



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
CENTRO DE TECNOLOGIA
ESCOLA DE QUÍMICA

Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico Para Detecção de Etanol

ÉRICA FERREIRA SOUTHGATE

MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO

Orientadoras

Eliana Mossé Alhadef – D. Sc.

Ninoska Isabel Bojorge Ramírez – D.Sc.

Julho / 2011



Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico Para Detecção de Etanol

Érica Ferreira Southgate

MONOGRAFIA DE FINAL DE CURSO

Orientadoras

Eliana Mossé Alhadef – D. Sc.

Ninoska Isabel Bojorge Ramírez – D.Sc.

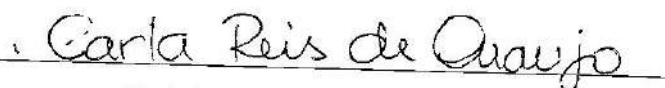
Julho de 2011

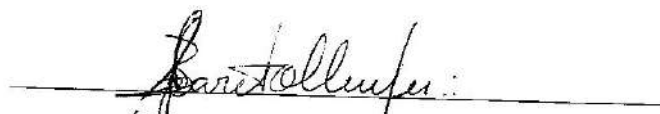
Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico Para Detecção de Etanol

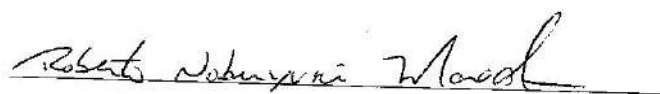
Southgate, Érica F.

Monografia de final de curso submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.


Aprovado por:

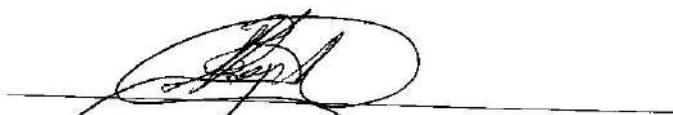

Carla Reis de Araújo - D.Sc.


Álvaro José Boareto Mendes – M.Sc.


Roberto Nobuyuki Maeda – D.Sc.

Orientado por:


Eliana Mossé Alhadeff – D. Sc.


Ninoska Isabel Bojorge Ramirez – D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Julho de 2011

Southgate, Érica F.

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DETECÇÃO DE ETANOL / Érica Ferreira Southgate /**

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

(Monografia de Final de Curso) – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Julho, Escola de Química, 2011.

Orientadoras: Eliana Mossé Alhadeff e Ninoska Isabel Bojorge Ramírez.

1.Etanol. 2. Biossensor. 3. Voltametria Cíclica. 4. Monografia (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Eliana Mossé Alhadeff 6.Ninoska Isabel Bojorge Ramírez. I. Desenvolvimento de Biosensor Eletroquímico para Detecção de Etanol.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Tania que sempre foi a minha maior incentivadora ao longo dessa jornada, e ao meu pai Paulo Ricardo que apesar de não poder testemunhar essa conquista, sei que estaria muito orgulhoso agora. Também dedico aos meus outros familiares que, mesmo não participando ativamente, sempre torceram por mim.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Tania e Paulo Ricardo e ao meu irmão Tiago por todo apoio, carinho e paciência.

As professoras orientadoras Eliana Alhadeff e Ninoska Bojorge por todo tempo e dedicação dispensados no decorrer deste trabalho.

Ao professor Fernando Gomes do IMA-UFRJ pela assistência com a análise da condutividade elétrica, a professora Simone Brasil do DPI-EQ e ao professor Ladimir José de carvalho do DPI-EQ pelo uso do potenciostato.

Ao apoio do Laboratório de Sensores e Polímeros (IMA – UFRJ), do Laboratório de Química de Interfaces e Sistemas Coloidais (PEMM/COPPE – UFRJ) e do Laboratório de Microscopia Eletrônica (COPPE – UFRJ).

A CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Resumo da Monografia de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Químico Industrial.

Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico Para a Detecção de Etanol.

Southgate, Érica F.

Julho, 2011

Orientadoras: Eliana Mossé Alhadef – D. Sc e Ninoska Isabel Bojorge Ramírez – D. Sc.

Biossensor é um instrumento analítico capaz de converter a concentração de um analito em um sinal, como o elétrico, através da integração de um elemento sensor biológico a um componente transdutor.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de biossensor eletroquímico amperométrico composto por uma matriz do compósito grafite/polianilina (PANI), na qual são imobilizadas as enzimas *horseradish peroxidase* (HRP) e *álcool oxidase* (AOD) com o objetivo de detectar etanol e monitorar sua concentração em processos fermentativos. Para tal, testes foram feitos objetivando determinar qual era a melhor proporção dos componentes do compósito da matriz de imobilização. Medidas de condutividade e do ângulo de contato permitiram determinar a proporção de 30:70 de grafite:polianilina. Após essa etapa foi determinado o melhor agente aglutinante e diferentes métodos de imobilização das enzimas *horseradish peroxidase* e *álcool oxidase* foram propostos (adsorção de HRP, ligação covalente da HRP e adsorção de HRP e AOD) e seus desempenhos avaliados através de medidas voltamétricas.

Com as principais características do eletrodo determinadas, foram feitos testes de voltametria cíclica com soluções de etanol de diferentes concentrações, com o objetivo de construir uma curva de calibração.

SUMÁRIO

Capítulo I - Apresentação.....	12
1.1 – Motivação.....	12
1.2 – Introdução.....	13
1.3 – Objetivo.....	14
Capítulo II – Revisão Bibliográfica.....	15
2.1 – Biossensores.....	15
2.1.1 – Funcionamento do Biossensor.....	15
2.1.2 – Tipos de Biossensores.....	15
2.1.3 – Métodos de Imobilização Enzimática.....	19
2.1.4 – Aplicação dos Biossensores.....	21
2.2 – Dinâmica Eletroquímica.....	22
2.2.1 – Células Voltamétricas.....	22
2.2.2 – Voltametria cíclica.....	23
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	26
3.1 – Ângulo de Contato.....	26
3.2 – Microscopia Eletrônica de varredura.....	27
3.3 – Condutividade Elétrica.....	28
3.4 – <i>Horseradish peroxidase</i>	28
3.4.1 – Tratamento e purificação da HRP.....	28
3.4.2 – Determinação da Concentração da Solução Enzimática.....	29
3.3.3 – Determinação da Atividade da Solução Enzimática.....	31
3.5 – Construção do Eletrodo.....	31
3.6 – Imobilização Enzimática.....	33
3.6.1 – Adsorção Física da HRP.....	33
3.6.2 – Ligação Covalente da HRP.....	33
3.6.3 – Adsorção Física da HRP e AOD.....	33

3.7 – Voltametria Cíclica.....	34
Capítulo IV – Resultados e Discussão.....	36
4.1 – Ângulo de Contato	36
4.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura.....	36
4.3 – Condutividade Elétrica.....	38
4.4 – Atividade e Concentração Enzimática.....	38
4.4.1 – Concentração Enzimática.....	38
4.4.2 – Atividade Enzimática.....	40
4.5 – Voltametria Cíclica.....	40
4.5.1 – Decisão Entre Óleo Mineral e Epoxi.....	41
4.5.2 – Decisão Entre Polianilina PANIPOL ou SIGMA.....	42
4.5.3 – Decisão da Velocidade de Varredura Ótima.....	43
4.5.4 – Estudo da Imobilização por Adsorção da HRP.....	46
4.5.5 – Estudo da Imobilização por Ligação Covalente da HRP.....	47
4.5.6 – Estudo da Imobilização por Adsorção da HRP e AOD.....	48
Capítulo V – Conclusões e Sugestões.....	54
Capítulo VI - Bibliografia.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Procedimento para determinação da curva padrão.....	30
Tabela 3.2- Diluições para preparo da curva padrão.....	30
Tabela 4.1- Ângulos de contato das amostras.....	36
Tabela 4.2- Valores de I_{pa} e I_{pc} para as diferentes velocidades.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Esquema de componentes básicos de um biossensor.....	15
Figura 2.2- Esquematização dos métodos de imobilização de biomoléculas em transdutores.....	19
Figura 2.3- Célula voltamétrica de três eletrodos.....	23
Figura 2.4- Exemplo de voltamograma típico.....	24
Figura 3.1- Ilustração do ângulo de contato.....	27
Figura 3.2- Fotos dos eletrodos prontos.....	32
Figura 4.1- Micrografias dos compósitos.....	37
Figura 4.2- Gráfico da condutividade contra o percentual de grafite no compósito.....	38
Figura 4.3- Voltametria cíclica do eletrodo com óleo mineral em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 100mV/s$	41
Figura 4.4- Voltametria cíclica do eletrodo com epóxi em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 100mV/s$	41
Figura 4.5- Voltametria cíclica do eletrodo com PANI PANIPOL em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$	42
Figura 4.6- Voltametria cíclica do eletrodo com PANI SIGMA em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$	42
Figura 4.7- Voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M.....	43
Figura 4.8- Gráfico da raiz quadrada da velocidade de varredura versus os valores de I_{pa} e I_{pc}	45
Figura 4.9- Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$	46

Figura 4.10- Voltametria cíclica do eletrodo com HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$	46
Figura 4.11- Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10mV/s$	47
Figura 4.12- Voltametria cíclica do eletrodo com HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10mV/s$	47
Figura 4.13- Voltametria cíclica com peróxido de hidrogênio $1,6 \times 10^{-4}M$ (Vermelho) e $6,4 \times 10^{-4}M$ (Azul) em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10mV/s$	48
Figura 4.14- Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40M/s$, do eletrodo sem HRP e AOD imobilizadas.....	48
Figura 4.15- Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$, do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas.....	49
Figura 4.16- Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$, do eletrodo com grafite peroxidado sem HRP e AOD imobilizadas.....	49
Figura 4.17- Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$, do eletrodo com grafite peroxidado com HRP e AOD imobilizadas.....	50
Figura 4.18- Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$, do eletrodo com grafite peroxidado com glutaraldeído e HRP e AOD imobilizadas.....	50
Figura 4.19- Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP e AOD imobilizadas, em solução de etanol 3,33% (Vermelho) e 10% (Azul) diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$	51
Figura 4.20- Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$	51
Figura 4.21- Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP e AOD imobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$	52
Figura 4.22- Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$	52
Figura 4.23- Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas e glutaraldeído, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40mV/s$	53

Capítulo I – Apresentação

1.1. Motivação

O monitoramento e controle de Bioprocessos tem um papel importante para garantir a manutenção de um ambiente desejado para o crescimento dos micro-organismos. Assim, como em outro aspecto, o monitoramento e controle são necessários para atingir uma produção economicamente viável com a qualidade do produto aceitável. Um processo otimizado conduz a um melhor desempenho, a redução nos custos e à melhoria no controle de qualidade de materiais (Thevenot et al., 1999). Além disso, devido à natureza, tipo e volume de produtos produzidos em bioprocessos, há um forte incentivo econômico para o monitoramento de processo objetivando aumentar o rendimento e a produtividade.

A detecção e quantificação de alcoóis com alta seletividade, sensibilidade e precisão é necessário em diversas áreas. Precisão e rapidez de medição de álcool é muito importante na análise clínica e forense, a fim de analisar os fluidos do corpo humano, por exemplo, sangue, soro, saliva, urina, respiração e suor, entre outros. Na indústria de alimentos, de bebidas (cerveja, vinho e outras) e de celulose exige-se métodos analíticos simples, rápidos e econômicos para o controle de processos de fermentação e da qualidade de seus produtos (Patel et al., 2001). A determinação de etanol também é importante na análise agrícola e ambiental, por exemplo, para a avaliação de etanol em águas residuais de processos de indústrias alimentícias e de combustíveis.

Tais razões enfatizam a necessidade de desenvolver melhores ferramentas e sistemas de monitoramento com a introspecção em variáveis bioquímicas em bioprocessos.

Diversos métodos analíticos têm sido desenvolvidos ao longo dos anos para a determinação de analitos de interesse, tais como o etanol e outros alcoóis alifáticos, como o metanol. Estes incluem o uso de métodos químicos, tais como titulação redox, métodos colorimétricos, gravidade específica e medições de índice de refração, cromatográfico e métodos espectroscópicos. Embora alguns destes métodos sejam precisos e confiáveis, eles são complexos, e exigindo tempo de processamento, tais como separações (destilação, pervaporação), instrumentação dispendiosa e operadores treinados. Essas desvantagens podem ser superadas pelo uso de métodos enzimáticos. Enzimas são um dos componentes essenciais dos sistemas vivos, catalisando quase todas as transformações químicas que

ocorrem durante o metabolismo celular. A natureza e especificidade da sua atividade catalítica as tornam excelentes ferramentas para análise química. A capacidade de uma única molécula enzimática para catalisar a reação de moléculas de numerosos substratos também fornece um efeito de amplificação, o que aumenta a sensibilidade da análise. Outra vantagem é que a maioria das reações catalisadas por enzimas podem ser monitoradas por simples métodos espectroscópicos e eletroquímicos amplamente disponíveis.

As ferramentas alternativas para a monitoração de analitos são possíveis através de técnicas como biossensores e espectroscopia de infravermelho. A integração destas técnicas de medição em bioprocessos ajuda na geração de banco de dados para a elucidação da origem dos efeitos dos mecanismos moleculares subjacentes.

1.2. Introdução

As medidas de etanol são de extrema importância no controle de processos fermentativos para a produção de etanol combustível e também na indústria de bebidas alcoólicas. Existe uma variedade de métodos e estratégias para a determinação desse analito que incluem a cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrofotometria. Esses métodos são relativamente caros e de alta complexibilidade, além de não permitirem facilmente a monitoração contínua e quase sempre requerem etapas de pré-concentração e de extração e, por isso, metodologias alternativas precisam ser consideradas. Uma alternativa para suprir essa necessidade são os biossensores, pois são de fabricação barata e são simples de operar.

Biossensores são dispositivos analíticos que se utilizam de fenômenos bioquímicos para analisar a quantidade de um analito em um dado ambiente (órgãos animais, biorreator industrial, etc). Ou seja, um biossensor atua mediante uma reação bioquímica (sinal biológico) e mediante um equipamento eletromagnético, traduz este sinal biológico em sinal elétrico que possa ser processado e então compreendido pelo operador (Thevenot et al., 1999).

Clark e Lyons, em 1962, desenvolveram o primeiro biossensor amperométrico para a detecção de glicose usando a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de cuprofane (celulose recuperada) acoplada a um eletrodo de oxigênio e o primeiro

biossensor potenciométrico foi construído em 1975 por Guilbalt e Montalvo, através da imobilização da urease em uma matriz de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro seletivo a íons amônio (Filho et al., 1991). O primeiro biossensor comercial foi introduzido no mercado em 1975 pela Springs Instruments e era usado para monitorar a concentração de glicose no sangue de pacientes diabéticos. Desde então, algumas dezenas de novos biossensores foram projetados e aplicados em análises químicas de várias substâncias (Pohanka, 2008).

