fixa de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 6,5.	46
Figura 21 -	Efeito da concentração de substrato (catecol) sobre a velocidade enzimática.	47
Figura 22 -	Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs o inverso da concentração de catecol, para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis-Menten.	48
Figura 23 -	Efeito do pH de 5 a 8,0, nas respostas dos filmes de PPI/PFO eletrossintetizados em uma solução de 0,07 mol L ⁻¹ de pirrol, 3,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de catecol e 0,1 mol L ⁻¹ de : a) NaClO ₄ , b) NaCl c) NaDDS.	50
Figura 24 -	Estudo do potencial operacional sobre a resposta amperométrica para catecol 3,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1mol L ⁻¹ em meio: a)NaClO ₄ , b) NaCl, c) NaDDS.	52
Figura 25 -	Respostas voltamétricas dos filmes de PPI (-----) e PPI/PFO (-----) em meio de tampão fosfato pH 6,5 e que foram preparados em: a) NaClO ₄ , b) NaCl, c) NaDDS.	54
Figura 26 -	AFM dos filmes de PPI e PPI/PFO depositados em eletrodos de platina em meio: a) NaClO ₄ , b) NaCl, c) NaDDS.	56
Figura 27 -	Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaClO ₄ em meios a diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogallol.	58
Figura 28 -	Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaCl em meios a diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogallol.	59

- Figura 29 - Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaDDS em meios a 60 diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogalol.
- Figura 30 - Resposta do biossensor amperométrico em 0,3 V vs ESC em 61 função da concentração de analito em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7 NaClO₄ como eletrólito suporte: a) catecol, b) pirogalol.
- Figura 31 - Resposta do biossensor amepométrico em 0,3 V vs ECS em 62 função da concentração da solução analito em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7 NaCl como eletrólito suporte, a) catecol, b) pirogalol.
- Figura 32 - Resposta do biossensor amepométrico em 0,3 V vs ECS em 63 função da concentração da solução de catecol em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7 NaDDS como eletrólito suporte, a) somente região linear, b) região completa até a saturação.
- Figura 33 - Perfil da estabilidade dos biossensores comparando as respostas 65 amperométricas em função dos números de determinações. Respostas obtidas em solução tampão fosfato 0,1molL⁻¹, v= 50 mVs⁻¹

LISTA DE TABELA

- Tabela 1 - Otimização dos parâmetros de respostas dos filmes de PPI/PFO obtidos em diferentes eletrólitos
- Tabela 2 - Valores de rugosidades dos filmes de PPI e PPI/PFO preparados em diferentes eletrólitos suportes.
- Tabela 3 - Características analíticas dos filmes PPI/PFO/eletrolitos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EQM: Eletrodo quimicamente modificado

ECS: Eletrodo de calomelano saturado

PFO: Polifenol oxidase

UV: Ultravioleta

PPI: Polipirrol

K_m: Constante de Michaelis-Menten

V_{max}: Velocidade Máxima

AFM: Microscopia de Força Atômica

ET: Eletrodo de trabalho

ER: Eletrodo de referência

CE: Contra eletrodo

Pt: Platina

rpm: Rotação por minuto

ΔAbs: Variação de absorbância

Δt: Variação de tempo

(S): Substrato

(P): Produto

F: Constante de Faraday

t: Tempo

VC: Voltametria cíclica

λ: Comprimento de onda

Q_t: Carga total

R: Rugosidade

SUMÁRIO

CAPITULO 1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Biossensores	18
1.2 Polifenol Oxidase (PFO)	21
1.3 Aplicações de polímeros condutores em biossensores	25
1.4 Eletrólito suporte	29
CAPÍTULO 2 PARTE EXPERIMENTAL	31
2.1 Materiais	31
2.1.1 <i>Preparação dos filmes</i>	32
2.2 Métodos	33
2.2.1 <i>Extração e obtenção da atividade polifenol oxidase (PFO)</i>	33
2.2.2 <i>Cinética enzimática</i>	34
2.2.3 <i>Imobilização enzimática</i>	37
2.2.4 <i>Técnicas eletroquímicas</i>	37
2.2.5 <i>Microscopia de força atômica</i>	38
CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	15
3.1 Eletrossíntese do polipirrol (PPI)	40
3.2 Otimização de parâmetros para o biossensor	43
3.2.1 <i>Resposta do biossensor em função da concentração da enzima</i>	43
3.2.2 <i>Estudo da cinética enzimática</i>	46
3.2.3 <i>Efeito do pH</i>	49
3.2.4 <i>Efeito do potencial operacional</i>	52
3.3 Imobilização enzimática	54
3.4 Espectroscopias de força atômica (AFM)	55
3.5 Respostas do biossensor em função a concentração dos analitos.....	58
3.6 Curvas Analíticas.....	61
3.7 Desempenho do biossensor	65
CAPÍTULO 4 CONCLUSÕES.....	67
REFERÊNCIAS.....	69

CAPITULO 1 - INTRODUÇÃO

Este capítulo trata dos aspectos gerais relacionados ao desenvolvimento de biossensores, dentro de um contexto histórico. Os objetivos e a motivação deste trabalho são também apresentados.

Esta dissertação foi dividida da seguinte forma: no CAPITULO 1, apresentamos um breve levantamento histórico sobre biossensores, a motivação e os objetivos que nos levaram realização deste trabalho. No CAPITULO 2, destacam-se os materiais e métodos utilizados na preparação dos sistemas polímeros/enzimas, além da parte instrumental. Os resultados e discussão são apresentados no CAPITULO 3. O CAPITULO 4 apresenta as conclusões desta dissertação.

1. MOTIVAÇÃO

Com o aumento da produção e da utilização de produtos químicos nesta última década, os compostos fenólicos passaram a causar maiores problemas de poluição ambiental, contaminando solos e águas. Atualmente, a preservação do meio ambiente é uma preocupação geral em praticamente todo o mundo.

Os fenóis estão presentes em muitos efluentes de indústrias químicas, destinadas à produção de resinas sintéticas, plásticos, borrachas, corantes, drogas, explosivos, solventes, removedores de tintas, indústrias de papel e celulose e de uma grande variedade de derivados aromáticos¹. Os fenóis podem vir também da biodegradação de substâncias húmicas, taninos e ligninas².

Os fenóis são contaminantes aquáticos, mesmo quando em baixas concentrações, e podem afetar no gosto dos peixes e no odor das águas. Estes compostos, em sua maioria, possuem efeitos tóxicos em animais e plantas, pois penetram facilmente pela pele e pelas membranas celulares, determinando um

amplo espectro de genotoxicidade, mutagenocidade e efeitos hepatotóxicos, além de afetarem as velocidades de reações biocatalizadas no processo de respiração e de fotossíntese^{3,4}.

Os fenóis e os seus derivados são definidos como poluentes perigosos e estão na lista de substâncias perigosas e potencialmente prejudiciais, segundo a resolução CONAMA 20/86. A diretiva 80/778 da comunidade econômica européia determinou que a concentração máxima permitida de fenólicos totais em águas o valor de 0,5 mg L⁻¹ e 0,1 mg L⁻¹ para fenóis individuais^{5,6}.

Desta maneira, há um grande interesse em monitorar a concentração destes contaminantes em águas e efluentes industriais. A detecção destes compostos fenólicos pode ser feita por técnicas de espectroscopia e cromatografia, porém, tais técnicas exigem equipamentos caros e processos demorados de detecção. Dentre as outras formas de detecção de fenóis, cita-se o biossensor, um tipo de sensor que utiliza um material biológico conectado a um transdutor. Nos biossensores é possível encontrar todas as características importantes para a detecção de diferentes compostos fenólicos, de maneira rápida e eficiente⁷.

1.1 Biossensores

A necessidade de se fazer determinações analíticas rápidas, seletivas e com uma alta sensibilidade acelerou a pesquisa na área de biossensores. Estes dispositivos integram um elemento biológico com um transdutor sensorial físico e apresentam um enorme potencial para a detecção de um grande número de analitos nos campos de análise clínica, alimento e ambiental.

