

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais
PPGEM

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS AMPEROMÉTRICOS
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE POLIPIRROL***

Marcele Arais Hocevar

Dissertação para obtenção do título
MESTRE EM ENGENHARIA

Porto Alegre
2011

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de
Materiais
PPGEM

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS AMPEROMÉTRICOS
UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS DE POLIPIRROL***

Marcele Arais Hocevar
Engenheira Química

Trabalho realizado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGEM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre
2011

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Engenharia, área de concentração de Ciência e Tecnologia dos Materiais e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e pela Banca Examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Banca Examinadora:

Dr^a. Bianca Bairros Rabello da Silva (UFRGS)

Dr. Alexandre Mello (FK Biotecnologia)

Prof. Dr. Fernando Thomé Kreutz (FK Biotecnologia)

Prof. Dr. Telmo R. Strohaecker
Coordenador do PPGEM

“Vencer a si próprio é a maior das vitórias.”

Platão

AGRADECIMENTOS

*A minha família, por estar sempre ao meu
lado me incentivando.*

Agradecimentos

As pessoas a agradecer são muitas, a todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento.

Primeiro o agradecimento especial a minha família que sempre esteve me apoiando e me incentivando a percorrer essa trajetória. Ao meu pai que sempre tentou entender do que eu estava falando para me mandar energias positivas e fazer com que meu crescimento fosse o maior possível. A minhas irmãs e cunhados que sempre estavam torcendo para que meus “experimentos” dessem certo. A minha mãe que tenho certeza que estaria muito orgulhosa neste momento e que é minha luz. Ao meu namorado Bolivar por toda a paciência despendida, por tentar entender e opinar nas minhas longas explicações e acima de tudo por estar sempre disponível para o que desse e viesse.

Ao professor Carlos pela acolhida como sua orientanda, amizade, a sua dedicação para orientação, explicação e discussão de dúvidas, indagações e problemas a resolver e a sua busca pelo meu crescimento e idealização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL) da Escola de Engenharia da UFRGS, sobretudo aos colegas Cristiane, Eliane, Larissa, José Manoel e Rafael, pelo apoio e grande amizade. À colega Franciélli Müller pela colaboração paciência e amizade e principalmente a grande amiga e colega Betina Hansen por todos os momentos passados juntos, as risadas, as indignações, as nossas “grandes” idéias e pela amizade construída nesses anos.

Ao professor Álvaro Meneguzzi pelas explicações e paciência nos ensaios de voltametria cíclica. Aos funcionários da empresa FK Biotecnologia, em especial ao Alexandre Melo e Márcia Polese, pelo auxílio em nossas atividades desenvolvidas.

À UFRGS, PPGEM, CNPq e FK Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro.

Trabalhos Publicados

- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Nanocomposites of polyaniline produced with different concentrations of poly(styrene sulfonic). ISNaPOL, Gramado, setembro 2010 (Trabalho completo)
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Synthesis and characterization of polyacid doped polyaniline composites. ISNaPOL, Gramado, setembro 2010 (Trabalho completo).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Polianilina convencional ou polianilina nanoestruturada para produção de biossensores para detecção de peróxido de hidrogênio. CBECiMat, Campos do Jordão, novembro 2010 (Trabalho completo).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Influência da concentração de poliestireno sulfonado na formação de compósitos com nanofibras de polianilina. CBECiMat, Campos do Jordão, novembro 2010 (Trabalho completo).

Trabalhos Aceitos

- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. A influência de nanoestruturas de polianilina e polipirrol na imobilização de HRPO. CBPol, Campos do Jordão, outubro 2011 (Trabalho completo).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Estudos eletroquímicos da polianilina e polianilina dopada com poliestireno sulfonado. CBPol, Campos do Jordão, outubro 2011 (Trabalho completo).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Estudo do uso de polipirrol como agente de imobilização para enzima horseradish peroxidase. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).
- Marcele Arais Hocevar, Betina Hansen, Carlos Arthur Ferreira. Imobilização de enzima horseradish peroxidase em polipirrol e na presença de um poliânion. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Estudo da imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).
- Betina Hansen, Marcele Arais Hocevar, Carlos Arthur Ferreira. Caracterização colorimétrica e amperométrica da horseradish peroxidase imobilizada em polianilina. SAP, Bahía Blanca, novembro 2011 (Trabalho completo).