O campo em rápida expansão de aplicação dos biossensores, a sua diversidade e a necessidade de validação impõe a descrição sistemática das suas capacidades analíticas utilizando protocolos estabelecidos para a avaliação de critérios de desempenho, de acordo com os protocolos padrões ou definições da IUPAC. Estes incluem os seguintes parâmetros:

- Alta seletividade e especificidade;
- Baixo custo;
- Rápido tempo de resposta;
- Exatidão;
- Simplicidade de uso;
- Baixo limite de detecção;
- Possibilidade de miniaturização;
- Possibilidade de utilização em campo num regime de tempo real.

Por outro lado, os biossensores apresentam algumas limitações como, principalmente, a baixa estabilidade em longo prazo e, também, a sensibilidade a variações das condições do meio com pH e temperatura (Mehrvar et al., 2004).

1.3. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi construir um biossensor eletroquímico composto por uma matriz de grafite e polianilina (PANI), na qual foram imobilizadas as enzimas *Horseradish peroxidase* (HRP) e *Álcool oxidase* (AOD) para quantificar a concentração de etanol em processos fermentativos.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

2.1. Biossensores

2.1.1. Funcionamento do Biossensor

Um biossensor utiliza um elemento biológico (enzimas, anticorpos, células, etc) conectado a um transdutor, que converte um sinal biológico em um elétrico, que é amplificado e processado, como é mostrado na figura 2.1. O material biológico é imobilizado em uma membrana adequada, que é acoplada à superfície do transdutor (Filho et al., 1991).

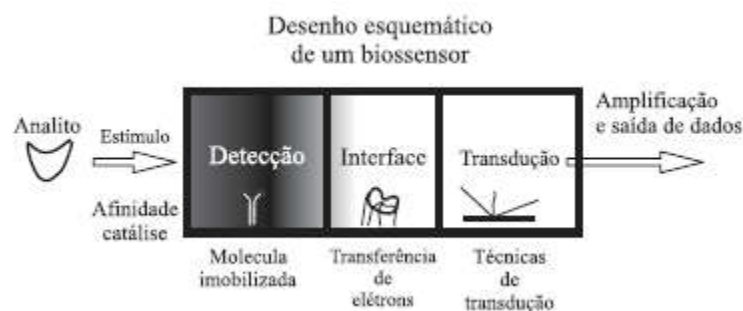


Figura 2.1: Esquema de componentes básicos de um biossensor.

O sistema de reconhecimento biológico traduz a informação do domínio bioquímico, normalmente a concentração de um analito, em um sinal de saída físico ou químico. O principal propósito desse sistema de reconhecimento é dar ao sensor um alto grau de seletividade.

A parte transdutora do sensor serve para transformar o sinal de saída do sistema de reconhecimento biológico em um sinal elétrico. Os transdutores eletroquímicos podem ser classificados como potenciométricos, amperométricos e impedimétricos/conduktivimétricos.

2.1.2. Tipos de Biossensores

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de material biológico imobilizado ou com o tipo de transdutor usado.

2.1.2.1. Classificação de acordo com o tipo de material biológico:

Os componentes biológicos utilizados na construção desses sensores podem ser enzimas, anticorpos, micro-organismos, tecidos animal ou vegetal e ácido desoxirribonucléico (DNA). (Alhadeff, 2005).

Biossensor Enzimático:

É um dispositivo que combina a sensibilidade e a seletividade de uma enzima com o transdutor. As etapas fundamentais no desenvolvimento desse tipo de sensor são a imobilização e a estabilização das enzimas sobre a superfície do suporte, no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais responsáveis pelo reconhecimento.

A vantagem da utilização deste componente, como mencionado anteriormente, é que as enzimas são moléculas altamente específicas, seletivas e fornecem altas taxas de formação de produto. A maior desvantagem é a estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito a variações das condições do meio reacional, como variações de pH, temperatura, pressão, etc. Isso provoca a desnaturação desses componentes biológicos levando a redução da atividade enzimática. (Wei e Ivaska, 2006).

Imunossensor:

Os imunossensores são construídos por meio da combinação apropriada das biomoléculas (antígeno, policlonal, hapteno) com o transdutor (eletroquímica, amperométricos, potenciométricos, piezoelétrico, óptica, etc), podem ser aplicados em situações específicas de análise. Da mesma forma que os biossensores clássicos, o receptor é geralmente imobilizados na superfície do transdutor, que lhe permite detectar a interação com as moléculas do analito. Em contraste com os imunoenaios, imunossensores geralmente permitem a reutilização dos mesmos receptores de superfície para varias medições (Bojorge et al., 2009).

Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominadas imunoglobulinas. Estes são produzidos por animais em resposta à presença de substâncias estranhas, denominadas imunógenos ou antígenos (substâncias não protéicas de baixo peso molecular que pode se ligar aos sítios específicos de combinação de anticorpos).

No imunoensaio, o sitio combinatório do anticorpo interage especificamente com porções mais superficiais do antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo. Esta

interação é caracterizada por uma constante de afinidade que é função das concentrações do complexo formado, do antígeno e do anticorpo livres no meio de reação.

A maior parte dos imunossensores desenvolvidos é usada em áreas clínica e médica, visando rápidas determinações de células tumorais, micro-organismos patogênicos, toxinas, etc (Bojorge-Ramírez, 2009).

Biossensores Microbiológicos:

Um biossensor microbiano é um dispositivo de análise que acopla micro-organismos ao transdutor para permitir também a detecção rápida, precisa e sensível de analitos-chaves em áreas tão diversas como a medicina, monitoramento ambiental, defesa, indústria alimentar e de segurança. Os biossensores microbianos se baseiam nas funções respiratória e metabólica dos microrganismos para detectar uma substância que seja um substrato ou um inibidor de tais processos. (Lei, 2006)

Esses componentes biológicos são menos sensíveis às variações das condições do meio reacional que as enzimas e a sua utilização preserva a enzima em seu ambiente natural, protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos, tais como metais pesados.

O uso de células é limitado pela baixa especificidade, quando comparado às enzimas, e pelo maior tempo de resposta. (D'Sousa, 2001).

Biossensor Baseado em Células Animais e Vegetais:

A motivação para o desenvolvimento desse tipo de sensor é que os agentes podem ser analisados pela atividade funcional, sem requerer conhecimento específico do agente químico. A análise funcional de agentes desconhecidos fornece benefícios em muitas aplicações, tais como farmacologia, biologia celular, toxicologia e monitoramento ambiental.

O ambiente que cerca as células exerce grande influência em sua atividade metabólica. Caso existam substâncias tóxicas na amostra analisada, causará um distúrbio no metabolismo e esse efeito pode ser transformado em sinais elétricos (Vieira, 2007).

Biossensor Baseado em DNA:

São dispositivos constituídos de oligonucleotídeos, produtos de PCR ou DNA imobilizados na superfície e conectados a um transdutor. Esse tipo de biossensor pode

detectar a presença de genes específicos ou genes mutantes associados a doenças humanas hereditárias (Vieira, 2007).

2.1.2.2. Classificação de acordo com o tipo de transdutor

Existem diferentes transdutores que podem ser utilizados nos biossensores, a escolha dependerá do material biológico imobilizado na superfície sensora e das propriedades de cada amostra de interesse. Quanto ao tipo de transdutores, os biossensores podem ser classificados como:

- Eletroquímico (movimento de íons, difusão de espécies eletroativas);
- Óptico (absorção de luz);
- Piezoelétrico (alteração de massa e/ou microviscosidade) e;
- Termométrico (absorção ou emissão de radiação eletromagnética).

Os eletroquímicos têm se destacado entre os tipos de transdutores dos biossensores e podem ser de três tipos: amperométrico, condutimétrico ou potenciométrico.

Biossensores Amperométricos:

Os biossensores amperométricos são baseados na medida de corrente elétrica, resultante de alterações de oxidação ou redução de espécies eletroativas. Durante as análises, o potencial é mantido constante as alterações de corrente verificadas são correlacionadas diretamente com a concentração das espécies eletroativas presentes, com a sua produção ou com a taxa de consumo na camada biocatalítica.

Biossensores Potenciométricos e Condutimétricos:

Biossensores potenciométricos se baseiam na diferença de potencial entre dois eletrodos em condições de corrente elétrica constante. Enquanto nos biossensores condutimétricos as mudanças são observadas nas medidas de condutância, resultante de produtos de reação catalítica.

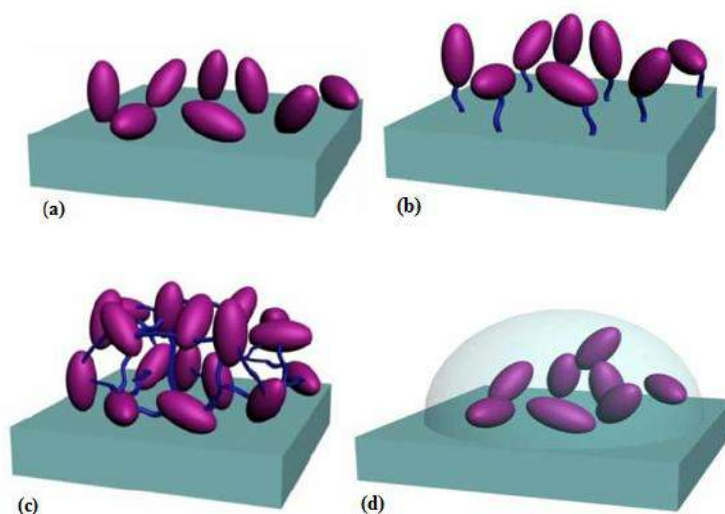
Os biossensores amperométricos têm sido preferidos pela fácil manipulação e pelo fato de a concentração do analito ser proporcional à alteração na corrente elétrica. Na medida amperométrica, quando são utilizadas enzimas que catalisam reações de oxirredução, material biológico não necessita de marcador, em comparação aos imunossensores. No

caso do uso de anticorpos ou DNA, a interação com o analito gera poucos íons redox, sendo necessária a conjugação a uma enzima catalítica com a peroxidase. (Zh, 1994).

2.1.3. Métodos de Imobilização Enzimática

O conceito de biossensor implica que o elemento de reconhecimento biológico (nesse caso, a enzima) mantenha contato íntimo com o transdutor. Este contato deve ser permanente, de forma que evite a sua posterior remoção do meio reacional. Assim, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo (Mendes, 2010).

A etapa de imobilização do material biológico na superfície sensora constitui uma das fases cruciais no desenvolvimento do biossensor, pois os sítios ativos da molécula devem ser preservados, a fim de não prejudicar a reação com a amostra de interesse (Bojorge, 2006). Os diversos tipos de imobilização do componente biológico são ilustrados na figura 2.2:



(Fonte: Bojorge Ramírez N. B., 2008)

Figura 2.2: Esquematização dos métodos de imobilização de biomoléculas em transdutores. (a) Adsorção física; (b) Ligação covalente; (c) Ligação covalente cruzada e (d) Encapsulamento.

As principais modalidades de imobilização são descritas abaixo.

Adsorção Física:

A adsorção de biomoléculas sobre os transdutores é o procedimento de imobilização mais simples e menos agressivo, o que mantém suas atividades praticamente intactas. Não é necessário o uso de nenhum reagente especial, as proteínas se adsorvem através de forças de Van Der Waals, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Estas interações são fracas e reversíveis. São susceptíveis a variação de pH, temperatura, e força iônica, sendo esta a principal desvantagem do método.

Ligação Covalente:

Esse tipo de imobilização é realizado através da ligação covalente dos grupos funcionais não ativos da enzima a grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino) ligados na superfície sólida do suporte, que pode ser vidro, cerâmica, polímeros sintéticos, grafite, celulose, nylon e alumina.

O método por ligação covalente garante que dificilmente a enzima se desprenderá do suporte durante o uso, ou seja, não há reversibilidade do método pela ação do pH, força iônica ou temperatura e são estáveis por vários meses (4 a 14 meses). A maior desvantagem é possibilidade da enzima se tornar inativa, em parte ou totalmente, quando a ligação ao suporte se dá nos sítios ativos.

Ligação Covalente Cruzada:

Nessa técnica usa-se um reagente bifuncional, como o glutaraldeído, ou multifuncional, como hexametileno di-isocianato, para a imobilização da molécula em diferentes suportes sólidos. O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalente cruzadas entre as moléculas. Ao usar a técnica é necessário que haja preocupação como a acessibilidade ao componente bioativo. A vantagem de seu uso é que a perda de atividade do componente biológico é mínima, e o custo envolvido é relativamente moderado.

O método de imobilização com o glutaraldeído é um dos métodos mais empregados, pois a enzima geralmente é mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade frente as variações de pH, temperatura e força iônica.

Encapsulamento:

Trata-se da imobilização física por aprisionamento em matrizes de gel, como poliacrilamida, gelatina, sílica, etc. Esse é um método que também preserva consideravelmente a atividade biológica. É necessário acompanhamento rígido do procedimento de aprisionamento das moléculas para que o componente reconhecedor não se desprenda da matriz e o biossensor acabe por perder sua sensibilidade. O método de encapsulamento é muito utilizado visando a preservação da atividade biológica, porém impõe barreiras difusivas limitando o transporte do substrato e aumentando o tempo de resposta do sensor (Mendes, 2010).

2.1.4. Aplicação dos Biossensores

As vantagens dos biossensores em relação às técnicas convencionais não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas também ao fato de, geralmente, dispensarem um elaborado pré-tratamento da amostra (praticidade), rapidez nas análises e gastos mínimos de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados e redução no custo financeiro.

Algumas empresas já disponibilizam biossensores comercialmente. Os biossensores para quantificar glicose no sangue são os mais difundidos, seguido pelo de uréia.

As aplicações dos biossensores podem ser encontradas em diferentes áreas do conhecimento: saúde, pecuária, alimentos, agrônômica e outras (Furtado et al., 2008).

Aplicação na indústria de alimentos:

Para garantir a qualidade dos produtos e o controle das etapas de produção, as indústrias de bebidas e de alimentos necessitam de métodos analíticos para detecção de contaminantes e de patógenos que sejam rápidos e precisos. Embora existam técnicas analíticas tradicionais que atendem a estes requisitos, estas requerem elevado investimento financeiro e geralmente um longo tempo para preparo das amostras. Os biossensores tem se mostrado como uma alternativa promissora neste campo, graças à seletividade, à rapidez e ao baixo custo deste tipo de tecnologia. Embora, nos últimos anos, tenha sido publicado um grande número de trabalhos sobre o uso de biossensores para análise de alimentos,

poucos desses sistemas estão disponíveis comercialmente, uma das razões para este fato é a curta vida útil do componente biológico (Magalhães, 2010).