Os biossensores podem ser considerados um subgrupo dos sensores químicos, sendo o receptor um elemento biológico⁸. Segundo a IUPAC, um biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informações analíticas “específicas” quantitativas ou semi-quantitativas por meio de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que pode estar em contato espacial direto com o elemento de transdução⁹. Sendo assim, ele é constituído por duas partes, o

componente biológico e o transdutor. A Figura 1 ilustra o esquema de um biossensor.

Figura 1 - Esquema de um biossensor¹⁰.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento transdutor, que pode ser eletroquímico (amperométrico, potenciométrico, condutimétrico), óptico (por medidas de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc), e detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezoelétrico a uma variação de massa). Ou ainda de acordo com o componente biológico: enzimas, organelas, tecido vegetal ou animal, microorganismos, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, dentre outros¹¹. Quando a enzima é o componente biológico e o transdutor é eletroquímico, os biossensores são também chamados de eletrodos enzimáticos¹². Nesse caso, trata-se de um eletrodo quimicamente modificado (EQM), no qual o processo de reconhecimento biológico está associado a um transdutor eletroquímico, que irá converter o sinal biológico em um sinal elétrico.

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark em 1962¹³ e, desde então, iniciou-se uma grande busca por melhorias de suas propriedades e diversos outros biossensores foram sendo construídos utilizando diferentes enzimas e procedimentos de imobilização. Os biossensores podem ser classificados de acordo com suas gerações. Os biossensores de primeira geração são aqueles baseados na eletroatividade do substrato (eletrodo) ou no produto da reação enzimática. Eles apresentam problemas de interferências devido à necessidade de uso de potenciais muito altos. Depois, surgiram os biossensores da segunda geração, com o emprego de mediadores de elétrons cuja função era o transporte de elétrons entre a enzima e

o eletrodo. Entretanto, estes biossensores também podem apresentar problemas de interferências, uma vez que, podem ocorrer transferências de elétrons provenientes de reações redox paralelamente à ocorrência da reação entre a enzima e o eletrodo¹⁴. Os biossensores da terceira geração se baseiam na transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo na ausência de mediadores, sendo esta característica bastante vantajosa, já que leva a uma maior seletividade dos biossensores que operam em potenciais mais próximos ao da própria enzima. Com isto, diminui, como consequência, a ocorrência de reações interferentes e, o uso de outros reagentes na sequência das reações enzimáticas é dispensável¹⁵.

Para a detecção de compostos fenólicos, o biossensor amperométrico é o mais indicado, já que ele possibilita a medida da corrente gerada por reações biocatalíticas redox de espécies eletroativas na superfície do eletrodo em potenciais próximos a 0,0 mV vs ECS (eletrodo de calomelano saturado), região onde o efeito de interferentes é menor⁶.

Uma das etapas mais importante na construção de um biossensor amperométrico é a escolha da enzima, que pode ser combinada à busca por baixo custo, alta sensibilidade e seletividade. Assim, pode-se também discriminar entre diferentes eletrodos modificados, normalmente preparados pela deposição de filmes poliméricos sobre um eletrodo metálico, seguido da imobilização de enzimas, e que catalisam com eficiência reações biológicas e possuem alta seletividade¹⁶.

Na construção de biossensores amperométricos para fenóis, as enzimas polifenol oxidase (PFO), lacase e peroxidase são as mais utilizadas e embora com diferentes mecanismos de atuação, elas podem ser esquematizadas por meio de uma sequência de reações similares, conforme Figura 2¹⁷.

Figura 2 - Mecanismo das reações em eletrodos enzimáticos para a determinação de compostos fenólicos. Ered e Eox são os potenciais das formas reduzidas e oxidadas, respectivamente, das enzimas, CF = composto fenólico ⁹.

1.2 Polifenol oxidase (PFO)

As enzimas são proteínas que catalisam com eficiência reações biológicas e aceleram várias reações metabólicas importantes. Por possuírem alta seletividade e poder catalítico, as enzimas vêm sendo empregadas em química analítica, bem como na medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e em estudos ambientais⁹.

A polifenol oxidase (PFO), descoberta em 1895 por Bourquelot e Bertrand, é também conhecida como tirosinase, fenolase, catecol oxidase e creolase, é distribuída com abundância na natureza, presente em muitas frutas e vegetais, sendo a responsável pelo efeito de escurecimento^{38,17}.

A PFO é bastante usada nos biossensores eletroquímicos na determinação de compostos fenólicos em amostras biológicas, alimentos e no meio ambiente ¹⁸. A PFO é uma enzima monoxigenase contendo em sua forma oxigenase dois átomos de cobre (II) como sítios ativos, cada um coordenado a três moléculas de histidina, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial mais fraca, como mostra a Figura 3¹⁹.

Figura 3 - Modelo esquemático do sítio ativo da (PFO) ¹⁸.

Um esquema estrutural da PFO está representado na Figura 4, onde a superfície molecular está representada pela cor vermelha e os átomos de cobre em verde. No esquema E, as fitas azuis representam a histidina onde se nota que cada átomo de cobre no interior do sítio ativo está realmente complexado com a histidina.

Figura 4 - Representação do esquema estrutural da PFO. Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO_figure.jpeg#filelinks.

A PFO catalisa duas diferentes reações, a *o*-hidroxilação de monofenóis a *o*-difenois e a oxidação de difenois a quinonas, e ambas as reações em presença de oxigênio molecular²⁰. As equações 1 e 2 apresentam as reações de oxidação do catecol pela PFO. A Figura 5 ilustra detalhadamente o ciclo catalítico da PFO.

Figura 5 - Ciclo catalítico da PFO na oxidação de mono e difenóis a o-quinona na presença de oxigênio²¹

Uma etapa muito importante na construção de um biossensor é a imobilização da enzima, que deve estar ligada de maneira adequada ao transdutor e facilitar a transferência de elétrons. Com isto, é possível se ter um biossensor viável, com uma boa sensibilidade e estabilidade operacional. O principal interesse em imobilizar eficientemente uma enzima em uma matriz é para se obter um biocatalisador com uma atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante as medidas analíticas. A literatura sugere diversos métodos de imobilização, como apresentado no fluxograma da Figura 6.

Figura 6 – Alguns métodos de imobilização de enzimas²².

A imobilização de uma enzima por adsorção física consiste em reter a biomolécula nas proximidades da superfície do transdutor por meio de forças de ligações devido às pontes de hidrogênio, Van der Waals e pela formação de sítios complexos de transferências de elétrons. As vantagens desta técnica são: ausência de modificação da biomolécula, baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz. Na adsorção química covalente, ocorre uma ligação entre os grupos funcionais da molécula biológica e uma matriz de suporte, tais como os filmes

poliméricos. Esta técnica tem como vantagem a baixa resistência disfuncional e como desvantagem o fato de a matriz de suporte não ser regenerável.

A imobilização por confinamento se dá pela aplicação de um potencial apropriado ao eletrodo de trabalho, que é imerso em uma solução aquosa contendo o material biológico de interesse e o monômero. O material biológico presente na vizinhança do eletrodo é então incorporado durante o crescimento do polímero, por aprisionamento no eletrodo, sem reações químicas afetem a atividade do material. Neste método, é possível se controlar a espessura da camada polimérica por meio de medidas da carga elétrica total durante a polimerização eletroquímica. A maior vantagem deste método sobre os outros é a possibilidade de se gerar um polímero cobrindo uma parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa²³.

Na imobilização por ligação cruzada utiliza-se um reagente bifuncional, tal como o glutaraldeído ou multifuncional tal como o hexametileno di-isocianato, para a imobilização da molécula em vários tipos de suportes sólidos²⁴. Ao usar esta técnica, é necessário que se preocupe com a acessibilidade do componente bioativo e a vantagem dela é que a perda da atividade do componente biológico é mínima e o custo é moderado²⁵.