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1	<i>Polímeros Intrinsecamente Condutores</i>	4
3.1.1	Histórico.....	6
3.1.2	Mecanismo de Condução	7
3.1.3	Síntese de Polímeros Condutores.....	11
3.2	<i>Polipirrol</i>	13
3.2.1	Síntese do Polipirrol	16
3.2.2	Nanoestruturas de Polipirrol	17
3.2.3	Aplicações do Polipirrol	18
3.2.4	Polipirrol e Poliestireno Sulfonado.....	19
3.3	<i>Enzimas</i>	21
3.3.1	Nomenclatura e Classificação das Enzimas.....	22
3.3.2	Atividade Enzimática e Mecanismo de Ação.....	23
3.3.3	Especificidade Enzimática.....	26
3.3.4	Peroxidase.....	27
3.3.5	Imobilização Enzimática	30
3.3.5.1	Adsorção	31
3.3.5.2	Ligações Covalentes	32
3.3.5.3	Confinamento (Entrapment)	32
3.3.5.4	Ligações Covalentes Cruzadas	33
3.4	<i>Biossensores</i>	33
3.4.1	Transdutores	36

3.4.1.1	Biossensores Amperométricos	37
3.4.1.2	Biossensores Potenciométricos.....	39
3.4.1.3	Outros tipos de Biossensores.....	39
3.4.2	Biossensores e Polímeros Condutores	40
3.4.3	Biossensores produzidos por <i>Silk-Screen</i> : Tiras de Teste Rápido	41
4	EXPERIMENTAL.....	44
4.1	<i>Materiais</i>	44
4.2	<i>Síntese do Polipirrol</i>	45
4.3	<i>Caracterização do Polipirrol</i>	45
4.3.1	Morfologia.....	46
4.3.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	46
4.3.2	Condutividade Elétrica.....	46
4.3.3	Espectroscopia de Infravermelho	48
4.3.4	Voltametria Cíclica.....	48
4.4	<i>Preparação do Biossensor e Confecção das Tiras de Teste Rápido</i>	49
4.5	<i>Caracterização das Tiras de Teste Rápido</i>	50
4.5.1	Morfologia.....	51
4.5.1.1	Microscopia Óptica	51
4.5.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.5.2	Voltametria Cíclica.....	51
4.6	<i>Imobilização da Enzima e Aplicação nas Tiras de Teste Rápido</i>	52
4.6.1	Estudo da Concentração Mínima de Enzima na Tira	53
4.6.2	Estudo da Imobilização da HRP	54
4.6.3	Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio.....	54
4.6.4	Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57

5.1	<i>Polipirrol e Polipirrol dopado com Poliestireno Sulfonado</i>	57
5.2	<i>Caracterização dos Polímeros Condutores</i>	58
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	58
5.2.2	Condutividade Elétrica.....	60
5.2.3	Espectroscopia de Infravermelho	61
5.2.4	Voltametria Cíclica.....	64
5.3	<i>Tiras de Teste Rápido</i>	66
5.4	<i>Caracterização das Tiras de Teste Rápido</i>	66
5.4.1	Morfologia.....	67
5.4.1.1	Microscopia Óptica	67
5.4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	68
5.4.2	Voltametria Cíclica.....	70
5.5	<i>Imobilização da Enzima e Aplicação nas Tiras de Teste Rápido</i>	71
5.5.1	Estudo da Concentração Mínima de Enzima na Tira	71
5.5.2	Estudo da Imobilização da HRP	74
5.5.3	Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio.....	77
5.5.4	Sensibilidade da HRP frente ao H ₂ O ₂	80
6	CONCLUSÕES	85
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Índice de Figuras