Aplicação na área da saúde

Na área da saúde, o mais conhecido é o biossensor eletroquímico usado para acompanhamento do nível de glicose no sangue, principalmente por diabéticos. O aparelho pode ser adquirido facilmente em farmácias com a opção de diferentes marcas. Biossensores comerciais para o monitoramento de lactose, uréia, creatinina e colesterol encontram-se em fase de desenvolvimento (Newman e Turner, 2004)

Aplicação na agricultura e pecuária

Na agricultura, biossensores podem detectar e quantificar patógenos de plantas no campo, podendo orientar o produtor a realizar aplicações de pesticidas pontuais, reduzindo e otimizando o uso de agroquímicos. Também podem ser utilizados no monitoramento de pesticidas no meio ambiente e em diversos alimentos.

Na pecuária, os biossensores têm sido recomendados para detecção de drogas veterinárias residuais, já que o uso de hormônios esteróides em animais destinados ao abate é proibido. Imunoensaios e biossensores têm sido desenvolvidos para analisar a presença de hormônios e antibióticos através de secreções e urina de animais com resultados bastante satisfatórios (Furtado et al., 2008).

2.2. Dinâmica eletroquímica

2.2.1. Células Voltamétricas

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria podem ter dois ou três eletrodos, sendo um biossensor (chamado eletrodo de trabalho), um eletrodo de referência e, o terceiro, um contra-eletrodo (Mendes, 2010):

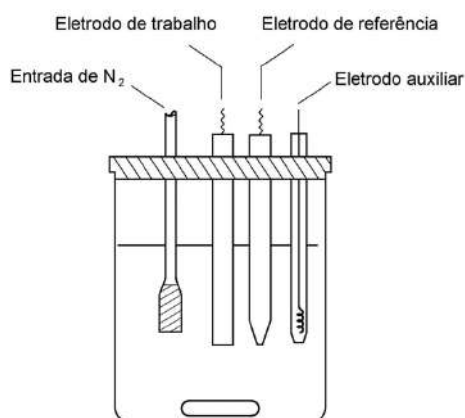
Eletrodo de referência: é um tipo de eletrodo que mantém o potencial constante em relação ao qual o potencial de outra meia-pilha pode ser medido. Um eletrodo de referência ideal apresenta um potencial conhecido e constante em relação ao eletrodo padrão de

hidrogênio. Os eletrodos de referência mais comuns são os de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o de calomelano.

Contra-eletrodo: serve para permitir a conexão elétrica de forma que uma corrente possa ser aplicada ao eletrodo de trabalho. Os contra-eletrodos normalmente são feitos de materiais inertes, tais como metais nobres ou carbono vítreo, para evitar sua dissolução. Também pode ser chamado de eletrodo auxiliar.

Na célula de dois eletrodos tem-se um eletrodo de trabalho, de superfície pequena, no qual o potencial é aplicado frente ao eletrodo de referência, de área superficial grande, de forma que apenas o eletrodo de trabalho se polarize. Essa célula apresenta alguns inconvenientes, pois a passagem de corrente pelo eletrodo de referência provoca o consumo de Cl^- , necessitando de eletrodos grandes para manter o potencial constante. Isso interfere na medida de concentrações da ordem de 10^{-4} mol/L.

Para resolver essas limitações foi desenvolvida a célula de três eletrodos, introduzindo o contra-eletrodo (figura 2.3) de uma forma que a corrente passe entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência (Aleixo,2010).



(Fonte: Aleixo, 2010)

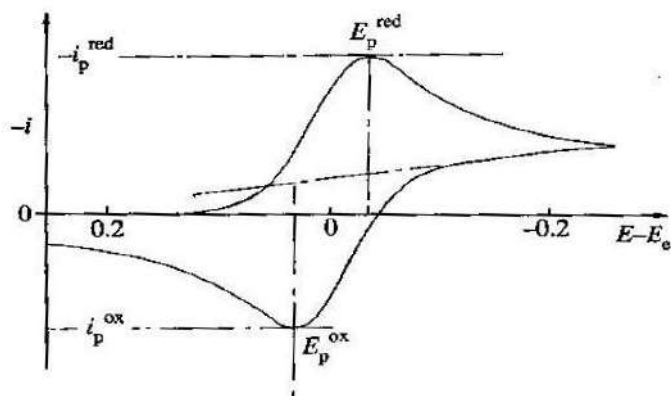
Figura 2.3: Célula voltamétrica de três eletrodos.

2.2.2. Voltametria Cíclica

A voltametria é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma célula eletroquímica. O potencial é aplicado entre os eletrodos de trabalho e de referência em forma de varredura,

isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. A curva corrente vs potencial obtida é chamada voltamograma (Aleixo, 2010).

No perfil voltamétrico corrente-potencial, os processos de oxidação e de redução ocorrendo no eletrodo de trabalho são representados por correntes de pico anódica (I_p) e catódica (I_{pc}). Os altos sinais apresentados pelos picos de corrente podem representar uma maior sensibilidade e reprodutibilidade da célula eletroquímica. Outros parâmetros importantes considerados em voltametria cíclica são os potenciais de pico anódico (E_{pa}), catódico (E_{pc}) e a velocidade de varredura. A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade do sistema. A reversibilidade eletroquímica está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo. Um voltamograma característico pode ser observado na figura 2.4. (Silva, 2010).



(Fonte: Mendes, 2010)

Figura 2.4: Exemplo de voltamograma típico.

Equações matemáticas que correlacionam podem descrever a voltametria cíclica de espécies não adsorvidas. As repostas podem ser classificadas como reversíveis, quase-reversíveis ou irreversíveis.

A corrente de pico teórica para processos reversíveis à 25°C é dada pela equação de Randles-Sevcik (Mendes, 2010):

$$I_p = 2,69 * 10^5 * n^{3/2} * A * C * D^{1/2} * v^{1/2} \quad \text{Eq. (2.1)}$$

Onde n é o número de elétrons obtidos da estequiometria da reação; A é a área do eletrodo em cm^2 ; D é o coeficiente de difusão em cm^2/s ; C é a concentração da espécie em solução em mol/cm^3 , e v a velocidade de varredura em V/s .

Teoricamente, em um processo reversível, o potencial formal de redução ou oxidação (E°) é a média aritmética entre os potenciais E_{pc} e E_{pa} .

Ainda para processos reversíveis, três outras importantes características podem ser destacadas:

- a) A separação entre os potenciais (E_{pc} e E_{pa}), é dada pela equação 2.2:

$$\Delta E_p = \frac{E_{pc} - E_{pa}}{n} \sim \frac{0,059}{n} \quad \text{Eq. (2.2)}$$

Onde n é o número de elétrons transferidos.

Desta forma, para um processo em que há transferência de um elétron, a separação entre os picos deverá ser de aproximadamente 59 mV;

- b) A relação entre I_{pc} e I_{pa} deve ser, aproximadamente, igual a 1, conforme a equação 2.3:

$$\frac{I_{pa}}{I_{pc}} \sim 1 \quad \text{Eq.(2.3)}$$

- c) A corrente de pico (I_p) deve ser diretamente proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura, de acordo com a equação de Randles-Sevcik.

Para um processo irreversível, não se observa simetria entre os potenciais E_{pc} e E_{pa} e, em geral, os processos de oxi-redução são acompanhados da decomposição das espécies eletrogeradas. Experimentalmente, a diferença de potencial ΔE_p é muito maior que 59 mV e a relação I_{pa} / I_{pc} não respeita a unidade. É comum um sistema ser reversível em baixas velocidades de varredura e irreversível ao se aumentar a velocidade. Nestes casos, o processo é denominado quase-reversível, e apresenta as seguintes características:

- ΔE_p maior que 59 mV, aumentando gradativamente com o aumento da velocidade de varredura;
- a corrente I_p aumenta com a raiz quadrada da velocidade, mas não de forma proporcional;
- E_{pc} desloca-se negativamente com o aumento da velocidade de varredura.

Capítulo III – Materiais e Métodos

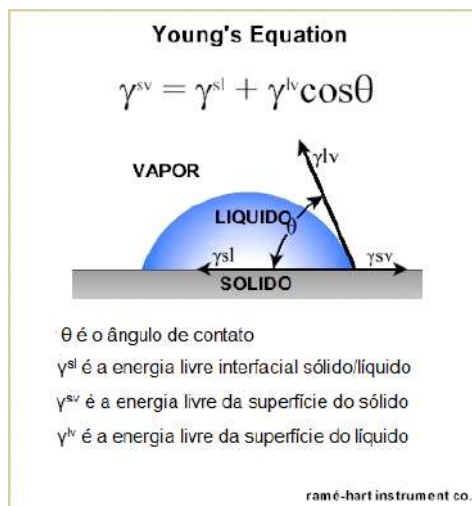
Com o objetivo de determinar qual seria a melhor proporção entre os elementos do compósito grafite/polianilina da matriz de imobilização foram feitos testes de condutividade, medições de ângulo de contato e microscopia eletrônica de varredura em compósitos com 1, 3, 5, 10, 20, 30 e 100% de grafite. As amostras foram preparadas pela mistura física dos dois componentes e posterior prensagem.

Escolhida a melhor proporção foram iniciados os estudos preliminares com voltametria cíclica. O objetivo primário foi determinar qual seria o melhor material aglutinante, ficando a escolha ficou entre óleo mineral e o epóxi. Feito isso as próximas etapas do trabalho foram a montagem do eletrodo e o seu estudo usando a técnica da voltametria cíclica e posterior imobilização da enzima *Horseradish peroxidase* (HRP). Durante essa etapa foram utilizadas duas polianilinas de origens diferentes. A primeira foi cedida pelo Instituto de Macromoléculas (IMA) - UFRJ, que foi comprada na empresa PANIPOL. A segunda comprada na empresa SIGMA, sendo que a polianilina usada nos testes preliminares foi a PANIPOL.

3.1. Ângulo de Contato

O principal objetivo da determinação do ângulo de contato das pastilhas de grafite/PANI é caracterizar a hidrofobicidade dos compósitos. O ângulo de contato pode ser medido através da formação de uma gota de um líquido na superfície do sólido. O ângulo de contato é o ângulo formado entre interface sólido/líquido e a interface líquido/ar, como ilustrado na figura 3.1.

A equação de Young, também mostrada na figura 3.1, é usada para descrever as interações entre as forças de adesão e coesão e para medir a energia da superfície.



(fonte: <http://www.ramehart.com/goniometers/contactangle.htm>)

Figura 3.1: Ilustração do ângulo de contato.

Quando a gota tem um ângulo de contato maior que 90° significa que a amostra é hidrofóbica. Essa situação é exemplificada pela baixa molhabilidade, baixa aderência e baixa energia de superfície. Já quando a gota tem um ângulo de contato menor que 90° , a amostra é hidrofílica. Essa condição reflete melhor molhabilidade, melhor aderência e maior energia de superfície.

O equipamento usado para fazer essas medidas é o goniômetro modelo DataPhysics OCA15. No goniômetro uma gota de água bidestilada é depositada sobre a amostra com a ajuda de uma agulha automática. Através do software o conjunto amostra/gota é fotografado e o ângulo de contato é determinado.

3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para analisar a morfologia da superfície foi realizada uma microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram preparadas pela mistura física dos dois componentes e posterior prensagem. As pastilhas resultantes foram analisadas em microscópio eletrônico modelo JEOL JSM6460LV. Foram fixadas ao porta-amostra (stub) utilizando fita adesiva de face dupla de carbono para melhorar a condutividade, porém, por considerar que o compósito ser condutor o suficiente, as amostras não foram metalizadas com tinta de ouro. As pastilhas analisadas no MEV por dispersão de energia (EDS). Micrografias representativas foram escolhidas para ilustrar cada pastilha de compósitos.

3.3. Condutividade Elétrica

Na construção de um biossensor uma das propriedades mais importantes da matriz de imobilização é a condutividade elétrica. Já que é preciso a matriz apresentar uma alta condutividade para que o biossensor seja eficaz.

O método usado para a determinação da condutividade foi o do eletrômetro, que é baseado em medidas de resistividade elétrica pelo método duas pontas ou dois terminais. Esse método é bastante comum e também de muito fácil utilização. Conhecendo-se as dimensões do material, pode-se fazer uma medida direta de sua resistência elétrica medindo-se a diferença de potencial e a corrente elétrica que flui através da amostra. O método do eletrômetro é um método padrão, recomendado pela norma técnica ASTM (D257-99) quando o material a ser analisado possui uma alta resistência elétrica. O modelo do equipamento usado para fazer essa medida foi ICEL MD-6700.

Para o cálculo da resistividade, basta medir a corrente e usar os valores da tensão aplicada e das dimensões da amostra de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Resistividade } (\Omega \cdot \text{mm}) = \text{Área} \cdot \text{Resistência} / \text{Espessura}$$

Como a condutividade é o inverso da resistividade, temos:

$$\text{Condutividade} = \text{Espessura} / (\text{Área} \cdot \text{Resistência}).$$

3.4. *Horseradish peroxidase*

3.4.1. Tratamento e Purificação da HRP

A enzima *Horseradish peroxidase* da *Toyobo* liofilizada vem misturada com terra diatomácea, devendo ser solubilizada, filtrada e tratada. O procedimento adotado para tratamento e preparo da solução da enzima é descrito abaixo:

- i. Pesar 3,0g de enzima e suspender em 30mL de solução tampão fosfato pH 7,0;
- ii. Filtrar em papel de filtro com porosidade de 6µM;
- iii. Hidratar a membrana de diálise *SPECTRUM® (Spectra/Por molecularporus membrane tube* com espessura de parede de 25mm, 16mm de diâmetro, faixa de peso molecular 12000 – 14000 kDalton) antes de abri-la, com água MilliQ;

- iv. Recolher o volume de filtrado, colocar na membrana de diálise e fechar as extremidades.
- v. Colocar a membrana imersa em água MilliQ na geladeira por 48 horas e sob agitação. Trocar a água de 6 a 8 vezes;
- vi. Manter a solução congelada em frasco âmbar.

3.4.2. Determinação da Concentração de HRP na Solução Enzimática

Para a determinação da concentração enzimática foi usado, inicialmente, o método de Peterson, também conhecido como Lowry modificado. Porém esse método não mostrou ser sensível para detectar as pequenas variações de concentração, então, o método de Bradford passou a ser usado. A seguir descrevem-se as duas metodologias.