1.3 Polímeros condutores com matrizes de enzimas

Os polímeros condutores apresentam uma sequência de ligações duplas conjugadas na estrutura e passam de isolantes a condutores por meio de um processo de oxidação ou redução com a incorporação de íons, processo este denominado de dopagem²⁶. Em alguns casos, a dopagem pode ser simultaneamente protônica e oxidativa, tal como no caso de alguns polímeros, como a polianilina. Essas reações redoxes proporcionam um aumento da mobilidade dos elétrons e também da condutividade dos polímeros²⁶. A reação de dopagem de um polímero conjugado envolve um processo de transporte de carga com contra-íons compensadores de carga se difundindo através do polímero na forma de um filme²⁷. Em geral, a condutividade de um polímero conjugado depende de alguns fatores, tais como a difusão ou migração de contra-íons no filme para se manter a

eletroneutralidade, o tipo de solvente, morfologia, concentração do monômero, potencial, carga ou corrente aplicados. Além disso, diferentes propriedades dos polímeros podem ser obtidas após se alterar as várias funcionalidades do monômero escolhido antes da polimerização²⁷.

Os polímeros condutores podem ser sintetizados por via eletroquímica ou química. A síntese de polímeros condutores mais comuns, tais como polipirrol, politiofeno e polianilina, é por eletropolimerização, sendo o polímero obtido como um filme fino sobre a superfície de um eletrodo.

Na Figura 7, são observadas algumas estruturas de polímeros orgânicos que podem ser sintetizados quimicamente ou eletroquimicamente e utilizados para a detecção direta de analitos ou para imobilização de espécies bioativas visando a construção de biossensores.

Polímero condutor	Condutividade / S cm ⁻¹
Poliacetileno	10 ³ a 10 ⁶
Polianilina	10 a 10 ³
Polipirrol	600
Politiofeno	200
Poli(p-fenileno)	500
Poli(p-fenileno vinileno)	1

Figura 7 - Estrutura de alguns polímeros condutores²⁸.

Um critério importante na seleção de um polímero para ser usado na fabricação de um biossensor é a facilidade com que ele pode ser oxidado ou reduzido. Os elétrons π podem ser adicionados ou removidos da cadeia polimérica sem a destruição das ligações necessárias à estabilidade da macromolécula²⁹ e para uso em biossensores é de interesse a facilidade no controle das variáveis que influenciam a formação dos filmes e que levam a diferentes morfologias e propriedades condutoras destes polímeros.

O principal papel do uso de polímeros como matrizes de biomoléculas é proporcionar um sítio favorável à imobilização das biomoléculas sem que ocorra a desnaturação fisiológica. O segundo papel é desempenhar a função de transdução e de emissão de dados. Na prática, deve-se monitorar a mudança do potencial eletrônico que ocorre quando a biomolécula imobilizada se acopla ou reage com um analito, tal como em uma ligação chave-fechadura³⁰. Na Figura 8, pode-se ver uma ilustração deste sistema.

Figura 8 - Monitoramento eletrônico do acoplamento entre as moléculas³¹.

Dentre os polímeros usados como matrizes de enzimas, o polipirrol (PPI) é um dos mais aplicados pela sua boa estabilidade química, versatilidade de aplicação e disponibilidade para uma ampla variedade de espécies biológicas (biocompatibilidade). A vantagem do PPI em relação a outros polímeros, tais como o politiofeno e a polianilina, está na ampla possibilidade de uso de solventes, inclusive água e de vários tipos de contra-íons, em sua síntese, e que afetam diretamente as suas propriedades finais, tais como adesão, condutividade, morfologia, resistência mecânica e reatividade química³². A Figura 9 mostra um mecanismo proposto para a eletro-oxidação do pirrol.

Figura 9 - Mecanismo de reação proposto para o processo de eletropolimerização do pirrol³³

A primeira etapa (oxidação do monômero) é lenta, mas o acoplamento radical-radical, a desprotonação e a oxidação subsequentes são rápidas, sendo que o crescimento da cadeia vai ocorrendo até que sua carga seja tal que um contra-íon é incorporado. Todo o processo inicial pode ocorrer na interface eletrodo/solução até que o limite de solubilidade de oligômeros formado seja excedido e ocorra uma precipitação na superfície do eletrodo e a consequente formação de um polímero. A própria camada de PPI depositada torna-se um reagente que determina o curso do restante do processo de polimerização³⁴.

1.4 Eletrólito de suporte

Um eletrólito de suporte é um composto iônico cuja concentração é maior entre 10 e 100 vezes do que as de outras espécies presentes em uma solução em uma célula eletroquímica. Para escolher um eletrólito de suporte, é preciso levar em consideração a sua solubilidade, grau de ionização e estabilidades química e eletroquímica no solvente a ser empregado durante a obtenção de uma resposta eletroquímica de um eletrodo³⁵.

Os eletrólitos de suporte são responsáveis por quase toda a resposta de corrente iônica em uma célula eletroquímica, pois a alta concentração do eletrólito de suporte mantém baixa a resistência de um eletrodo. Com a sua presença, é possível se manter constante a força iônica da solução e impedir mudanças na interface eletrodo-solução. Finalmente, o eletrólito de suporte suprime a contribuição da corrente de migração no transporte do analito para a superfície do eletrodo³⁵.

Em meio aquoso, são muito empregados como eletrólitos de suporte sais que não apresentam hidrólise significativa e nem formam complexos com íons metálicos³⁶, tais como: percloratos, nitratos, sulfatos de sódio e de potássio.

A Figura 10 mostra dois esquemas da interface eletrodo/solução (eletrólito) para um eletrodo quimicamente modificado. No esquema A, a espécie eletroativa oxidada (Ox) recebe um elétron da superfície do eletrodo ao ser aplicado um potencial e é reduzida a Red, quando a varredura de potencial é invertida, a espécie é novamente oxidada³⁷. No esquema B, em um processo eletrocatalítico a espécie eletroativa age como mediador de elétrons entre o eletrodo e o substrato que, na ausência deste mediador, sofreria uma reação de redução, ou oxidação, mais lenta ou em um potencial mais alto³⁶.

Figura 10 - Esquema representativo da interface eletrodo/solução eletrólito: (a) para espécie eletroativa; (b) para espécie eletrocatalítica.

Neste trabalho, foi verificado a atuação de diferentes eletrólitos de suporte na polimerização do pirrol, o NaClO_4 , NaCl e NaDDS foram utilizados como eletrólitos.

1.5 Objetivos

Este trabalho de Mestrado teve os seguintes propósitos:

- ✓ Estudar as características de filmes de PPI eletrossintetizados em diferentes eletrólitos de suporte e utilização destes filmes como matrizes para a imobilização da PFO e na construção de biossensores amperométricos para a detecção de analitos fenólicos;
- ✓ Preparar biossensores amperométricos à base de extrato bruto de abacate (*Persea americana*) como fonte enzimática;
- ✓ Otimizar a resposta dos biossensores a partir das variações dos seguintes parâmetros: concentração da enzima, pH, potencial operacional e concentração de catecol durante a obtenção das respostas dos biossensores;
- ✓ 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});
- ✓ Avaliar as respostas dos biossensores na detecção de catecol e pirogalol.

CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo, apresentamos os materiais e métodos utilizados no preparo dos filmes de polipirrol e na imobilização da enzima, polifenol oxidase, discriminando os equipamentos utilizados.

2.1 Materiais

Para o preparo das soluções de eletrólitos de suporte foram utilizados três sais de sódio dissolvidos em água ultrapura, cloreto de sódio (NaCl), perclorato de sódio (NaClO₄) e dodecilssulfato de sódio (NaDDS). Todas as soluções foram preparadas com água obtida pelo sistema de purificação do tipo Mili-Q, que apresenta uma resistividade de 18,2 MΩ e pH ~ 5,7.