Figura 1: Comparação da condutividade de PIC's com alguns materiais.	5
Figura 2: Aplicações de polímeros condutores em função das suas propriedades.....	6
Figura 3: Representação do diagrama de bandas: (a) espaçamento entre bandas é o <i>band gap</i> , (b) metais, (c) isolantes, (d) semicondutores	8
Figura 4: Representação dos sólitons do poliacetileno: (a) positivo, (b) neutro e (c) negativo.....	9
Figura 5: Representação esquemática do transporte macroscópico de carga, onde: (AB) = condução intracadeias, (BC) = condução intercadeias e (CD) = condução interfibras	10
Figura 6: Estrutura química neutra e condutividade elétrica dos principais PIC's.	13
Figura 7: Polipirrol na forma neutra	14
Figura 8: Mecanismo de polimerização do pirrol: (a) oxidação do monômero, (b) acoplamento radical-radical e (c) propagação da cadeia.....	14
Figura 9: Estruturas para o polipirrol e no detalhe os níveis eletrônicos calculados para o aumento de dopagem: a) polímero neutro, forma aromática, b) <i>polaron</i> e c) <i>bipolaron</i> , forma quinóide com os orbitais bipolarônicos e a forma das bandas bipolarônicas	15
Figura 10: Forma isolante e condutora do polipirrol	16
Figura 11: Representação da cadeia polimérica do NaPSS	20
Figura 12: Mecanismo da pseudo-dopagem do tipo n do PPI.....	21
Figura 13: Energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática, onde: ΔG - energia livre de Gibbs, S - substrato e P – produto	24
Figura 14: Curva de saturação numa reação enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato e a velocidade	25
Figura 15: Inibição competitiva, inibidor I liga-se à enzima E pelo sítio ativo A, não permitindo ao substrato ter acesso e não produzindo produtos.....	26

Figura 16: Modelo chave fechadura proposto por Fischer, onde E é a enzima, S o substrato e A o sítio ativo	27
Figura 17: Modelo encaixe induzido proposto por Koshland.....	27
Figura 18: Representação tridimensional da estrutura da HRP. Apresenta o grupo prostético heme em vermelho localizado entre os domínios distal e proximal, cada um com um íon Ca^{2+} em azul. As regiões de α -hélice e folha β da enzima são mostradas em violeta e amarelo respectivamente	28
Figura 19: Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (agente oxidante). As constantes de velocidade k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do Composto I, a taxa de redução do Composto I e a taxa de redução do Composto II, respectivamente.....	29
Figura 20: Mecanismos de Imobilização de Enzimas.....	31
Figura 21: Adsorção da enzima sobre matriz imobilizadora, com orientação randômica	31
Figura 22: Ligação Covalente da enzima na matriz, percebe-se que a enzima nem sempre se liga com o sítio ativo disponível	32
Figura 23: <i>Entrapment</i> , enzima confinada entre as malhas de um polímero	33
Figura 24: Ligação covalente cruzada entre polímero e enzima.....	33
Figura 25: Esquema geral de funcionamento de um biossensor.....	35
Figura 26: Esquema representando a transferência de elétrons em biossensor amperométrico	37
Figura 27: Representação esquemática para biossensor amperométrico segundo o processo de transferência de cargas. a) 1ª geração; b) 2ª geração; c) 3ª geração	38
Figura 28: a) Esquema de sensor para ser impresso em tela de <i>silk-screen</i> ; b) Modelo de sensor comercial	43
Figura 29: Modelo de medida de condutividade em pastilha cilíndrica.	47
Figura 30: Gráficos apresentando exemplo de potencial aplicado pela técnica de voltametria cíclica e a resposta de corrente obtida	49

Figura 31: Tela de serigrafia utilizada para produção das tiras com tinta de carbono. a) Tela inteira, b) Detalhe do desenho dos 12 eletrodos na tela.....	50
Figura 32: Aparato montado para realização de voltametria cíclica nas tiras.	52
Figura 33: Amostras PPI, PPI + PSS 1%, PPI + PSS 10% e PPI + PSS 20%, a) Polímeros em solução após a síntese; b) Polímeros em solução após lavagem e dispersão para correção do pH para 5.....	57
Figura 34: Imagens obtidas por MET para: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.....	59
Figura 35: Espectroscopia de Infravermelho para PSS, PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em pH 1.....	62
Figura 36: Espectroscopia de Infravermelho para PSS, PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20 % em pH 5.....	63
Figura 37: Voltamogramas cíclicos do PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em KCl 1 M com a) pH 1 e b) pH 5.....	65
Figura 38: Voltamogramas cíclicos do PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em PBS com a) pH 1 e b) pH 5.....	65
Figura 39: Tiras para teste rápido: a) produzida estando apenas com eletrodos pintados; b) produzida estando com eletrodo de referência pintado e c) tira comercial.....	66
Figura 40: Superfície de carbono das tiras de teste rápido: a) produzida e b) comercial.....	67
Figura 41: Imagens da película polimérica no sensor produzido: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.....	68
Figura 42: Imagens obtidas por MEV para superfície polimérica da tira produzida: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.	69
Figura 43: Voltamogramas cíclicos para sensores: produzido e comercial em a) KCl e b) PBS.....	70
Figura 44: Voltamogramas cíclicos para as tiras com filme de PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% com pH= 5 em a) KCl e b) PBS.	71