Método de Peterson (Lowry modificado):

Preparo das soluções:

Reagente Lowry:

- 20 g de carbonato de sódio em 100 mL de água MiliQ;
- 0,2 g de sulfato de cobre em 40 mL de água MiliQ;
- 0 4 g de tartarato de sódio e potássio em 40 mL de água MiliQ.

Misturar a solução de sulfato de cobre com a de tartarato de sódio e potássio e completar a 10 mL. Em seguida, despejar a solução de carbonato de sódio sobre a solução de cobre-tartarato (Fundamental que seja nesta ordem). Guardar em frasco âmbar.

Reagente de Follin:

Diluir a solução estoque de Follin na proporção 1:1 em água MiliQ e guardar em frasco âmbar.

Elaboração da curva padrão:

O procedimento segue na tabela abaixo:

Tabela 3.1: Procedimento para determinação da curva padrão.

Tubos	Albumina 1 mg/mL (μ L)	Água (μ L)	Lowry (μ L)
B	0	1200	1200
1	30	1170	1200
2	45	1155	1200
3	60	1140	1200
4	90	1110	1200
5	120	1080	1200

Após esse procedimento esperar 10min e adicionar 600 μ L da solução de Folin. Espera 30min e ler a absorbância em um espectrofotômetro em 750nm, zerando com o branco.

Fazer em duplicata.

O mesmo procedimento foi realizado para as amostras da solução enzimática. Para calcular a concentração foi usada a equação da curva padrão determinada previamente.

Método de Bradford:

Preparo do reagente de Bradford:

- i. Dissolver 100mg de Coomassie Brilliant Blue em 50mL de etanol 95%;
- ii. Adicionar 100mL de ácido fosfórico 85% (p/v) e perfazer o volume a 1L;
- iii. Filtrar duas vezes com papel de filtro;
- iv. Aguardar 5 a 10 min e ler a absorbância a 595nm.

Preparo da curva padrão:

- i. A partir de uma solução de albumina 1mg/mL em tampão fosfato 0,1M e pH 6,5, preparar as seguintes diluições:

Tabela 3.2: Diluições para preparo da curva padrão.

BSA (μ L)	H2O (μ L)
0	600
100	500
200	400
300	300
400	200
500	100
600	0

- ii. Retirar 30 μ L de cada solução e adicionar a 3mL do reagente de Bradford;
- iii. Aguardar 5 a 10 min;
- iv. Ler a absorbância a 595nm, usando como branco o reagente de Bradford.

3.4.3. Determinação da Atividade Enzimática

Para a determinação da atividade da solução enzimática foi usado o método turbidimétrico descrito abaixo. O ensaio requer a adição dos seguintes reagentes na cubeta na ordem indicada:

- 0,1 mL de solução de fenol 0.2 M;
- 1,5 mL de tampão fosfato pH 7.0;
- 0,1 mL de 4-aminoantipirina ($4,8 \times 10^{-2}$ M);
- 0,2 mL de peróxido de hidrogênio ($2,0 \times 10^{-3}$ M);
- 0,1 mL da amostra de peroxidase (Va).

Registrar a absorbância a 510 nm a cada segundo no minuto inicial da reação. O ensaio foi executado em duplicata.

A atividade é calculada usando a seguinte fórmula:

$$A(U/mL) = \left[\frac{(\Delta Abs/s) * Vc}{7210 * Va} \right] * 10^3 * Fd * 60 \quad \text{Eq. (3.1)}$$

Onde:

A = atividade;

U = unidade de atividade, que é definida como o número de μmol de peróxido de hidrogênio utilizado em 1 minuto sob as condições indicadas acima;

Abs/s = variação da absorbância por minuto ou o coeficiente angular da reta obtida;

Vc = volume total (mL);

Va = volume da amostra (mL);

Fd = fator de diluição.

3.5. Construção de Eletrodo

O procedimento para a construção do eletrodo variou de acordo com o tipo de imobilização enzimática e se houve ou não uma etapa de pré-tratamento do grafite. Abaixo é descrito o processo de peroxidação do grafite e também o procedimento base para a construção do eletrodo de trabalho.

Peroxidação do Grafite:

- i. 1g de grafite em pó é submetido a aquecimento em forno a 100°C durante 2h para eliminar possíveis adsorvatos;
- ii. Suspende-se o grafite pré-aquecido em 100mL de solução de peróxido de hidrogênio 30%;
- iii. Agitar bem e deixar em repouso por 96h em frasco tampado e sob abrigo de luz;
- iv. Separar por filtração e enxaguar com água destilada;
- v. Secar o papel de filtro em um dessecador.

Preparo do Eletrodo:

- i. Lixar o fio de cobre com lixa 400, inseri-lo no tubo de PVC deixando um espaço equivalente a uma altura de 3mm na outra extremidade para colocar o compósito;
- ii. Pesquisar, em um vidro de relógio, 14mg de polianilina e 6mg de grafite e homogeneizar;
- iii. Adicionar o equivalente a meia gota da resina epóxi (ou óleo mineral) e misturar até formar uma pasta homogênea;
- iv. Inserir a pasta na extremidade vazia do tubo de PVC;
- v. Manter a 30°C por 24h;
- vi. Lixar com lixa 1200 e armazenar a 4°C.

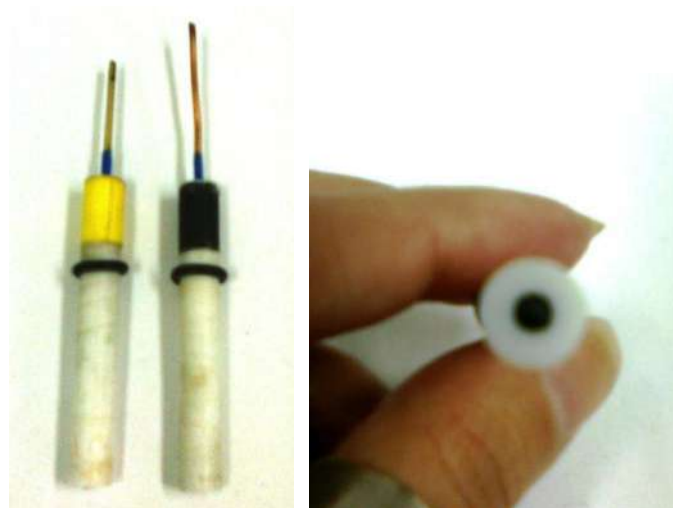


Figura 3.2: Fotos dos eletrodos prontos.

3.6. Imobilização Enzimática

Foram testadas as três metodologias de imobilização descritas a seguir:

3.6.1. Adsorção Física da HRP

Para esse método, o eletrodo foi simplesmente imerso em uma solução enzimática contendo HRP com uma concentração de 0,0217mg/mL durante 8h e sob temperatura de 4°C. Após esse período o eletrodo foi lavado com água destilada para retirar as moléculas não adsorvidas e evitar erros de reprodutibilidade nas análises.

3.6.2. Ligação Covalente da HRP

- i. Submerge-se o eletrodo em 1mL de solução de aminopropiltriétoxissilane (APTES) 5% em água milliQ durante 60 min a temperatura ambiente;
- ii. Enxaguar 3 vezes todo o suporte com água deionizada e etanol absoluto sequencialmente;
- iii. Submergir o suporte em uma solução aquosa de glutaraldeído 2,5% por 2h a 4°C;
- iv. Enxaguar com solução tampão fosfato pH = 6,8;
- v. Submergir em solução de HRP e incubar por 12h a 30°C;
- vi. Enxaguar com tampão fosfato pH = 6,8 e armazenar a 4°C em tampão.

3.6.3. Adsorção Física da HRP e AOD

Neste procedimento as enzimas são misturadas ao grafite e a polianilina durante a construção do eletrodo, de acordo com o seguinte roteiro (Serra, 2003):

- i. Pesar, em um vidro de relógio, 14mg de polianilina e 6mg de grafite e homogeneizar;
- ii. Adicionar 1100µL de solução de HRP e 15µL de solução de AOD;
- iii. Homogeneizar e secar a 30°C;
- iv. Seguir com o procedimento da construção do eletrodo.

Os volumes das soluções enzimáticas são determinados de forma que a razão entre unidades da enzima e a massa de compósito seja aproximadamente a mesma para as duas enzimas, nesse caso temos que:

$$\text{Conc}_{\text{HRP}} = 0,2095\text{mg/mL e } A_{\text{HRP}} = 20,4716 \text{ U/mL}$$

$$\text{Conc}_{\text{AOD}} = 47\text{mg/mL e } A_{\text{AOD}} = 37 \text{ U/mg}$$

Então:

$$\text{Conc}_{\text{HRP}} = 1,1259 \text{ U/mg}_{\text{comp}} \text{ e } \text{Conc}_{\text{AOD}} = 1,3043 \text{ U/mg}_{\text{comp}}.$$

Onde:

Conc_X = concentração da enzima X

A_X = atividade da enzima X

$\text{U/mg}_{\text{comp}}$ = unidades de enzima por miligrama do compósito.

3.7. Voltametria Cíclica

Os testes de voltametria cíclica foram realizados utilizando um potenciostato de AUTOLAB modelo PGSTAT12 conectado a célula eletroquímica, que é constituída pelo eletrodo de trabalho (biossensor), eletrodo de referência (prata/cloreto de prata) e o eletrodo auxiliar (platina). Os parâmetros utilizados durante o processo foram:

- Potencial inicial – - 0,5V;
- Potencial final – 0,5V;
- Número de scans – 2;
- Velocidade de varredura – 40mV/s.

A solução usada variou de acordo com o eletrodo que estava sendo analisado. Durante os testes iniciais, em que não havia enzima imobilizada ou com somente a HRP imobilizada, foi usada solução 1mM de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) dissolvido em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,1M.

Nos testes em que somente a HRP tinha sido imobilizada pelo método de ligação covalente também foram feitos voltamogramas em que era adicionada solução $2 \times 10^{-3}\text{M}$ de

peróxido de hidrogênio àquela solução de forma que a concentração de peróxido variasse da seguinte maneira: $1,48 \times 10^{-4} \text{M}$, $2,76 \times 10^{-4} \text{M}$, $3,87 \times 10^{-4} \text{M}$ e $4,85 \times 10^{-4} \text{M}$.

Nos testes em que as duas enzimas haviam sido imobilizadas por mistura física a solução usada foi a tampão fosfato pH 7,0 e com adição de etanol 20% de forma que a percentual de etanol na mistura variasse da seguinte maneira: 3,33%, 5,71%, 7,50%, 8,89% e 10%, com o objetivo de montar uma curva padrão. Além disso, todas as análises foram feitas com eletrodos com matrizes de imobilização constituídas por grafite (o mesmo usado nas etapas anteriores) e grafite peroxidado e também um eletrodo com grafite peroxidado preparado com a adição de 0,5mL de glutaraldeído 2,5% na etapa de imobilização das enzimas HRP e AOD.

Capítulo IV – Resultados e Discussão

4.1. Ângulo de Contato

Na tabela abaixo é descrito os ângulos de contato médios obtidos. Lembrando que foram feitas quatro amostragens e o ângulo foi medido dos lados esquerdo e direito da gota de água. O ângulo obtido é a média aritmética desses valores.

Tabela 4.1: Ângulos de contato das amostras.

% de Grafite	0%	1%	3%	5%	10%	20%	30%	100%
Ângulo de Contato	13,7	17,6	20,2	9,4	18,8	21,7	20,1	111,6

A partir da análise dos dados percebe-se que a amostra com 100% de grafite apresenta o ângulo de contato em torno de 110° , demonstrando um nível considerável de hidrofobicidade, enquanto que as amostra com um determinado percentual de PANI tiveram o ângulo de contato próximo de 20° , com exceção de 5%, o que as caracterizam como hidrofílicas. O motivo da amostra com 5% de grafite ter um ângulo menor é que essa pastilha foi ligeiramente danificada antes da análise e como não seria possível refazer o teste, o ângulo foi determinado apesar do problema.

4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A figura abaixo mostra as micrografias correspondentes às pastilhas de 0, 100, 1, 5, 10, 20% de grafite, além de pastilhas com 30% de grafite sem e com a enzima HRP imobilizada por adsorção. A ampliação foi de 200 vezes.

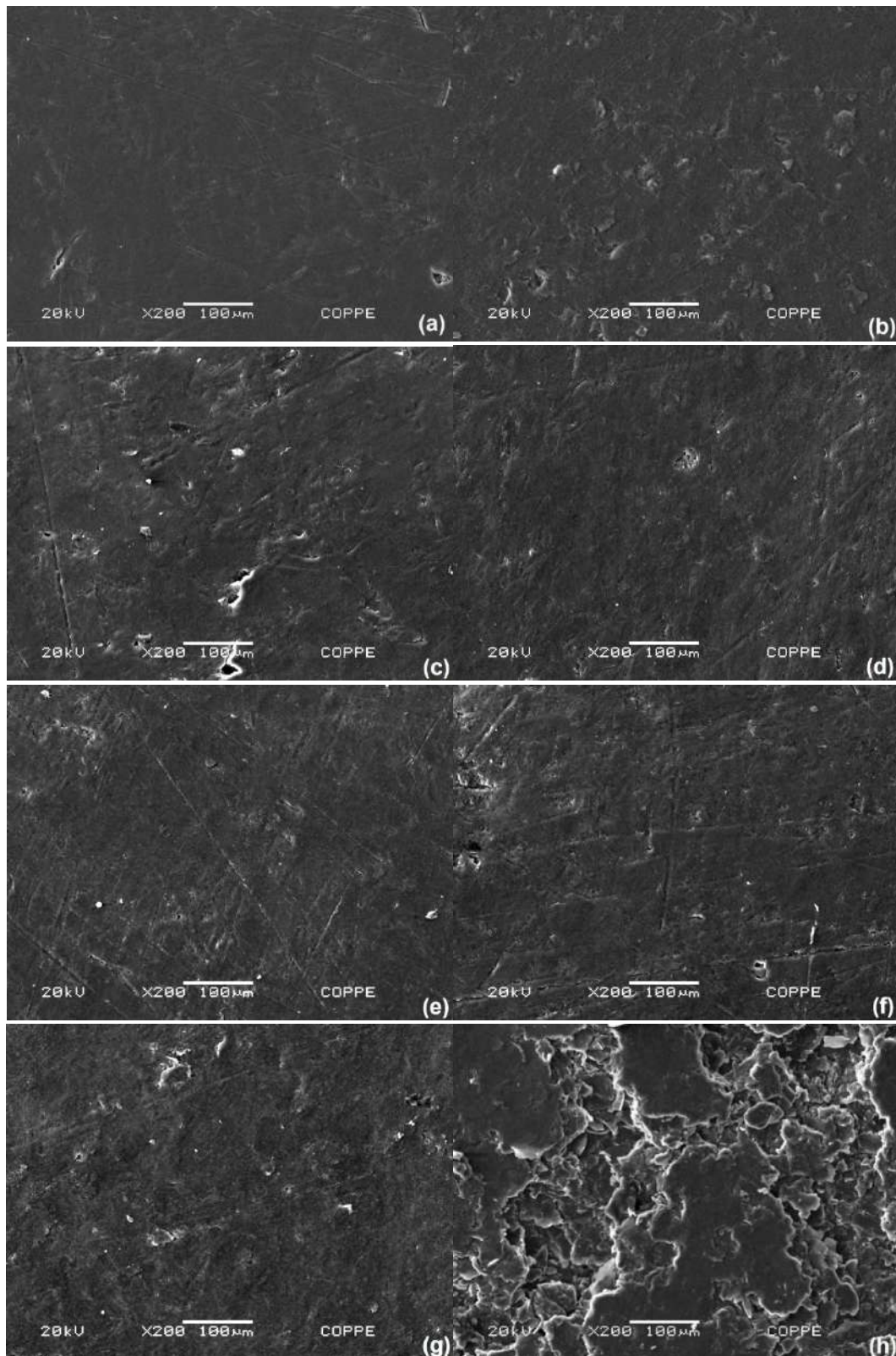


Figura 4.1: Micrografias dos compósitos com percentual de grafite de (a) 0%, (b) 100%, (c) 1%, (d) 5%, (e) 10%, (f) 20%, (g) 30% e (h) 30% com HRP imobilizada.