O pirrol foi utilizado como monômero para o preparo dos filmes de polipirrol (PPI), sendo adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich. Ele foi purificado por destilação em pressão reduzida, para eliminar impurezas, e foi estocado em baixa temperatura em um refrigerador e ao abrigo da luz para impedir processos de oxidação. A Figura 12 mostra as estruturas químicas do pirrol, catecol e pirogallol. Os analitos utilizados foram catecol e pirogallol, obtidos pela Sigma-Aldrich e usados como recebidos. A polifenol oxidase (PFO) foi utilizada como extrato bruto do abacate (*Persea americana*) e obtido a partir de procedimento descrito por Lupetti et al ³⁸.

<p>a) Catecol</p>	<p> Massa molar = 110,1 g/mol Densidade = 1.344 g/cm³ Ponto de fusão = 105 °C Ponto de ebulição = 245,5°C </p>
<p>b) Pirogalol</p>	<p> Massa Molar = 126,11 g/mol Densidade = 1,45 g/cm³ Ponto de fusão = 131-134 °C Ponto de ebulição = 309 °C </p>
<p>c) Pirrol</p>	<p> Massa Molar = 67,09g/mol Densidade = 0,97 g/cm³ Ponto de fusão = -24 °C Ponto de ebulição = 130 °C </p>

Figura 11 - Estruturas químicas e dados sobre: (a) catecol, (b) pirogallol (c) monômero pirrol

2.1.1 Preparação dos filmes de PPI

Os filmes de PPI foram preparados por eletrodeposição utilizando um potenciostato-galvanostato EG&PAR 283. A célula eletroquímica usada era convencional de compartimento único com três eletrodos, o eletrodo de trabalho (ET), o contra eletrodo (CE) e o eletrodo de referência (ER), tendo uma tampa de teflon que serviu para fixar estes eletrodos (Figura 13). O ET era de Pt, com área de 0,5 cm², o CE, uma placa de Pt, com área de 1 cm², e o ER, calomelano saturado (ECS).

Figura 12 - Célula eletroquímica com entrada para três eletrodos.

Inicialmente, as superfícies do ET e do CE foram limpas por polimento manual, utilizando-se uma flanela embebida em uma suspensão de alumina. Em seguida, os eletrodos foram lavados com água ultrapura e, depois, fixados na célula eletroquímica para se iniciar o processo de eletropolimerização.

2.2 Métodos

2.2.1 Extração e obtenção da atividade da polifenol oxidase (PFO)

O processo de extração da enzima, PFO, foi o mesmo descrito por Lupetti³⁸: em um liquidificador foram misturados 25 g de abacate, 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7 e 2,5 g do composto polyclar SB 100 por 3 min. A mistura foi centrifugada a 15000 rpm a 4 °C por 30 min. O total do sobrenadante foi dividido em

frascos opacos de 10 mL e que foram estocados sob baixa temperatura em um refrigerador até o seu uso.

O extrato bruto enzimático pode conter impurezas que dificultam a quantificação da atividade da enzima. Porém, a atividade enzimática pode ser expressa em termos de unidades de atividade (UA), que é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidades de absorbância por min. A atividade enzimática da PFO na forma de extrato bruto de abacate foi determinada pelo monitoramento da absorção de luz a um comprimento de onda de 410 nm, ou seja, na banda típica da o-quinona conforme verificamos experimentalmente. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 10 mm e as medidas foram realizadas durante os primeiros 180 s após a adição de 2,8 mL de uma solução de catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7 em temperatura ambiente. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 1³⁹:

$$A = \frac{\Delta abs \times 1000}{\Delta t \times V}, \quad (1)$$

onde A é a atividade enzimática, Δabs é a variação de absorbância no comprimento de onda de 410 nm, Δt é o intervalo de tempo de reação e V é o volume da solução enzimática.

2.2.2 Cinética enzimática

O estudo de cinética enzimática é fundamental para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas dentro e fora das células. Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten inicialmente propuseram que em uma reação enzimática primeiro a enzima combina reversivelmente com seu substrato (S) para formar um complexo enzima-substrato (ES), em uma etapa reversível relativamente rápida, após determinado tempo⁴⁰. O complexo (ES) se quebra em uma segunda etapa,

mais lenta, para produzir a enzima livre e o produto da reação (P), segundo a reação 2.

onde k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes de reação inicial.

Assim, a equação de Michaelis-Meten expressa a velocidade inicial de uma reação catalisada por enzima (V_0) em termos da concentração do substrato $[S]$ ⁴⁰. Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade de uma reação enzimática pode ser expressa como (3):

$$V_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

onde $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima, quando toda enzima está presente como ES, e K_m , a concentração do substrato na qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima, ou seja, a constante de dissociação (4):

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

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ podem ser obtidos pelo gráfico da velocidade em função da concentração do substrato, como mostra na Figura 14.

Figura 13 - Efeito da concentração do substrato sobre a velocidade de uma reação enzimática³².

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

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

Rearranjando a equação 5 temos:

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

que é chamada de equação de Lineweaver-Burk e que permite se obter um gráfico de equação $\frac{1}{V_0}$ contra $\frac{1}{[S]}$ na forma de uma reta com inclinação $\frac{K_m}{V_{máx}}$ e intercepção

no eixo $\frac{1}{V_0}$ como $\frac{1}{V_{máx}}$ e no eixo $\frac{1}{[S]}$, $-\frac{1}{K_m}$.

Figura 14 - Gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.⁴⁰

2.2.3 Imobilização enzimática

Aqui, a PFO foi imobilizada nos filmes de PPI em uma única etapa. Inicialmente, foi feita a diluição da solução de PFO na solução do eletrólito de suporte já contendo o pirrol. A deposição dos filmes de PPI/PFO foi então realizada por voltametria cíclica (processo de adsorção física).

2.2.4 Técnicas eletroquímicas

A voltametria cíclica (VC) (Figura 16) é uma das técnicas mais utilizadas para o preparo de filmes poliméricos e para se obter informações sobre a presença de espécies químicas em soluções e/ou adsorvidas sobre a superfície de um eletrodo. Após a aplicação de uma varredura de potenciais, a certa velocidade, são obtidas curvas de corrente-potencial, que são cíclicas por repetirem a varredura linear várias vezes indo de um potencial inicial até um potencial final, sucessivamente.

Figura 15 - Voltamograma cíclico típico mostrando a perturbação e a resposta corrente-voltagem, sendo J_{pa} e J_{pc} as densidades de corrente de pico anódica e catódica, respectivamente.

Neste trabalho, a técnica de voltametria cíclica foi amplamente utilizada para o preparo e a obtenção das respostas eletroquímicas dos filmes de PPI e PPI/PFO.

A amperometria é uma outra técnica eletroquímica de análise quantitativa e que permite se determinar a concentração de uma solução, tendo como base a medida da intensidade de corrente de eletrólise. Neste caso, o potencial é mantido constante durante um tempo pré-determinado. A curva corrente versus tempo ($i \times t$) obtida permite com que se obtenha informações sobre a variação de carga entre o ET e o CE e que está associada à ocorrência de reações na interface eletrodo/solução⁴¹. Utilizamos a amperometria nas etapas de otimização das respostas dos biossensores, tais como na obtenção dos valores de pH, potencial operacional, concentração enzimática e, na detecção dos analitos.

2.2.5 Microscopia de força atômica

A técnica de microscopia de força atômica, no inglês AFM (*atomic force microscope*) permite a resolução de átomos individuais tanto em superfícies condutoras quanto em isolantes. Nesta técnica, uma alavanca flexível e sensível a uma variação de força é deslocada em um padrão de rastreamento sobre a superfície da amostra. A força que age entre a alavanca e a superfície causa flexões diminutas da alavanca e que são detectadas por meios ópticos⁴¹. Por permitir a

obtenção de imagens de superfície de amostras sob as mais variadas condições no ar, vácuo e em meios líquidos, o microscópio de força atômica é um dos equipamentos mais completos para o estudo de materiais em micro e nano escala.