Figura 45: Medida de absorvância determinando a atividade da enzima imobilizada nas tiras.....	72
Figura 46: Medida de absorvância para HRP livre após diluição de 10 vezes.....	73
Figura 47: Curvas de absorvância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI, com e sem lavagem.....	75
Figura 48: Curvas de absorvância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI + PSS 1%, com e sem lavagem.....	75
Figura 49: Curvas de absorvância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI + PSS 20%, com e sem lavagem.....	76
Figura 50: Curva de absorvância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI, para as várias concentrações de H ₂ O ₂	78
Figura 51: Leituras de absorvância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI + PSS 1%, para as várias concentrações de H ₂ O ₂	79
Figura 52: Curvas de absorvância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI + PSS 20%, para as várias concentrações de H ₂ O ₂	79
Figura 53: Efeito da adição de H ₂ O ₂ em célula eletroquímica tendo como eletrodos a tira de teste rápido.	81
Figura 54: Representação de uma perturbação degrau para estimar o tempo de resposta da tira de teste rápido.....	82
Figura 55: Relação entre a concentração de H ₂ O ₂ aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.....	83

Índice de Tabelas

Tabela 1: Comparação da polimerização química e eletroquímica de polímeros condutores	12
Tabela 2: Aplicações biológicas para Polipirrol	19
Tabela 3: Classificação internacional das enzimas	23
Tabela 4: Classe de biossensores quanto a sua sensibilidade	36
Tabela 5: Nomenclatura das amostras obtidas.	57
Tabela 6: Medidas de Condutividade para as amostras poliméricas	61

Lista de abreviaturas e símbolos

A	Sítio ativo
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
CE	Contra eletrodo
E	Enzima
E_a	Energia de ativação
ECS	Eletrodo de referência de Calomelano Saturado
E_i	Potencial inicial
E_{max}	Potencial máximo
ER	Eletrodo de referência
ES	Complexo enzima-substrato
ET	Eletrodo de trabalho
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
HRP	Horseradish peroxidase
i	Corrente (A)
I	Inibidor
K_m	Constante de Michaelis-Mentem = $(k_2+k_3)/k_1$
ME	Microscopia eletrônica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	Microscopia óptica
NaPSS	Poliestireno sulfonado de sódio
P	Produto
PAni	Polianilina
PBS	Tampão fosfato salino
PCs	Polímeros condutores
PEDOT	Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)
PET	Polietilenotereftalato
PIC's	Polímeros intrinsecamente condutores
PPi	Polipirrol
PSA	Persulfato de Amônia
PSS	Poliestireno sulfonado

PT	Politiofeno
Pt	Platina
PVC	Policloreto de vinila
PVS	Polivinilsulfonado
R^2	Fator de correção
S	Substrato
s	Distância (cm)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
U	Atividade enzimática
UI	Unidades internacionais
V	Voltagem (V)
v	Velocidade de varredura (mV/s)
V_{max}	Velocidade máxima atingida
V_O	Velocidade inicial de reação
w	Espessura (cm)
ΔG	Energia livre de Gibbs
ρ	Resistividade
σ	Condutividade elétrica