Por essas fotos percebe-se que não há muita diferença entre a morfologia dos compósitos, com exceção da última fotografia, que mostra a enzima aderida na superfície do compósito.

4.3. Condutividade Elétrica

A partir da condutividade elétrica medida para cada compósito (0, 1, 3, 5, 10, 20, 30 e 100% de grafite) obtém-se o seguinte gráfico da figura 4.2. E, para efeito de comparação, foi inserido no gráfico o valor da condutividade elétrica da polianilina SIGMA foi obtido utilizando o mesmo equipamento.

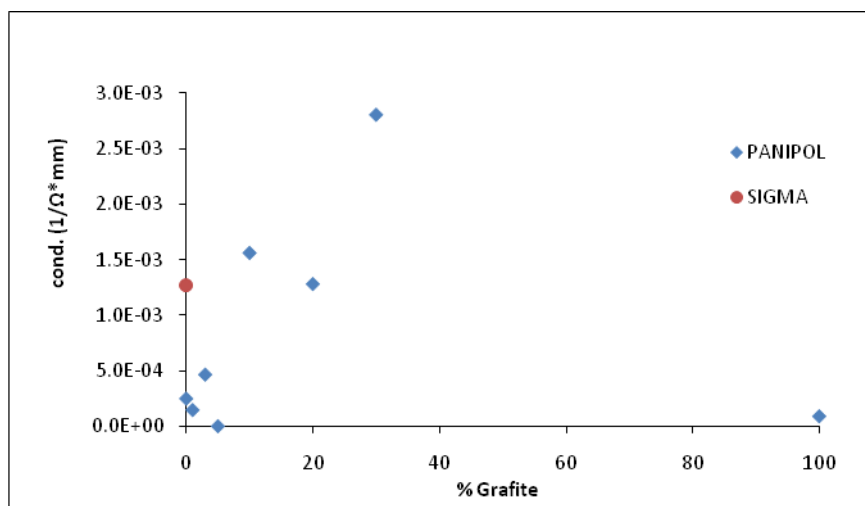


Figura 4.2: Gráfico da condutividade contra o percentual de grafite no compósito.

Observando o gráfico acima podemos tirar duas conclusões. A primeira é que dentre as diversas concentrações de grafite, o compósito que tem a maior condutividade elétrica é a de 30%, e a segunda é que a polianilina da SIGMA é mais condutora que a polianilina PANIPOL.

4.4. Atividade e Concentração da Solução de HRP

4.4.1. Concentração Enzimática

Método de Petterson (Lowry Modificado):

A partir da curva padrão obtém-se a seguinte equação de reta:

$$Conc. \left(\frac{mg}{mL} \right) = 0,0651 * Abs - 0,0026$$

Para calcular a eficiência da imobilização foi medida a concentração da solução enzimática antes e depois do procedimento de imobilização por adsorção da HRP e foram obtidos os seguintes valores:

$$\text{Conc}_1 = 0,0217\text{mg/mL}$$

$$\text{Conc}_2 = 0,0222\text{mg/mL}$$

Onde:

Conc_1 = concentração da solução enzimática antes da imobilização;

Conc_2 = concentração da solução enzimática depois da imobilização.

Como os valores obtidos são muito próximos, a partir deste ponto foi usada a metodologia de Bradford para determinar a concentração da solução de HRP.

Método de Bradford:

Através da curva padrão desse método obteve-se a seguinte equação para o cálculo da concentração:

$$\text{Conc.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = 0,3234 * \text{Abs} - 0,0036$$

Para calcular a eficiência da imobilização foi medida a concentração da solução enzimática antes e depois do procedimento de imobilização por ligação covalente da HRP e foram obtidos os seguintes valores:

$$\text{Conc}_1 = 0,074\text{mg/mL}$$

$$\text{Conc}_2 = 0,081\text{mg/mL}$$

Onde:

Conc_1 = concentração da solução enzimática antes da imobilização;

Conc_2 = concentração da solução enzimática depois da imobilização.

Nota-se que a concentração da solução enzimática aumenta, quando deveria diminuir (o mesmo acontece quando a concentração é medida pelo método de Lowry modificado). Isso é explicado pelo fato de que a polianilina, que é higroscópica, absorve a água presente na solução, aumentando a concentração.

Essa teoria é testada pela submersão de um eletrodo em água durante 19 horas. A massa desse eletrodo foi medida antes e depois desse procedimento:

$$m_{\text{antes}} = 5,2685\text{g}$$

$$m_{\text{depois}} = 5,2762\text{g}$$

O resultado mostra que houve um aumento da massa do eletrodo, sugerindo que a polianilina absorve a água presente no meio.

O método de Bradford também foi usado para calcular a concentração da solução de HRP utilizada no processo de adsorção da HRP e AOD. O valor encontrado foi:

$$\text{Conc}_{\text{HRP}} = 0,2095\text{mg/mL}$$

4.4.2. Atividade Enzimática

A atividade calculada da solução de HRP antes e depois da imobilização por adsorção é:

$$a_1 = 11,93\text{U/mL}$$

$$a_2 = 11,10\text{U/mL}$$

$$\eta = 7,0\%$$

Onde:

a_1 = atividade da solução enzimática antes da imobilização;

a_2 = atividade da solução enzimática depois da imobilização;

η = eficiência da imobilização.

Para a metodologia de imobilização por ligação covalente as atividades calculadas foram:

$$a_1 = 52,98\text{U/mL}$$

$$a_2 = 46,32\text{U/mL}$$

$$\eta = 12,6\%$$

E a atividade da solução de HRP usada na imobilização por adsorção da HRP e AOD é:

$$a = 20,4716\text{U/mL}$$

4.5. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica foi usada durante várias etapas do projeto, para tomar diversas decisões. A primeira foi qual seria o agente aglutinante, epóxi ou óleo mineral, em seguida para decidir qual era a melhor polianilina, a PANIPOL ou SIGMA e para determinar qual

era a velocidade de varredura ideal. A voltametria cíclica também foi usada para estudar os métodos de imobilização por adsorção e por ligação covalente com somente a enzima peroxidase e também foi usada nos testes finais com as duas enzimas imobilizadas.

4.5.1. Decisão Entre Óleo Mineral e Epóxi

Para decidir qual seria o melhor agente aglutinante foram construídos dois eletrodos com proporção 30:70 de grafite e polianilina e em cada eletrodo foi composto por um agente diferente, ou o óleo mineral ou o epóxi. E os eletrodos foram testados usando a voltametria cíclica, os resultados estão nas figuras 4.3 e 4.4.

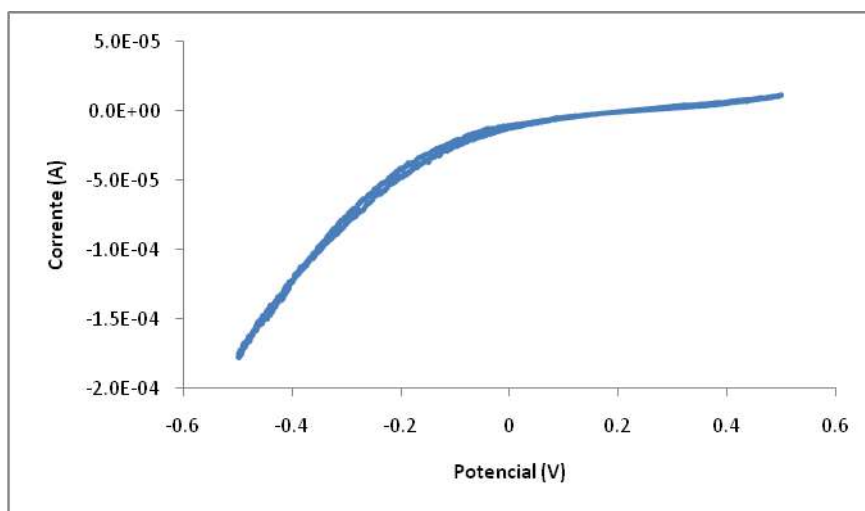


Figura 4.3: Voltametria cíclica do eletrodo com óleo mineral em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 100mV/s$.

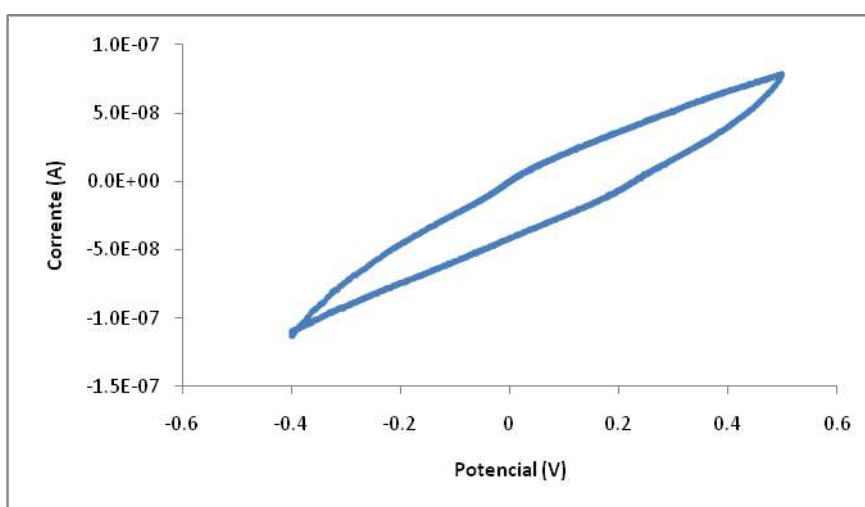


Figura 4.4: Voltametria cíclica do eletrodo com epóxi em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 100mV/s$.

Por esses resultados percebe-se que nenhum dos dois eletrodos obteve resultados muito bons, porém o eletrodo com epóxi foi o que apresentou o resultado mais próximo do ideal, portanto este foi o agente escolhido para a continuação do projeto.

4.5.2. Decisão Entre Polianilina PANIPOL e SIGMA

Durante a execução do projeto teve-se acesso a duas polianilinas de origem diferentes, uma da PANIPOL e outra da SIGMA. Para estabelecer qual seria a melhor, foram construídos dois eletrodos, cada um com uma polianilina. Os eletrodos foram testados usando a voltametria cíclica, os resultados são vistos nas figuras abaixo.

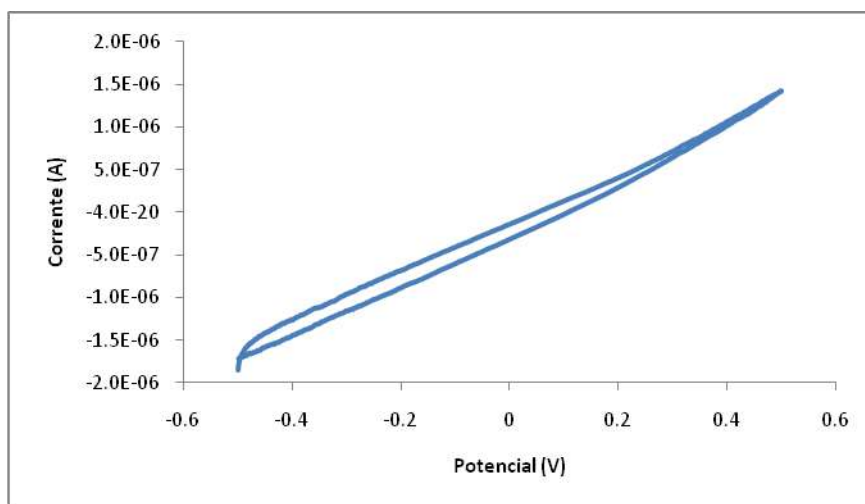


Figura 4.5: Voltametria cíclica do eletrodo com PANI PANIPOL em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$.

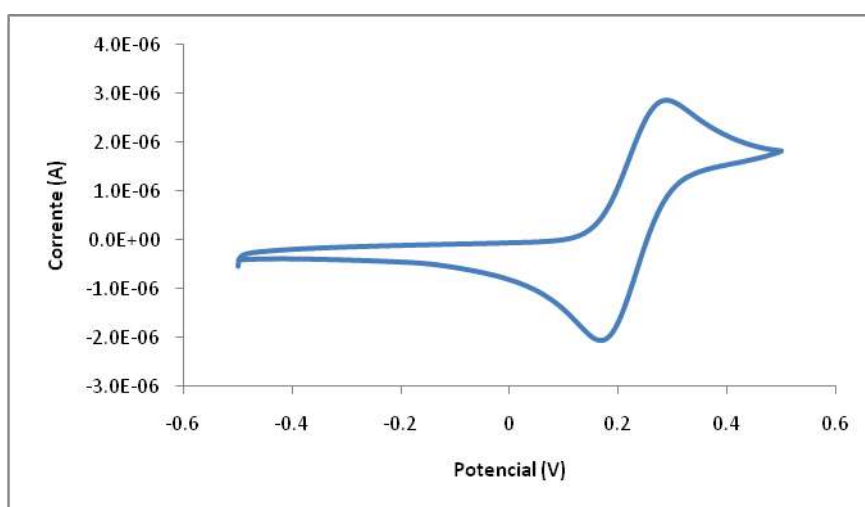


Figura 4.6: Voltametria cíclica do eletrodo com PANI SIGMA em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40mV/s$.