Na técnica de AFM trabalha-se semelhantemente a uma agulha de toca-discos (vinil), onde, no lugar da agulha, encontra-se o cantilever, uma haste flexível com uma ponta na parte inferior com dimensões de alguns microns. Para percorrer a amostra é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz) e com precisão de angstroms (Å)⁴².

CAPITULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes à preparação e caracterização dos filmes de polipirrol (PPI) e da imobilização da enzima, polifenol oxidase (PFO), na matriz polimérica para aplicação em biossensores. Mostraremos como algumas variáveis, tais como pH e potencial, influenciam no comportamento eletroquímico dos filmes poliméricos. Discutiremos o comportamento dos biossensores quando em presença de alguns compostos fenólicos e as suas respectivas curvas analíticas.

3.1 Eletrossíntese dos filmes de polipirrol (PPI)

Na Figura 16 podem ser observados os voltamogramas cíclicos durante o processo de formação dos filmes de PPI nos eletrodos de Pt em meio aquoso contendo NaClO_4 , NaCl e NaDDS até se atingir 10 ciclos. Em todos os casos, podemos observar que houve um aumento da densidade de corrente com o número de ciclos, indicando assim um aumento da espessura do filme com os ciclos sucessivos. Observa-se também que no preparo dos filmes eletrossintetizados em meio NaClO_4 , os voltamogramas apresentaram uma maior resposta de densidade de corrente, indicando que este meio é mais favorável aos processos de oxidação do polipirrol em solução de ClO_4^- ⁴³.

A Figura 17 mostra a resposta da densidade de carga versus número de ciclos durante a formação dos filmes de PPI em cada eletrólito de suporte até atingir 50 ciclos. Um aumento linear da densidade de carga indica que uma mesma quantidade de material está sendo adsorvida a cada ciclo. Este efeito foi observado para as eletrossínteses do PPI em meio NaCl e NaDDS , mas não em meio a NaClO_4 , quando são vistas duas inclinações de reta.

Figura 16 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de Pt em meio de uma solução aquosa de $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de eletrólito suporte: a) NaClO_4 , b) NaCl , c) NaDDS . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Figura 17 - Curva de corrente máxima em função de números de ciclos obtidos pelos voltamogramas cíclicos.

As espessuras dos filmes foram calculadas segundo a equação ⁴⁴:

$$e = \frac{Q}{2F\rho} \left(\frac{M_M + M_A}{y} \right)$$

Onde: Q = carga total

F = constante de Faraday

ρ = densidade do material composto (PPI)

M_M e M_A = massa molecular do monômero e do anion

y = grau de inserção do dopante

Foram encontrados os valores de 2,7 μm para o filme preparado em meio de NaClO_4 , 0,8 μm em NaCl e 2,4 μm para os filmes preparados em NaDDS . Estes resultados mostram que a espessura dos filmes é proporcional a densidade de carga.

Devido às condições experimentais favoráveis para o crescimento do PPI todos os filmes foram testados como protótipos de biossensores.

3.2 Otimização dos parâmetros de preparo dos biossensores

Para o preparo de um biossensor é de grande importância se avaliar as suas melhores condições de operação. Como a enzima é muito sensível, pode-se variar a sua atividade de acordo com as condições do meio e vários são os fatores para se manter o sítio enzimático ativo e assim evitar a perda de atividade catalítica, ou seja, que não ocorra a desnaturação. Desta maneira, é necessário otimizar as condições operacionais dos biossensores e estabelecer os parâmetros necessários para que eles respondam com eficiência.

3.2.1 Resposta dos biossensores em função da concentração da enzima

Um fator importante para a construção de um biossensor com um melhor desempenho é se ter um conhecimento sobre a quantidade de enzima necessária para o melhor desempenho dos mesmos, já que uma alta quantidade de enzima imobilizada pode causar uma diminuição nas respostas amperométricas dos biossensores. Aqui foram construídos biossensores após se variar as concentrações da enzima usadas durante a imobilização, na faixa de 10 a 50 U mL⁻¹, e obtidas as curvas de corrente anódica máxima para cada biossensor versus concentração de enzima.

Conforme mencionado anteriormente, a PFO foi imobilizada por adsorção física, ou seja, a enzima a dada concentração foi adicionada à solução contendo o monômero e o eletrólito de suporte para a eletropolimerização do pirrol. As curvas obtidas estão apresentadas na Figura 18.

A Figura 18a mostra o efeito da concentração de enzima nos valores de densidade de corrente durante o preparo dos filmes de PPI/PFO. Em meio de NaClO₄, nota-se um aumento da densidade de corrente com o aumento da concentração de enzima até 30 U mL⁻¹, mantendo-se constante até 40 U mL⁻¹ e diminuindo para valores maiores. Portanto, neste meio, a faixa de valores máximos de quantidade de enzima ficou entre 30 U mL⁻¹ e 40 U mL⁻¹ e optou-se por trabalhar

com uma concentração de enzima de 37 U mL^{-1} para os filmes preparados em meio a NaClO_4 .

Em meio de NaCl (Figura 18b), pode-se observar um aumento linear da densidade de corrente até cerca de 20 U mL^{-1} , onde são atingidos valores aproximadamente constantes e uma diminuição brusca a partir de 45 U mL^{-1} . Neste caso a concentração de trabalho escolhida para este sistema foi de 40 U mL^{-1} .

Já para o meio de NaDDS , Figura 18c, uma quantidade menor de enzima foi necessária para um máximo de resposta do biossensor, já que observou-se um aumento na densidade de corrente de 10 a 30 U mL^{-1} , diminuindo para concentrações maiores. Para este sistema utilizamos uma quantidade de enzima de 30 U mL^{-1} .

Figura 18 - Estudo da concentração da enzima polifenol oxidase de 10 a 50 U mL^{-1} sobre a resposta amperométrica para catecol $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7) e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de eletrólito suporte: a) NaClO_4 , b) NaCl , c) NaDDS .

3.2.2 Estudo da cinética enzimática

A Figura 19 mostra o espectro de absorbância na região de UV-VIS de uma solução da enzima em meio de catecol, que apresenta uma banda intensa por volta de 410 nm, típica de uma estrutura do tipo quinona (solução amarelada) formada pela oxidação catalítica do catecol.

Figura 19 - Espectro de absorção de uma solução contendo PFO (0,2 mL) e catecol (0,1 mol L⁻¹) em tampão fosfato pH 6,5 (0,05 mol L⁻¹).

A cinética enzimática foi monitorada por meio de medidas da variação da absorbância durante a reação de oxidação do catecol catalisada pela PFO com o comprimento de onda fixado em 410 nm. Este monitoramento foi realizado para diferentes concentrações de catecol e a Figura 20 mostra as curvas obtidas.

Figura 20 - Curvas cinéticas de Abs. vs tempo obtidas a partir do uso de diferentes concentrações de catecol a uma quantidade fixa de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 6,5.

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos pelo gráfico da velocidade em função da concentração do substrato, como mostra a Figura 21. As medidas foram realizadas a partir de uma concentração fixa de enzima, tanto podemos observar na Figura 21 que a velocidade da reação enzimática aumenta com a concentração do substrato até atingir um valor limite de aproximadamente 17 mmol s⁻¹. A partir de então, o aumento da concentração de substrato não afeta mais a velocidade e quando a velocidade atinge a metade do seu valor máximo, ou seja, $V = V/2$, a constante de Michaelis é igual à concentração do substrato ($K_m = S$). No caso o valor de K_m obtido foi de aproximadamente 2,0 mmol L⁻¹. O parâmetro K_m representa a afinidade da enzima pelo substrato (no nosso caso, catecol), quanto menor o seu valor, maior a afinidade, o que reflete na sensibilidade.