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a produção de tiras de teste rápido para detecção de peróxido de hidrogênio, utilizando polipirrol (PPI) ou polipirrol dopado com poliestireno sulfonado (PSS) na forma de nanoestruturas como transdutor. Os polímeros condutores foram sintetizados através de síntese química visando a obtenção de nanopartículas, as quais favorecem no aumento da área superficial de detecção. As nanopartículas foram verificadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), os valores de condutividade elétrica dos polímeros foram obtidos pelo método de quatro pontas e a eletroatividade foi verificada com voltametria cíclica. Provou-se, através de espectroscopia de infravermelho, que o PSS dopou o PPI. As tiras de teste rápido foram produzidas pela técnica de *silk-screen* com pasta de carbono nas trilhas dos eletrodos e pasta de Ag/AgCl como eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho recebeu o polímero com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) imobilizada em sua matriz. A tira foi testada quanto à cobertura do polímero sobre o eletrodo de trabalho através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Sua eletroatividade foi testada em eletrólitos com pH perto do neutro, os quais se assemelham ao meio onde se encontra o substrato. A HRP foi imobilizada no polímero condutor em cinco diferentes concentrações as quais foram aplicadas nas tiras para obtenção do valor mínimo de enzima a ser imobilizada. Estimou-se, através de lavagens com soluções de severidade de remoção diferentes, que a imobilização ocorreu por adsorção da enzima no polímero formando ligações fracas entre estes. Testou-se ainda a sensibilidade de detecção de H_2O_2 na tira produzida, obtendo-se a equação característica, que determina a corrente elétrica em função da concentração de substrato utilizado.

Abstract

This study aimed to the production of test strips for hydrogen peroxide fast detection using nanostructures of polypyrrole (PPI) or polypyrrole doped with polystyrene sulfonate (PSS) as a transducer. Conducting polymers have been synthesized by chemical synthesis in order to obtain nanoparticles, which increase the surface area of detection. The nanoparticles were observed by transmission electron microscopy (TEM), the electrical conductivity of the polymers were measured through the four-probe method and electroactivity was observed with cyclic voltammetry. It was verified through infrared spectroscopy that the PSS actually doped the PPI. The test strips were produced by silk-screen technique using carbon paste tracks as electrodes and Ag / AgCl paste as reference electrode. The working electrode received the polymer with the enzyme horseradish peroxidase (HRP) immobilized in its matrix. The strip was tested for the coverage of polymer on the working electrode by optic microscopy and scanning electron microscopy. The electroactivity was tested in electrolytes with pH close to neutral, which resemble the middle of the substrate. Five different concentrations of HRP were immobilized in the conducting polymers and applied in the strips in order to determine the minimum amount of enzyme to be immobilized. It was estimated by washing the strips with different removal solutions, that the enzyme immobilization occurred through adsorption to the polymer matrix, forming weak bonds. It was also tested the sensitivity of detection of H_2O_2 in the produced strips, resulting in the characteristic equation, which determines the electrical current as a function of the substrate concentration used.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente há uma preocupação cada vez maior com a saúde e interesse em monitorá-la de maneira rápida e eficiente. Pensando nisto, as indústrias farmacêuticas têm o interesse em desenvolver dispositivos capazes de realizar testes rápidos, quando o indivíduo consegue em minutos receber a resposta sobre a análise que poderia demorar dias em um laboratório clínico. Desta forma, as pesquisas relacionadas com o desenvolvimento de testes rápidos cresceram nestes últimos anos, e vem atraindo a atenção de uma grande parcela de pesquisadores, através de parcerias de universidades com indústrias farmacêuticas.

As tiras de teste rápido de glicose são dispositivos que possibilitam o controle diário do diabetes através de uma gota de sangue sobre a tira. Assim, determina-se o nível de glicose no sangue através de um equipamento portátil que realiza a leitura e pode-se decidir que atitude tomar caso esta leitura esteja em valores preocupantes. Outro exemplo são os testes rápidos de gravidez que através da urina permitem obter uma resposta positiva ou negativa.

Estes dispositivos representam uma ferramenta promissora na detecção e monitoramento de doenças. Podem ser destacadas como vantagens as suas características únicas como: seletividade, baixo custo relativo de construção e estocagem, potencial para miniaturização e obtenção de respostas através de equipamentos simples e portáteis, entretanto não devem ser consideradas como a única forma de detecção de doenças, mas sim como uma complementação aos exames já existentes.

As tiras de teste rápido ou biossensores, são dispositivos que combinam biomoléculas imobilizadas intencionalmente com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície capaz de fazer a medição direta de um substrato específico. Na maioria das vezes essas biomoléculas são enzimas, que catalisam a reação de transformação de um substrato em um produto, sendo específicas para cada tipo de substrato. O transdutor converte o sinal biológico obtido na transformação, em um sinal elétrico, e pode ser de inúmeros materiais, entre os quais se destacam os polímeros condutores. Estes têm atraído considerável interesse para atuarem como matriz, devido a sua condutividade elétrica, quando no

estado dopado e por serem biologicamente inócuos, além da facilidade de obtenção de nanoestruturas, responsáveis pelo aumento da superfície de contato e conseqüentemente da resposta elétrica.