Como podemos notar que os voltamogramas da figura 4.5 e figura 4.6, que para mesma variação de potencial de $\pm 0,6V$ a uma velocidade de varredura de $40mV s^{-1}$, observamos perfis voltamétricos diferentes. De modo que, para compósito a base de grafite e PANI Sigma (Figura 4.6) observamos uma maior definição dos picos catódicos e anódicos, nos potenciais de $0,18V$ e $0,30V$. E portanto apresenta melhor resultado, em relação à intensidade de corrente, que as encontradas para o de polianilina PANIPOL 70% (grafite, m/m), condições essas, importantes para a construção do biossensores eletroquímicos, portanto dada estas condições será fixada para os próximos estudos.

Após esta primeira evidência os compósitos obtidos com varias composições de PANI e diferentes fontes de polianilina misturado diretamente com o grafite, foram caracterizados por meio da técnica de voltametria cíclica.

4.5.3. Decisão da Velocidade de Varredura Ótima

Pelos resultados dos experimentos anteriores, conclui-se que o eletrodo compósito 30:70 m/m (grafite: PANI) apresenta melhor resposta voltamétrica. Portanto, ele foi usado para avaliar a resposta do efeito da velocidade de varredura usando solução de ferricianeto de potássio $1,0 mmol L^{-1}$ em $KCl 0,1 mol L^{-1}$.

As velocidades de varredura testadas foram de 10, 20, 40, 60 e 80 $mV s^{-1}$ e selecionaram-se somente as velocidades de 10, 40 e 80 $mV s^{-1}$, de forma a não poluir o gráfico, para serem apresentadas na Figura 4.7 para ilustrar a tendência.

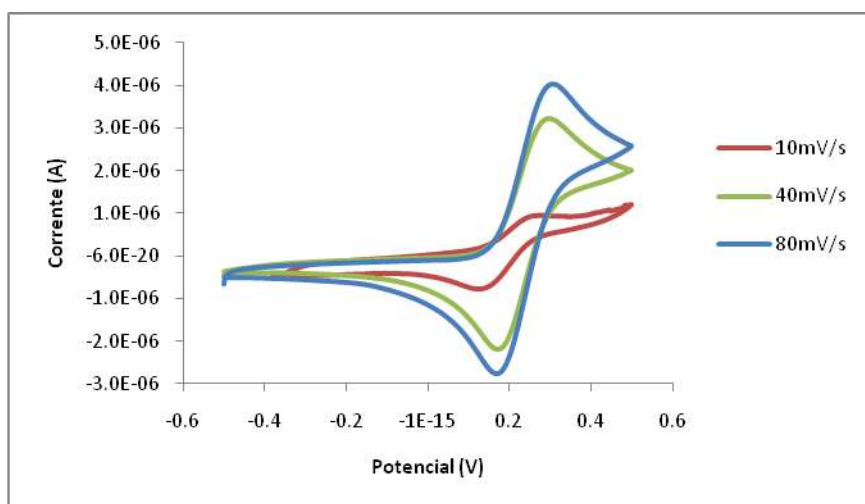


Figura 4.7: Voltametria cíclica com diferentes velocidades de varredura em solução de $K_4Fe(CN)_6$ $1mM$ dissolvido de $KCl 0,1M$.

Os voltamogramas cíclicos obtidos mostram um aumento na intensidade de corrente e um ligeiro deslocamento dos picos anódico e catódico com o aumento da velocidade de varredura.

Para comprovar o bom funcionamento do eletrodo, se calcula o desvio entre a intensidade obtida experimentalmente e a intensidade teórica:

- Cálculo da Intensidade Teórica:

Lembrando que a equação para o cálculo da intensidade teórica é:

$$I_p = 2,687 \times 10^5 \times n^{3/2} \times A \times D^{1/2} \times C \times V^{1/2}$$

Onde:

$$n = 1;$$

$$A = 1,075 \times 10^{-2} \text{ cm}^2;$$

$$D = 6,819 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s};$$

$$C = 1 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^3;$$

$$V = 0,040 \text{ V/s.}$$

$$\text{Então: } I_p = 1,508 \times 10^{-6} \text{ A.}$$

- Determinação da Intensidade Experimental:

No pico anódico a intensidade (altura do pico) foi de $2,69 \times 10^{-6}$ A e no pico catódico a intensidade foi de $-2,86 \times 10^{-6}$ A.

Se o desvio é calculado pela fórmula:

$$\text{Desvio} = [(I_p^{\text{exp}} / I_p^{\text{teo}}) - 1] \times 100$$

Temos que:

$$I_p^{\text{ano}} = 78,24\%$$

$$I_p^{\text{cat}} = 89,40\%$$

Então temos que o comportamento do eletrodo está próximo do ideal, porém ainda é possível melhorar esse resultado.

Esse mesmo cálculo pode ser feito para as outras velocidades:

Tabela 4.2: Valores de Ipa e Ipc para as diferentes velocidades

Velocidade (mV/s)	(Velocidade) ^{1/2}	Ipa	Ipc
10	3,16227766	7,60E-07	-9,87E-07
20	4,472135955	2,64E-06	-2,69E-06
40	6,32455532	2,69E-06	-2,86E-06
60	7,745966692	2,64E-06	-2,90E-06
80	8,94427191	3,23E-06	-3,57E-06

A partir desses valores é possível montar o gráfico da raiz quadrada da velocidade de varredura contra os valores de Ipa e Ipc. Esse gráfico deve mostrar a relação linear entre esses parâmetros encontrados nos voltamogramas da Figura 4.7, em função da raiz quadrada da velocidade de varredura, indicando que a transferência de massa é controlada por difusão (Figura 4.8), segundo a Equação 3.1 de Randles-Sevcik.

De acordo com a Equação 2.1 (pag 24), se todas as outras condições forem mantidas constantes, a corrente de pico deverá ser proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura para sistemas reversíveis com controle difusional, como no presente caso.

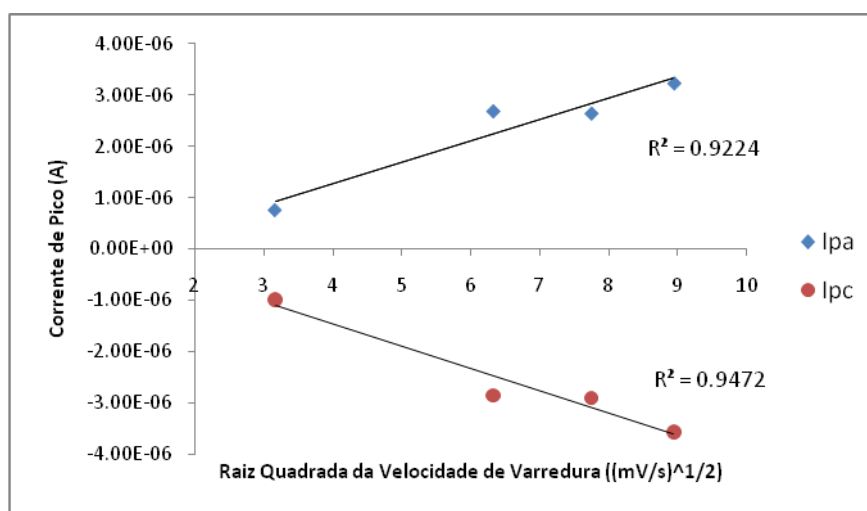


Figura 4.8: gráfico da raiz quadrada da velocidade de varredura versus os valores de Ipa e Ipc.

O gráfico mostra que há linearidade entre os parâmetros, se considerarmos o segundo ponto um ponto fora da curva (quando todos os pontos são considerados, os valores de R² são de 0,6652 para Ipa e de 0,7616 para Ipc).

Os resultados obtidos na tabela 4.2, mostram que, com o aumento da velocidade de varredura, ocorre um aumento da intensidade de corrente catódica o que sugere que a redução, ao invés da oxidação, do compósito grafite- PANI é cineticamente favorecida. Deve ser lembrado que o processo de oxidação é mais lento, pois envolve inicialmente a

formação de um cátion radical, que começa a partir da forma emeraldina, a PANI não condutor (reduzida) e, portanto, é cineticamente menos favorecidas. Para contornar esse fato, foi escolhida como velocidade de varredura padrão 40mVs^{-1} .

4.5.4. Estudo da Imobilização por Adsorção da HRP

Para estudar esse tipo de imobilização foram usados dois eletrodos, um com a enzima HRP imobilizada e outro sem.

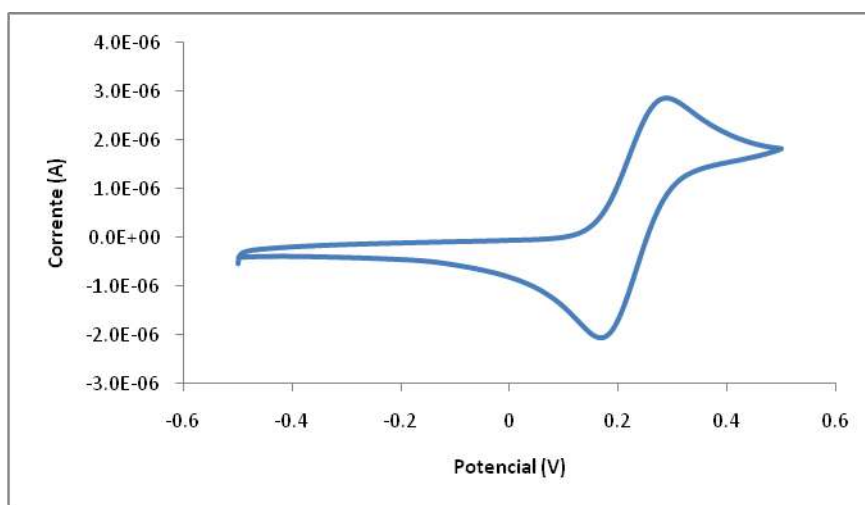


Figura 4.9: Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP imobilizada em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40\text{mV/s}$.

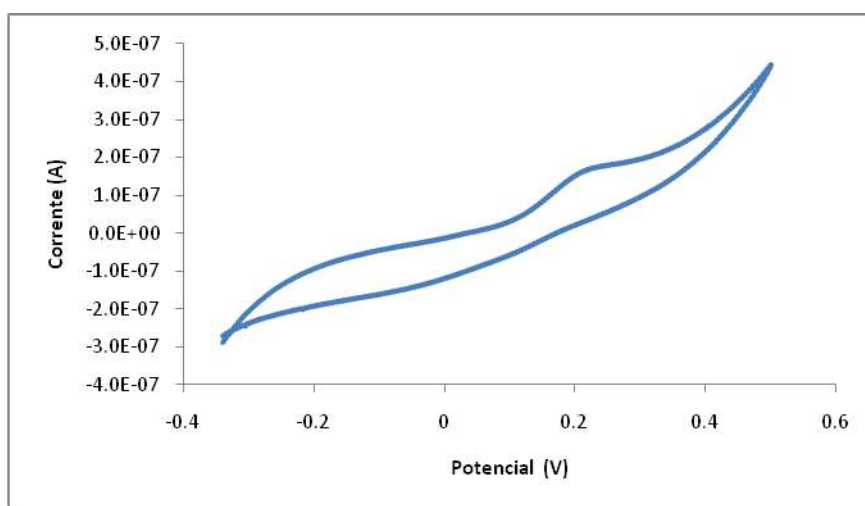


Figura 4.10: Voltametria cíclica do eletrodo com HRP imobilizada em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 40\text{mV/s}$.

Como o eletrodo com a peroxidase imobilizada apresentou apenas um leve pico anódico, foi testado a seguir uma nova metodologia de imobilização.

4.5.5. Estudo da Imobilização por Ligação Covalente

Os resultados obtidos para a imobilização covalente foram os seguintes.

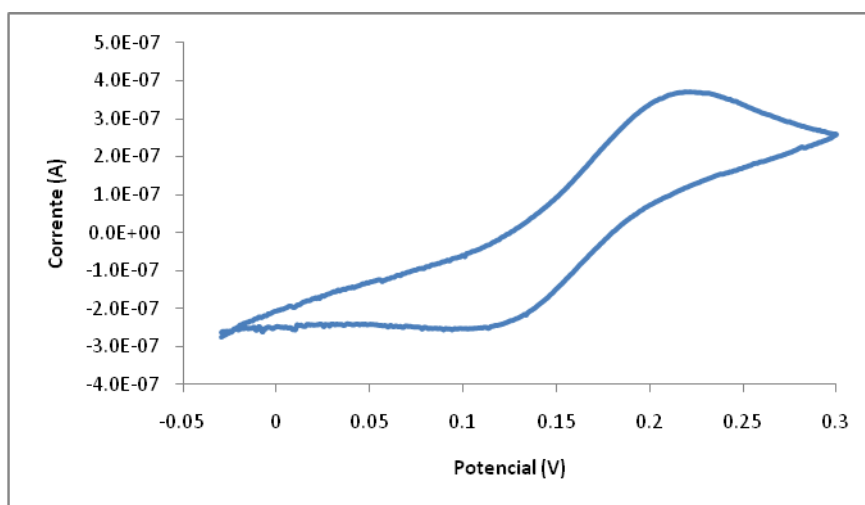


Figura 4.11: Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10mV/s$.

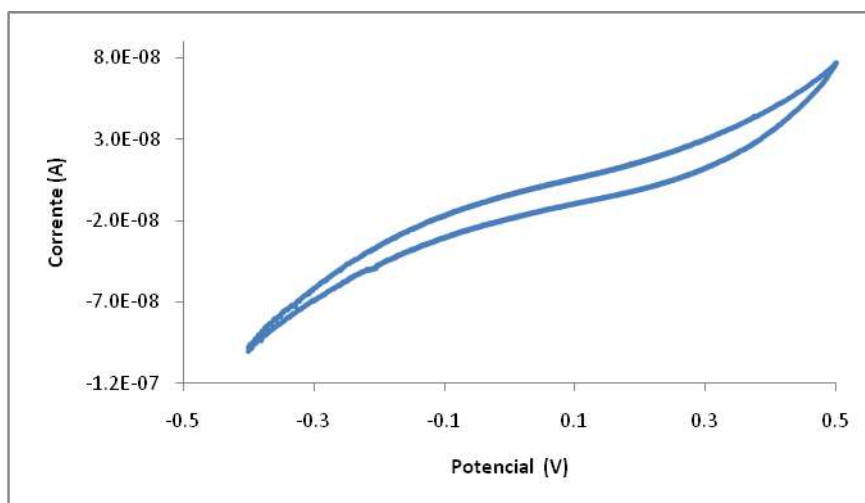


Figura 4.12: Voltametria cíclica do eletrodo com HRP imobilizada em solução de $K_4Fe(CN)_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10mV/s$.