Figura 21 - Efeito da concentração de substrato (catecol) sobre a velocidade enzimática

Os parâmetros cinéticos (K_m e $V_{\text{máx}}$) também foram analisados no método de Lineweaver-Burk (Figura 22), mantendo constantes a temperatura e o pH das soluções enquanto se variava a concentração do substrato. Foram encontrados os valores de $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$ para K_m e $17,3 \text{ mmol L}^{-1}/\text{s}$ para $V_{\text{máx}}$ para a enzima livre (não imobilizada). Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois se verificou que a PFO obedece à equação de Michaelis-Menten, e o valor de k_m encontrado para enzima livre foi menor do que o valor de k_m na literatura que é de 4 mmol L^{-145} .

Figura 22 - Ajuste linear do gráfico obtido pelo inverso da velocidade inicial vs o inverso da concentração de catecol, para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis-Menten.

3.2.3 Efeito do pH

As enzimas apresentam uma atividade máxima em uma determinada faixa de pH, ou seja, em valores de pH maiores ou menores aos desta faixa a atividade das enzimas diminui. Este efeito pode ser explicado pela presença de cadeias laterais de aminoácidos presentes no centro ativo da enzima e que podem atuar como ácidos ou bases fracas, impedindo o desempenho funcional da enzima. Para o máximo de atividade da enzima são necessários certos estados de ionização, que desempenham papéis essenciais nas interações intramoleculares e mantém assim a integridade estrutural da proteína ⁴⁰.

Aqui, a investigação sobre qual seria o melhor pH para a resposta dos filmes PPI/PFO foi feita a partir do uso de uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com uma variação de pH entre 5 e 8, ou seja, prevenindo a perda de atividade da enzimática pela acidez ou alcalinidade do meio. A Figura 23 mostra as respostas de densidades de corrente dos filmes de PPI/PFO obtidos em meio de NaClO_4 , NaCl e NaDDS em função do pH. Para filmes obtidos em meio de NaClO_4 , apresentado na Figura 23a,

observa-se um aumento na densidade de corrente até o valor de pH 7; de 7 a 7,5 não há variação significativa na resposta e há uma diminuição a partir de 7,5. Portanto, o pH 7 foi o escolhido como o melhor para este filme.

Para o filme preparado em NaCl Figura 23b, a resposta aumentou até pH 6 e diminuiu para pH maiores, sendo a melhor resposta obtida em pH 6.

Para o meio de NaDDS Figura 23c, manteve-se uma resposta constante até pH 6, com um máximo de atividade enzimática em pH 7, que foi escolhido como pH ótimo neste meio.

Figura 23 - Efeito do pH de 5 a 8,0, nas respostas dos filmes de PPI/PFO eletrossintetizados em uma solução de $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de : a) NaClO_4 , b) NaCl c) NaDDS .

3.2.4 Efeito do potencial operacional

A obtenção do potencial operacional também é um fator importante na caracterização de um biossensor, pois pode contribuir para que se busque um aumento da sensibilidade e seletividade do biossensor. Neste trabalho, foi feito um estudo em busca do potencial operacional em uma faixa de 0,1 a 0,6 V até se obter a melhor resposta amperométrica para os filmes PPI/PFO na detecção de catecol. Este estudo foi realizado em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e no pH de máxima atividade enzimática para os diferentes filmes obtidos.

Para o filme preparado em meio de NaClO_4 , Figura 24a, podemos observar que há inicialmente um aumento na densidade de corrente até ficar constante entre os valores de potencial de 0,2 e 0,3 V e apresentou uma queda significativa, o que nos leva a concluir que a enzima se desnaturou e perdeu a atividade para valores superiores a 0,3 V. O potencial escolhido para alcançar uma maior sensibilidade na resposta para este sistema foi de 0,2 V.

Em meio a NaCl e NaDDS, Figura 24b e 24c respectivamente observou-se um comportamento distinto, onde há um aumento acentuado em 0,3 V e uma diminuição para valores maiores, sendo o potencial de 0,3V o escolhido como operacional em ambos os meios.

Figura 24 - Estudo do potencial operacional sobre a resposta amperométrica para catecol $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em meio: a) NaClO_4 , b) NaCl , c) NaDDS

Os resultados obtidos nesta seção estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Otimização dos parâmetros de respostas dos filmes de PPI/PFO obtidos em diferentes eletrólitos

Eletrólito	Enzima (U mL⁻¹)	pH	Potencial (mV)
NaClO ₄	37	7	0,2
NaCl	40	6	0,3
NaDDS	30	7	0,3

3.3 Imobilização enzimática

Como descrito no capítulo Materiais e Métodos, a imobilização da PFO nos filmes de PPI foi feita em uma única etapa por adsorção física, sendo a enzima adicionada à solução de eletropolimerização juntamente com o monômero e o eletrólito de suporte. A imobilização de enzimas por esta metodologia é relativamente simples, de baixo custo e muito utilizada na literatura. Porém, como as enzimas são altamente dependentes dos valores de pHs, tipos de substratos e da temperatura do meio, elas podem sofrer lixiviação da matriz polimérica após a alteração destes parâmetros. Assim estudamos aqui as variações nas respostas eletroquímicas dos filmes de PPI após a imobilização da PFO. Estas variações estão relacionadas à estabilidade dos filmes frente às variações sucessivas de potenciais.

Na Figura 25 são mostradas as respostas eletroquímicas dos filmes de PPI e PPI/PFO quando preparados nos diferentes eletrólitos de suporte, NaClO₄, NaCl e NaDDS. Na Figura 25a não houve mudança significativa de potencial em presença de PFO o que significa uma possível estabilidade do filme e apresentou uma densidade de corrente máxima de aproximadamente 1 mA cm⁻². No filme preparado em meio a NaCl (Figura 25b) observou-se um pico de oxidação mais definido por volta de 200 mV quando preparado na presença de enzima e uma resposta um pouco menos estável com os sucessivos ciclos quando comparado com o meio de NaClO₄. Esse sistema apresentou uma densidade de corrente máxima de 0,75 mA cm⁻². Já para o filme preparado em meio a NaDDS observa-se um aumento de

densidade de corrente na presença de PFO, indicando uma maior instabilidade do filme. Este sistema apresentou uma densidade de corrente máxima de $0,5 \text{ mA cm}^{-2}$.

Figura 25 - Respostas voltamétricas dos filmes de PPI (-----) e PPI/PFO (-----) em meio de tampão fosfato pH 6,5 e que foram preparados em: a) NaClO_4 , b) NaCl , c) NaDDS .

3.4 Microscopia de força atômica (AFM)

Os filmes de PPI e PPI/PFO foram estudados por AFM e as imagens obtidas podem ser vistas na Figura 26.

Nessas imagens, as regiões mais escuras correspondem aos “vales” ou depressões, quanto mais clara é a região, maior é a altura do ponto observado, que corresponde o máximo do eixo z. Em linhas gerais, podemos dizer que a morfologia dos filmes muda com o tipo de eletrólito de suporte utilizado em suas eletrossínteses e com a presença da enzima nos filmes de PPI.

Os valores de RMS (rugosidade média quadrática) e Ra (rugosidade média aritmética) dos filmes de PPI e PPI/PFO estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de rugosidades dos filmes de PPI e PPI/PFO preparados em diferentes eletrólitos suportes

	NaClO ₄	NaClO ₄ /PFO	NaCl	NaCl/PFO	NaDDS	NaDDS/Enz
Rms (nm)	638,25	582,94	263,84	171,83	90,36	216,51
Ra (nm)	514,77	478,99	212,83	123,78	63,41	63,15

Os resultados obtidos demonstraram que a eletropolimerização do pirrol na presença de NaDDS diminui a rugosidade superficial do filme, ocasionando alteração na superfície globular característica de polipirrol, um efeito inverso é observado quando o filme é preparado em meio a NaClO₄. Quando a morfologia dos filmes é analisada na presença da enzima verifica-se que o filme feito em NaDDS aumenta sua rugosidade enquanto os demais filmes apresentaram-se menos rugosos em presença de enzima.

a)

b)

c)

Figura 26 - AFM dos filmes de PPI e PPI/PFO depositados em eletrodos de platina em meio: a) NaClO₄, b) NaCl, c) NaDDS.