Essa metodologia de imobilização também não apresentou bons resultados. Porém vale observar que voltamograma do eletrodo sem a enzima imobilizada ficou diferente do eletrodo sem a enzima imobilizada anterior, em que a enzima seria imobilizada por adsorção. Isso aconteceu porque neste eletrodo foi feito o procedimento para a imobilização por ligação covalente, mas usando água destilada no lugar da solução enzimática, o que interferiu no resultado final.

Além disso, esse eletrodo também foi testado de acordo com a variação da concentração de peróxido de hidrogênio.

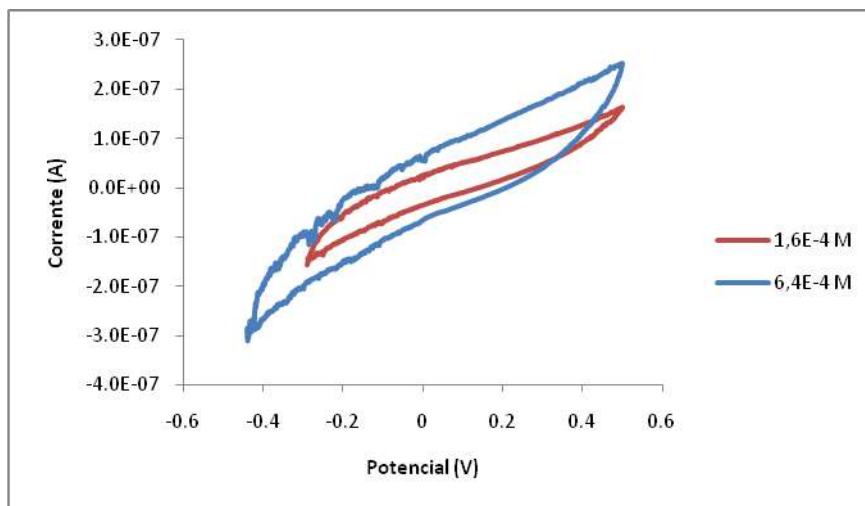


Figura 4.13: Voltametria cíclica com peróxido de hidrogênio $1,6 \times 10^{-4} \text{M}$ (Vermelho) e $6,4 \times 10^{-4} \text{M}$ (Azul) em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1mM dissolvido de KCl 0,1M e $V = 10 \text{mV/s}$.

Apesar de os voltamogramas acima não mostram qualquer pico óbvio redox, indicando que o composto grafite/ PANI/HRP não é eletroativo nesta faixa de potencial. O resultado mostra que o eletrodo é sensível a variação da concentração de peróxido de hidrogênio.

4.5.6. Estudo da Imobilização por Adsorção Física da HRP e AOD

Nessa etapa, o eletrodo foi construído de forma que as enzimas HRP e AOD fossem imobilizadas por mistura física das enzimas com a matriz de grafite (ou grafite peroxidado) e polianilina.

Abaixo o voltamograma, em solução tampão fosfato pH 7,0, do eletrodo com grafite e sem ou com as enzimas imobilizadas.

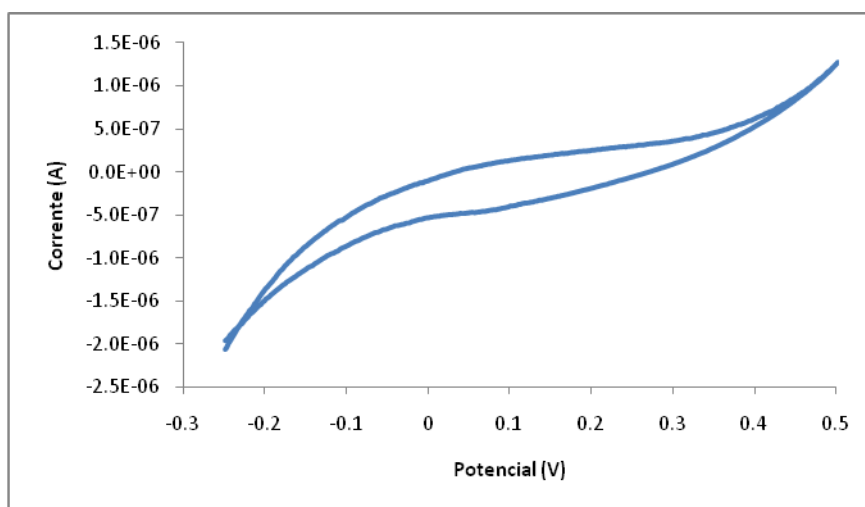


Figura 4.14: Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40 \text{mV/s}$, do eletrodo sem HRP e AOD imobilizadas.

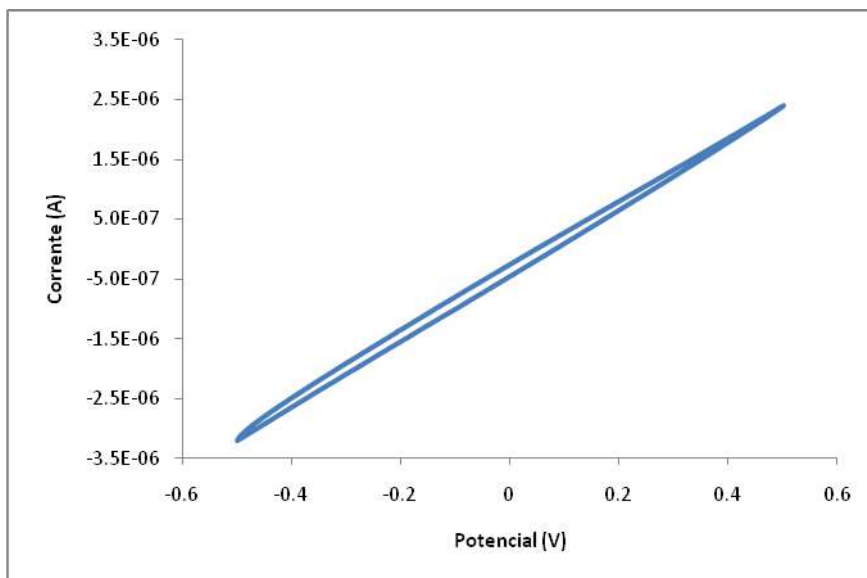


Figura 4.15: Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$, do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas.

Da mesma forma que nas etapas anteriores, os resultados não corresponderam ao esperado, inclusive houve uma queda significativa quando as enzimas são adicionadas.

Nos próximos testes o grafite foi substituído por grafite peroxidado, e os resultados estão apresentados nas figuras 4.14, 4.15 e 4.16 respectivamente para eletrodo com grafite peroxidado sem as enzimas HRP e AOD imobilizadas, eletrodo com grafite peroxidado com as enzimas imobilizadas e eletrodo com grafite peroxidado e glutaraldeído e com as enzimas imobilizadas.

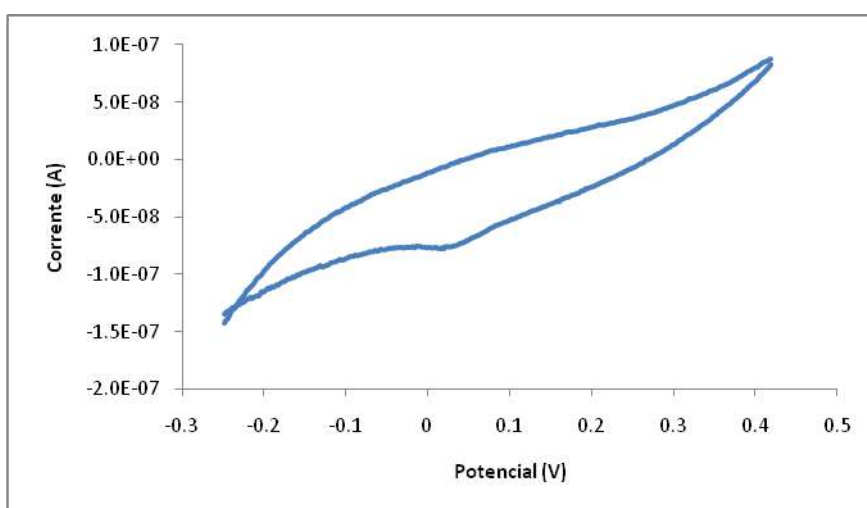


Figura 4.16: Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$, do eletrodo com grafite peroxidado sem HRP e AOD imobilizadas.

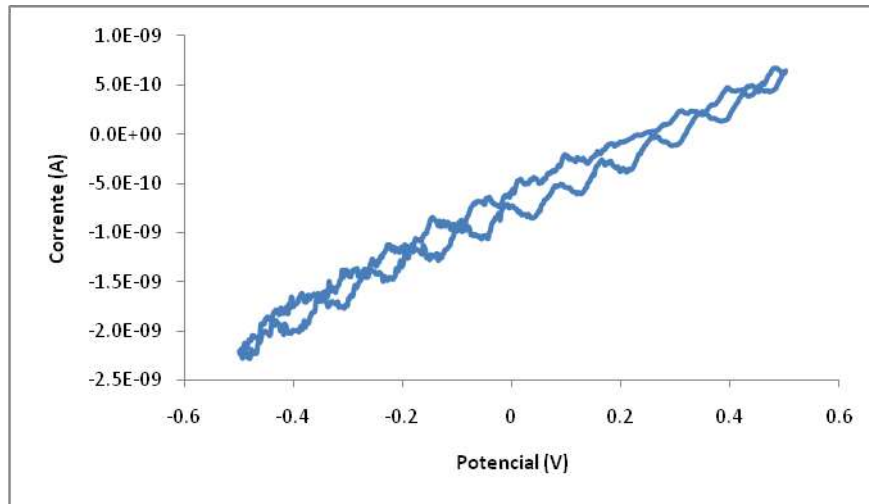


Figura 4.17: Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$, do eletrodo com grafite peroxidado com HRP e AOD imobilizadas.

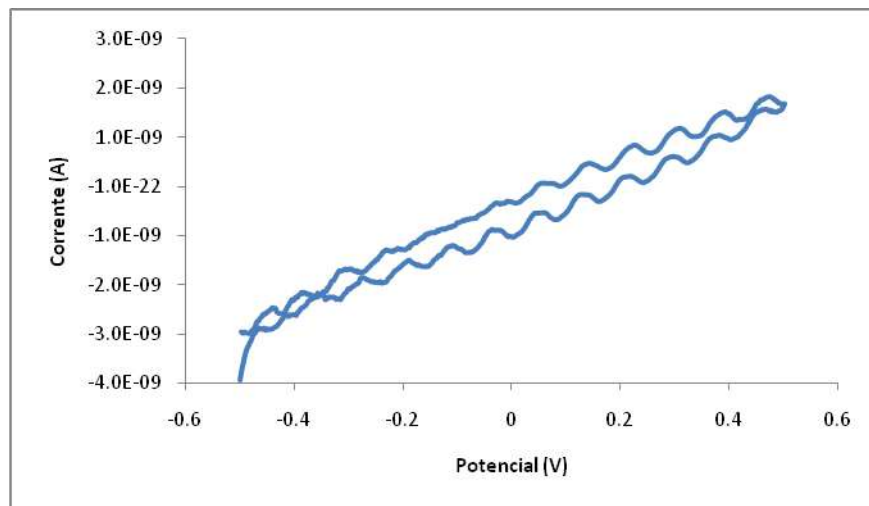


Figura 4.18: Voltametria cíclica, em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$, do eletrodo com grafite peroxidado com glutaraldeído e HRP e AOD imobilizadas.

Pelos resultados vê-se que o biossensor com grafite peroxidado sem enzimas teve um resultado ligeiramente melhor que o grafite sem o pré-tratamento, pois apresentou um pico catódico. Porém quando as enzimas são adicionadas, os resultados pioram consideravelmente, também se percebe que a adição de glutaraldeído induz uma ligeira melhora do sinal de resposta.

Estes mesmos eletrodos foram submetidos à voltametria cíclica usando a solução tampão fosfato pH 7,0 como base com adição gradual de etanol 20% de forma a obter várias concentrações de etanol. Na figura 4.19 estão os resultados mais relevantes do eletrodo de grafite sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.

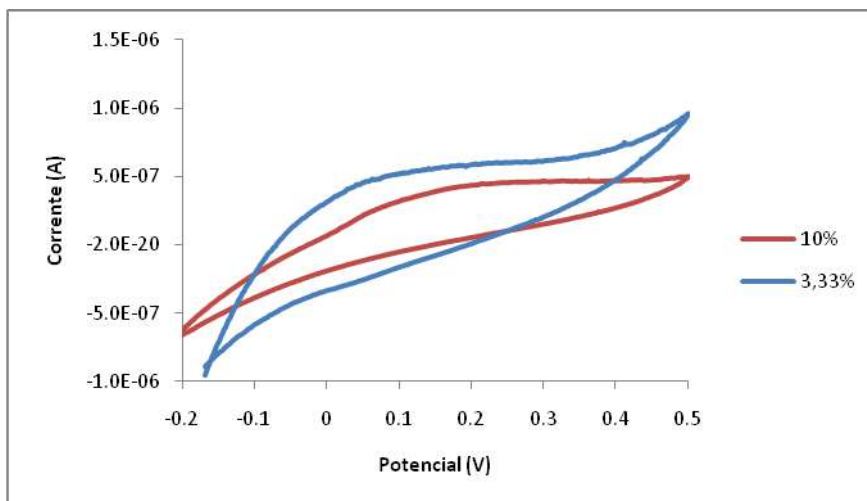


Figura 4.19: Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP e AOD immobilizadas, em solução de etanol 3,33% (Vermelho) e 10% (Azul) diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$.

O gráfico (figura 4.19) representa os voltamogramas do eletrodo de grafite sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio sem as enzimas immobilizadas em solução de etanol 3,33% e 10%. Nele vê-se que há uma mudança no perfil da curva em relação ao voltamograma em solução tampão fosfato pH 7,0. É possível enxergar um leve pico anódico, embora o mesmo não aconteça com o catódico, também nota-se que os picos das duas curvas se encontram em posições diferentes. Abaixo o voltamograma nas mesmas condições com o eletrodo com as enzimas immobilizadas.

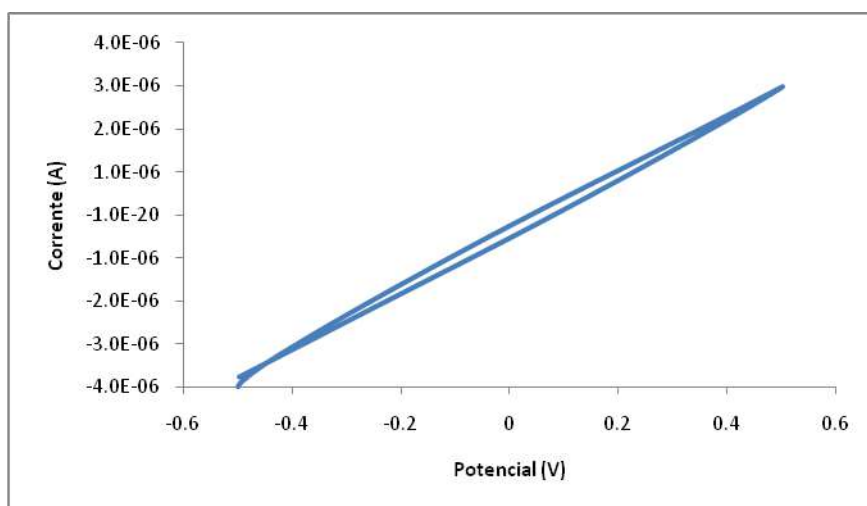


Figura 4.20: Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD immobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$.

O gráfico (figura 4.20) representa o voltamograma do eletrodo de grafite sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio com as enzimas immobilizadas em solução de etanol 10%. Nele não se observa nenhuma mudança em relação ao eletrodo em solução sem etanol e também não há sensibilidade a variação da concentração de etanol. Se comparado com o eletrodo sem as enzimas immobilizadas, observa-se uma brusca variação do perfil da

curva e o desaparecimento dos picos anódicos, o que impossibilita o cálculo da concentração de etanol.

Grafite peroxidado foi utilizado para o preparo de novos eletrodos com e sem a adição das enzimas HRP e AOD. Testes de voltametria cíclica adicionando solução de etanol 10% (v/v) diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 permitiram obter os voltamogramas apresentados nas figuras 4.21, 4.22 e 4.23.

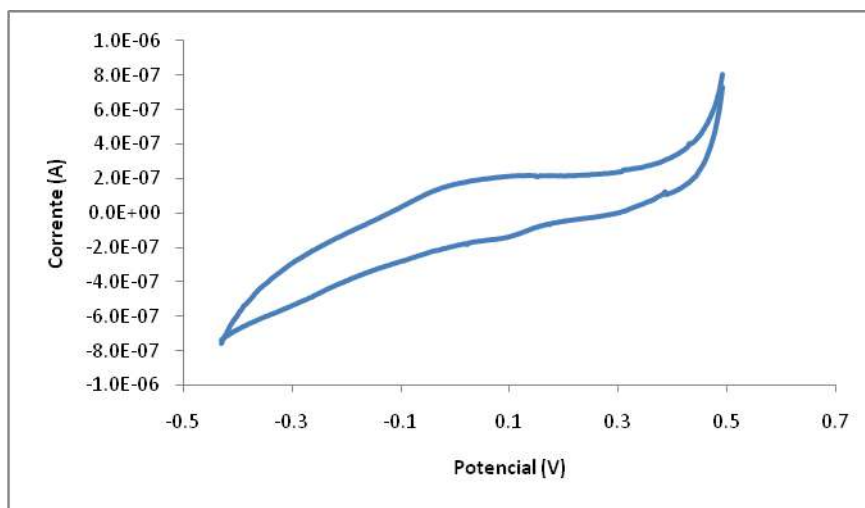


Figura 4.21: Voltametria cíclica do eletrodo sem HRP e AOD immobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$.

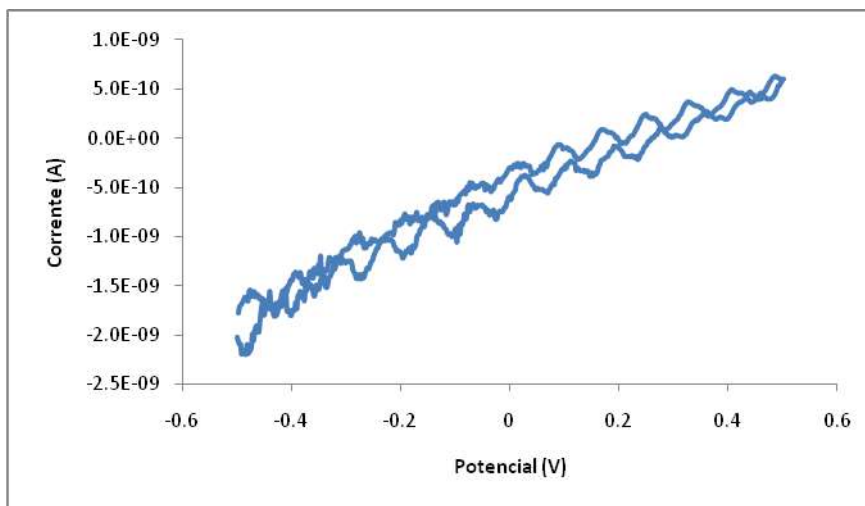


Figura 4.22: Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD immobilizadas, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$.

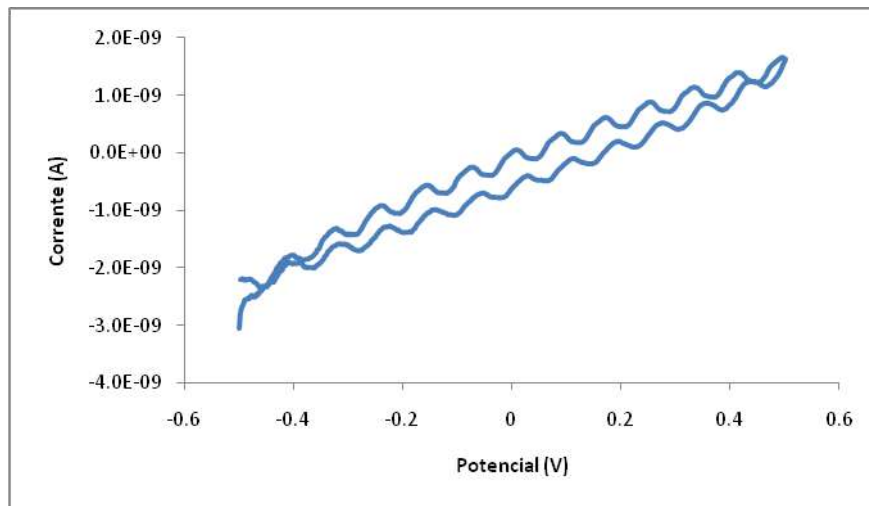


Figura 4.23: Voltametria cíclica do eletrodo com HRP e AOD imobilizadas e glutaraldeído, em solução de etanol 10% diluído em solução tampão fosfato pH 7,0 e $V = 40\text{mV/s}$.

Os resultados do eletrodo com grafite peroxidado sem as enzimas imobilizadas e em solução de etanol mostram uma melhora em relação ao mesmo eletrodo em solução tampão, pois o voltamograma apresenta um pequeno pico anódico e um ligeiro pico catódico. Estes últimos resultados dos eletrodos com as enzimas imobilizadas não diferem dos obtidos para o eletrodo com grafite não peroxidado.

Capítulo V – Conclusões e Sugestões

Levando-se em consideração que um biossensor de etanol envolve não somente o eletrodo, mas também um sistema de aquisição de sinais, um primeiro passo foi dado no presente trabalho no sentido de se projetar a plataforma do monitoramento do sinal proveniente da reação bioquímica na interface do transdutor.

Os testes preliminares de ângulo de contato, microscopia eletrônica de varredura e condutividade elétrica mostraram que o composto que obteve os melhores resultados foi o com 30% de grafite e 70% de polianilina e que a polianilina da SIGMA apresenta maior condutividade elétrica que a da PANIPOL.

Os primeiros testes usando a voltametria cíclica indicaram que o melhor agente aglutinante é o epóxi e que a polianilina da SIGMA tem uma resposta melhor do que a polianilina da PANIPOL como os resultados da condutividade elétrica já haviam indicado e também que a velocidade de varredura ótima é de 40mV/s, mostrando picos de redução e oxidação de 0,18V e 0,30V, respectivamente, indicando que o sistema possui um comportamento quase reversível e que a etapa limitante deste processo é a difusão do eletrólito até a superfície do eletrodo. O estudo das condições ótimas de trabalho indicou os melhores parâmetros de utilização em pH 7,0 e potencial -0,50 V (vs. ECS). Uma característica interessante observada foi o fato de haver uma queda.

Além disso, os resultados do cálculo das intensidades de corrente mostraram que a configuração do eletrodo montado até aqui obteve o resultado esperado.

Os voltamogramas dos eletrodos com uma ou as duas enzimas imobilizadas mostraram que nenhum dos métodos de imobilização foi eficiente para as condições de temperatura e pH ensaiados. Mas também mostrou que, quando apenas a HRP era imobilizada, o biossensor é sensível a variação da concentração de peróxido de hidrogênio. O mesmo aconteceu em relação à concentração de etanol quando as duas enzimas eram imobilizadas na matriz com grafite sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.

Para trabalhos futuros sugere-se testar mais condições operacionais de temperatura e pH e de metodologias para a inclusão das enzimas no sistema, de forma que através da resposta voltamétrica seja possível montar uma curva de calibração e assim medir a concentração de etanol.

Espera-se que a presente dissertação tenha despertado a importância dos biossensores como dispositivo de detecção de analito de interesse industrial e ambiental propondo medidas simples de análise. Contudo, muitas questões ainda devem ser elucidadas acerca do que foi exposto, sem que nos reste mais tempo e lugar aqui para elas. Mas o conhecimento se faz pela constante busca da verdade, servindo de consolo aos que iniciam a jornada, e de alerta, aos que pensam obtê-la. Assim, apresentamos algumas sugestões para futuros “desbravamentos”:

- Estudar o controle da imobilização de enzimas específicas para a detecção de etanol, pois a escolha da técnica de imobilização, bem como, do suporte a ser utilizado é de extrema importância para o bom desempenho do biossensor.
- Efetuar uma estatística mais significativa da resposta do biossensor (incluindo testes com amostras reais).
- Projetos de biossensores eletroquímicos para análise em tempo real com a utilização do PANI/Grafite, visto ser este potencialmente condutores e de economicamente atrativos.
- Pesquisar os mecanismos de transporte de cargas nos compósitos de polianilina a fim de melhorar a sensibilidade eletroquímica.

Esperamos que a solução de cada uma dessas questões venha representar uma ação concreta para a solução dos problemas de monitoramento em tempo real, os quais devem sempre nortear o fazer científico para a promoção do bem estar comum.

Capítulo VI - Bibliografia

ALEIXO, M. L. *Apostila Voltametria: Conceitos e técnicas*. Universidade Estadual de Campinas, 2010.

ALHADEFF, E.M. *Projeto e aplicação de sistemas de biossensores integrados para detecção de etanol*. Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BOJORGE, N. *Sistema de Imunossensor Eletroquímico visando o aproveitamento biotecnológico* - Relatório técnico CNPq, 2006.

BOJORGE, R. N.; SALGADO A.M.; VALDMAN B. Amperometric immunosensor for detecting *Schistosoma mansoni* antibody, *ASSAY and Drug Development Technologies*, v.5, p.673-682, 2007.

BOJORGE, R. N.; SALGADO, A.M.; VALDMAN, B.; The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: Problems and perspectives, *V.26, N°02*, p. 227 – 249, 2009.

BRUNO, L. et al; Imobilização de proteínas do veneno do escorpião *Tyrtius Serrulatus* em blenda condutora de polianilina-poli(metacrilato de hidroxietila). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v.14, n° 3, p.156-161, 2004.

D'SOUSA, S. F.; *Biosensors. Bioelectronics*, v.16, p.337, 2001.

EGGINS, R. B.; *Chemical Sensors and Biosensors*. Capítulo 2. Wiley.

FILHO, F. O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. *Química Nova*, v.15, p.28-39, 1992.

FURTADO, R. F.; DUTRA, R. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA M. G. R.; GUEDES M. F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008.

GAIKWAD, P. D. Immobilization of GOD on electrochemically synthesized PANI film by cross-linking via glutaraldehyde for determination of glucose. *Int. J. Electrochem. Sci.*, v.1, p.425-434, 2006.

GIROTTI, M. E.; SANTOS, A. I.; Medidas de resistividade elétrica dc em sólidos: Como efetuá-las corretamente. *Química Nova*, São Paulo, v.25, n°4, 2002. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01000422002000400019&lng=en&nrm=iso. Acessado em 15-06-10. doi: 10.1590/S0100-40422002000400019.

LEI, Y.; CHENB, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, v.568, p. 200–210, 2006.

MAGALHÃES, G. S. L. *Síntese e caracterização de polianilina para construção de biossensor eletroquímico*. Projeto final de curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potencial applications of electrochemical biosensors. *Analytical Sciences*, v.20, p.1113-1126, 2004.

MENDES, J. P. B. G.; *Avaliação de biossensor enzimático na análise de compostos fenólicos*. Projeto final de curso. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. F. *Biosensors for monitoring glucose, in sensors in medicine and health care: Sensors applications*, Volume 3 (eds P. Å. Öberg, T. Togawa and F. A. Spelman), Wiley-VCH Verlag, 2004.

NOSSOL, E.; *Novos eletrodos construídos a partir de diferentes nanoestruturas de carbono*. Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

PATEL, N.G. Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases. *Sensors And Actuators B*, v.75, p.101-110, 2001.

POHANKA, M.; SKLÁDAL, P. Electrochemical biosensors: principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, v.6, p.57-64, 2008

SERRA, B.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M.; Composite multienzyme amperometric biosensors for na improved detection of phenolic compounds. *Electroanalysis*, v.15, nº22, p.1737-1744, 2003.

SILVA, S. J. *Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: Estudos preliminares*. Tese de mestrado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

THEVENOT, D.R. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, v.71, p.2333-2348, 1999.

Ukr Biokhim Zh, Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells, *PubMed*, v.66, p.78-82, 1994.

VIEIRA, N. S. Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para detecção de hepatopatias. Tese de Mestrado. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

WANG, J.; *Analytical Electrochemistry*. Capitulo 2.2 ed. Wiley – VCH.

WEI, D.; IVASKA, A.; Electrochemical biosensors based on polyaniline. *Chem. Anal.*, v.51, p.839-852, 2006.

<http://www.ramehart.com/goniometers/contactangle.htm> acessado em 12-02-2010.