3.5 Respostas do biossensor em função da concentração dos analitos

O estudo do comportamento eletroquímico dos filmes de PPI/PFO em meio aos analitos catecol e pirogalol foi realizado em uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com os valores de pH, potencial e concentração enzimática já fixadas conforme definido anteriormente. Para todos os filmes houve um crescimento linear nas respostas eletroquímicas para as menores concentrações.

Na Figura 27 são apresentadas as respostas em meio de catecol e pirogalol dos filmes preparados em NaClO₄. Podemos observar que para o catecol (Figura 27a), houve um aumento na densidade de corrente proporcional a concentração de catecol até a concentração de 30 µmol L⁻¹, mantendo-se constante para concentrações maiores, indicando saturação da enzima pelo substrato. Para o pirogalol, Figura 27b, observa-se um aumento na densidade de corrente até por volta de 50 segundos a partir de 50 segundos não existe mais linearidade.

Figura 27 - a) Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaClO₄ em meios a diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogalol.

Para os filmes preparados em meio de NaCl Figura 28 observa-se um comportamento semelhante para os dois analitos, ambos tiveram aumento na densidade de corrente proporcional a concentração dos analitos, então atribuída a oxidação enzimática juntamente com a produção de quinona na interface do eletrodo/solução.

Figura 28 - Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaCl em meios a diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogalol

Já para os filmes preparados em meio de NaDDS Figura 29 podemos observar comportamento semelhante no início das medidas para os dois analitos, sendo que para o catecol mostrado na Figura 29a observa-se um crescimento linear para todas as concentração até 20s Para o pirogalol houve aumento da densidade de corrente proporcional a concentração para todas as medidas.

Figura 29 - Cronoamperograma do filme PPI/PFO/NaDDS em meios a diferentes concentrações de a) catecol, b) pirogalol.

3.6 Curvas analíticas

Com as melhores condições pré-estabelecidas de preparo dos biossensores foram obtidas as curvas analíticas de densidade de corrente versus a concentração dos analitos, já que elas nos fornecem informações importantes sobre: sensibilidade, limites de detecção e intervalo linear das respostas dos biossensores.

A Figura 30a apresenta a curva para o filme preparado em meio de NaClO_4 , usando o catecol como analito, observa-se um crescimento linear da resposta com o aumento da concentração de catecol de 10 a 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo estabilizado para concentrações maiores, este comportamento indica que moléculas de catecol que

ainda não foram oxidadas, podem ser catalisadas pela reação enzimática, onde a velocidade de reação enzimática é diretamente proporcional a concentração de catecol. O limite de detecção para o catecol obtida por este sistema foi da ordem de $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o pirogalol, Figura 30b obteve-se um alcance linear menor, 10 a $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de pirogalol, permanecendo constante até $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ e diminuído em concentrações maiores. O limite de detecção para o pirogalol foi da ordem de $5,9 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 30 - Resposta do biossensor amperométrico em 0,3 V vs ESC em função da concentração de analito em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 NaClO_4 como eletrólito suporte: a) catecol, b) pirogalol.

Para os filmes preparados em meio de NaCl Figuras 31, o alcance linear foi de 20 e 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite detecção da ordem de 4,1 e 4,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o catecol e pirogalol respectivamente.

Figura 31 - Resposta do biossensor amepométrico em 0,3 V vs ECS em função da concentração da solução analito em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7 NaCl como eletrólito suporte, a) catecol, b) pirogalol.

Para os filmes preparados em meio a NaDDS quando foi feita a medida com catecol Figura 32a, observa-se uma linearidade até 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 20 a 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ uma pequena tendência a saturação, aumentando a resposta novamente até 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ estabilizando para concentrações maiores, para o catecol o limite de detecção foi da ordem de 8,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Para a análise do pirogalol Figura 32b observa-se uma linearidade maior, até cerca de 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para concentrações

maiores uma tendência a saturação. O limite de detecção foi da ordem de $7,1 \mu\text{mol L}^{-1}$

Figura 32 - Resposta do biossensor amperométrico em 0,3 V vs ECS em função da concentração da solução de catecol em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7 NaDDS como eletrólito suporte, a) somente região linear, b) região completa até a saturação.

Nas regiões onde a resposta amperométrica tende a ficar constante ocorre saturação da enzima pelo substrato, então governada pela quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos a partir dos gráficos 30, 31 e 32.

Tabela 3 - Características analíticas dos filmes PPI/PFO/eletrólitos

Eletrólito	Analito	Alcance linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Catecol	NaCl	10 - 30	4,1
	NaClO ₄	10 - 30	5,0
	NaDDS	10 - 20	8,3
Pirogalol	NaCl	10 - 20	4,4
	NaClO ₄	10 - 20	5,9
	NaDDS	10 - 40	7,1

3.7 Desempenho dos biossensores

A Figura 33 apresenta a dependência da densidade de corrente com o número de determinações para os filmes PPI/PFO preparados em meio de NaClO₄, NaCl e NaDDS. Nas primeiras medidas observa-se um comportamento similar para todos os filmes. Porém, a partir da 5ª determinação a tendência das curvas muda. Para o filme preparado em meio a NaDDS há um pequeno aumento da densidade de corrente e um efeito oposto é observado para o filme preparado em meio de NaCl e em ambos os casos atinge-se valores constantes de densidade de corrente. No caso do filme preparado em NaClO₄, aumento da densidade de corrente é mais brusco e valores constantes só são atingidos após a 13ª determinação.

Figura 33 - Perfil da estabilidade dos biossensores comparando as respostas amperométricas em função dos números de determinações. Respostas obtidas em solução tampão fosfato $0,1\text{molL}^{-1}$, $v= 50 \text{ mVs}^{-1}$.

Analisando o presente resultado com os resultados obtidos anteriormente, observa-se que filmes mais espessos, mais rugosos e com maior densidade de corrente apresentam-se uma menor estabilidade, como ser observado no caso dos filmes preparados em meio de NaClO_4 .

CAPITULO 4 - CONCLUSÕES

Mostramos neste trabalho a viabilidade de preparo de biossensores amperométricos a partir do uso de filmes de polipirrol (PPI) como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase (PFO) e a aplicação na análise de compostos fenólicos.

A polifenol oxidase (PFO) foi utilizada na forma de extrato bruto, foi retirada do fruto do abacate (*Persea americana*). Após sua extração e para posterior uso foi feito o cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m) e da Velocidade máxima de reação (V_{max}) e os valores de $2,4 \text{ mmolL}^{-1}$ e $17,3 \text{ mmolL}^{-1}/\text{s}$, respectivamente, foram encontrados.

Em uma etapa posterior, analisou-se a morfologia dos filmes poliméricos por AFM (microscopia de força atômica), a qual mostrou que os eletrólitos de suporte, assim como a presença de enzima, influenciam na morfologia dos filmes. Os filmes depositados no eletrodo de platina utilizando-se NaClO_4 como eletrólito suporte e enzima imobilizada mostraram-se mais rugosos, fato observado claramente nas imagens de AFM.

Para a otimização das respostas dos filmes, vários parâmetros foram estudados como: pH, potencial de trabalho e concentração de enzima a fim de se obter melhores respostas amperométricas na detecção dos analitos

Os filmes preparados em meio a NaClO_4 (PPI/PFO/ NaClO_4) apresentou um limite de detecção de $5,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para o catecol e pirogalol, respectivamente. As respostas foram obtidas utilizando uma solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7, 37 U mL^{-1} de enzima, utilizando um potencial de trabalho operacional de $0,2 \text{ mV}$.

Para os filmes preparados em meio a NaDDS (PPI/PFO/NaDDS) o limite de detecção obtido foi de $8,3$ e $7,1 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ para o catecol e o pirogalol, respectivamente. Para isso, utilizou-se uma solução tampão fosfato de $0,1 \text{ molL}^{-1}$ com pH 7, 30 U mL^{-1} e um potencial de trabalho operacional de $0,3 \text{ mV}$.

Já para os filmes preparados em meio a NaCl (PPI/PFO/NaCl) o limite de detecção encontrado foi de $4,1$ e $4,4 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ para o catecol e o pirogalol,

respectivamente, e utilizou-se uma solução tampão fosfato de $0,1 \text{ molL}^{-1}$ com pH 6, 40 U mL^{-1} em um operacional de $0,3 \text{ mV}$.

Portanto, os filmes preparados em meio a NaCl mostrou-se mais eficiente, uma vez que, apresentou-se menor limite de detecção e uma maior estabilidade quando comparados com os demais meios trabalhados.

REFERÊNCIAS

-
- ¹ RUEDA, M. et al. Soft calibration in flow system with electrochemical detection: application to the determination of phenolic compounds. **Analytical Chimica Acta**, v.446, n. 1-2, p. 267-277, 2001.
- ² DAVI, M. L.; GNUDI, F. Phenolic compounds in surface water. **Water Research**, v. 33, n. 14, p. 3213-3219, 1999.
- ³ OTEGA, F. et al. Phenolic oxidase-based biosensors selective detection units in column liquid chromatography for the determination of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 675, n. 1-2, p. 65-78, 1994.
- ⁴ RUSSEL, I. M.; BURTON, S. G. Development and demonstration of an immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. **Analytical Chimica Acta**, v. 389, n. 1, p. 161-170, 1999.
- ⁵ BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. *Resolução Conama Nº 20 de 18 de junho de 1986*. Classifica as águas doces, salobras e salinas essencial à defesa de seus níveis de qualidade, avaliados por parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar seus usos preponderantes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 30 jul. 1986. disponível em [HTTP://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html), acessado em 11/02/09.
- ⁶ PUIG, D. et al. Characterization of tyrosinase-Teflon/graphite composite electrodes for the determination of catechol in environmental Analysis. **Electroanalysis**, v. 8, n. 10, p. 885-890, 1996.
- ⁷ FERREIRA, L.C. **Biossensor amperométrico à base da tirosinase aplicado na determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais**. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.
- ⁸ 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. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

-
- ⁹ ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- ¹⁰ ARYA, K. S.; DATTA, M.; MALHOTRA, D. B. Recent Advances in cholesterol biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p. 1083-1100, 2008.
- ¹¹ LI, X.M. et al. Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. **Analytica chimica acta**, v. 582, n. 1, p.158-163, 2007.
- ¹² MELLO, L.D.; KUBOTA, L.T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drinks industries. **Food Chemistry**, v. 77, n.2, p. 237-256, 2002.
- ¹³ ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors & Bioelectronics**, v.15, n. 5-6, p. 273-282, 2000.
- ¹⁴ GORTON, L. et al. 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.
- ¹⁵ SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25 n. 1, p. 123-128, 2002.
- ¹⁶ MOREIRA, L. M.; MAGALHÃES, C. S.; LUCAS, P. O.; Emprego de sistema de análise em fluxo contínuo com biossensor potencimétrico para determinação de adrenalina em medicamentos. **Infarma**, v. 16, n.1, p. 13-14, 2005.
- ¹⁷ KIRALP, S.; TOPPARE, L.; YAGCI, Y. Determination of phenolic compounds in wines with enzyme electrodes fabricated by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymer. **Designed Monomers and Polymer**, v. 7, n. 1-2, p.3-10, 2004.
- ¹⁸ NISTOR, C. et al. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. **Analytical Chimica Acta**, v. 387, n. 3, p. 309-326, 1999.

-
- ¹⁹ DECKER, H.; TUCZEK, F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism, **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 8, p. 392-397, 2000.
- ²⁰ GIRELLI, A. M.; MATTEI, E.; MESSINA, A. Immobilized tyrosinase reactor for on-line hplc application development and characterization. **Sensors and Actuators B**, v. 121, n. 2, p.515-521, 2006.
- ²¹ DURÁN, N. et al. Application of laccase and (polyphenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.
- ²² VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicação de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27 n. 4, p. 623-630, 2004.
- ²³ SYNG-YING, F.; SHI-HUI, S.; DE-HONG, Z. Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-*m*-aminophenol film. **Talanta**. v. 51.n. 1, p. 151-158. 2000.
- ²⁴ GIL, E. S.; KUBOTA, L. T.; YAMAMOTO, Y. I. Alguns aspectos de imunoensaios aplicados a química analítica. **Química Nova**, v. 22 n. 6 p.874-881, 1999.
- ²⁵ VIEIRA, S. N. Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção de hepatopatias. 2007. 75p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- ²⁶ ROVER, Júnior, L. et.al. Transdutores potenciométricos a base de polímeros condutores: aplicações analíticas. **Química Nova**, v.20, n. 5, p. 519-527, 1997.
- ²⁷ MURRAY, R.W. **Techniques of chemistry**: molecular design of electrodes surfaces. New York: John Wiley & Sons Inc., 1992. v. 22. cap. 9.
- ²⁸ REIS, R. F. C. et al. Polímeros condutores. **Química Nova na Escola**, n. 11, p. 13-18, 2000.
- ²⁹ MATTOSO, L.H.C. Polianilina: síntese estrutura e propriedades. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.

-
- ³⁰ BRAHIM, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, V.17, n. 1, p.53-59, 2002.
- ³¹ BRUNO, L. et.al. Imobilização de proteínas do veneno do escorpião *Tytilus Serrulatus* em blenda condutora de Polianilina-Poli (Metacrilato de Hidroxietila). **Polímeros**, v.14, n.3, p. 156-161, 2004.
- ³² FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n.1, p.28-39, 1992.
- ³³ GENIES, E. M.; BIDAN, G. Spectroelectrochemical study of polypyrrole films. **Journal of . Electroanalytical Chemistry**, v.149, n. 1-2, p 101-113, 1983.
- ³⁴ KAIABARA, P. S. O. **Preparação e caracterização de compósitos de polipirrol (LiMn_2O_4)/fibra de carbono para catodos e baterias secundárias**. 2003. 141p. Dissertação (mestrado em Fisico-Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.
- ³⁵ AGOSTINHO, S. M. L. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 813-817, 2004.
- ³⁶ DAVI, M. L.; GNUDI, F. Phenolic compounds in surface water. **Water Reserch**, v. 33, n. 14, p. 3213-3219, 1999.
- ³⁷ PEIXOTO, C. R. M. **Imobilização e estudo eletroquímico dos complexos $[\text{Co}(\text{sepulcrato})]^{3+}$ e $[\text{Ru}(\text{edta})\text{H}_2\text{O}]$ sobre superfície de sílica gel modificada**. 1996. 101p. Tese (Doutorado em Química Inorgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- ³⁸ LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção de fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Química Nova**. v. 26, n. 2, p. 197-201, 2003.
- ³⁹ VIEIRA, I. C. et al. Titulação amperométrica de compostos fenólicos usando polifenol oxidase de vegetal como titulante. **Eclética Química**, v. 29, n. 2, p. 7-14, 2004.

-
- ⁴⁰ LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 5.ed. São Paulo: Sarvier, 1989. Cap.9.
- ⁴¹ SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.
- ⁴² BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L.H.C. **Estudo de polímeros por microscopia de força atômica**. São Carlos: EMBRAPA, 2003. 4 p. Comunicado Técnico 53.
- ⁴³ RODRÍGUEZ, J.; GRANDE, H. J.; OTERO, T. F. Polypyrroles : from basic research to technological applications. In: NALWA, H. S. (Ed.). **Handbook of Organic Conductive and Polymers**. New York: John Wiley & Sons, 1977. v. 2. Cap. 10. p. 415-467
- ⁴⁴ ABEL M.L., et al., A solvent effect on the morphology PMMA-coated polypyrroles surfaces. **Synthetic Metals**, v. 81, n. 1, p. 23-31, 1996.
- ⁴⁵ ARSLAN, A. et al. Immobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrix. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 35, n. 1, p.163-167, 2005.