A imobilização da enzima no transdutor ou matriz é uma etapa essencial na construção de um biossensor, pois com ela as enzimas permanecem por mais tempo estáveis, sofrem uma menor interferência de compostos indesejáveis e podem ser utilizadas um maior número de vezes, o que diminui o seu custo. Desta forma a escolha da técnica de imobilização bem como da matriz a ser utilizada é de extrema importância para o bom desempenho do dispositivo.

A possibilidade de fabricar tiras para teste rápido através da criação de uma metodologia a qual utiliza nanoestruturas de polímeros condutores como transdutor associados a enzimas, pode se tornar uma alternativa para substituir os biossensores existentes no mercado, que na sua maioria são importados, obtendo um custo mais baixo e sendo acessível à população em geral.

Neste sentido, esta dissertação buscou estudar os passos relevantes para o desenvolvimento de uma metodologia para a produção de biossensores enzimáticos. Desta maneira, a dissertação está dividida em capítulos, onde o primeiro capítulo aborda os pressupostos teóricos do estudo, apresentando conceitos referentes a polímeros condutores (com especial atenção ao polipirrol e ao polipirrol dopado com poliestireno sulfonado e a obtenção de nanoestruturas destes), a enzimas (estando a atenção focada na *horseradish peroxidase* e suas formas de imobilização) e biossensores (com ênfase nos biossensores amperométricos e produzidos pelo método de *silk-screen*). O capítulo seguinte aborda os procedimentos experimentais, onde serão apresentados os materiais utilizados e a metodologia empregada ao longo da realização do trabalho, sendo também especificados os equipamentos utilizados na caracterização dos polímeros e do biossensor. Na seqüência serão apresentados os resultados, as conclusões gerais destes e sugestões para trabalhos futuros.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolvimento de um biossensor enzimático amperométrico na forma de tira de teste rápido. Para tanto, tem-se como objetivo específico, desenvolver uma metodologia para a imobilização da enzima *horseradish peroxidase* (HRP) em nanoestruturas de polímero condutor, no caso polipirrol e polipirrol dopado com poliestireno sulfonado para servir de transdutor em um biossensor, além da construção de uma tira de teste rápido pelo método de *silk-screen* no formato de biossensor para aplicação da enzima imobilizada no polímero, e posterior detecção de peróxido de hidrogênio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica busca apresentar os elementos responsáveis pelo direcionamento da pesquisa. Ela aborda conceitos, definições, classificações e tipos de polímeros condutores, enzimas e biossensores. Estão ainda descritos mecanismos de síntese de polímeros condutores e técnicas de imobilização de enzimas.

3.1 *Polímeros Intrinsecamente Condutores*

Os polímeros têm como característica a repetição múltipla de uma ou mais espécies de átomos ou grupo de átomos em sua cadeia polimérica, esses são conhecidos como monômeros ou unidades constitucionais. A repetição destes grupos funcionais pode atingir grandes valores gerando macromoléculas, as quais produzem características próprias muito mais dominantes que as características da natureza química dos átomos que as constituem, produzindo materiais com propriedades específicas para usos diversos [1,2].

O primeiro uso dos polímeros evidencia sua utilização como excelentes isolantes elétricos tanto para altas correntes ou voltagens. Porém nos últimos anos uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir corrente elétrica. Esta nova classe de polímeros foi chamada de polímeros intrinsecamente condutores (PIC's) [1].

Os polímeros intrinsecamente condutores conduzem corrente elétrica sem a incorporação de cargas condutoras, desta forma podem combinar as propriedades mecânicas e processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, óptico e magnético que se assemelha ao dos metais e semicondutores (Figura 1). Assim podem ser chamados de “metais sintéticos”, devido as suas propriedades elétricas, magnéticas e ópticas [3,4]. Os PIC's mais conhecidos são o poliacetileno, polianilina, polipirrol, politiofeno, poli(p-fenileno), entre outros.

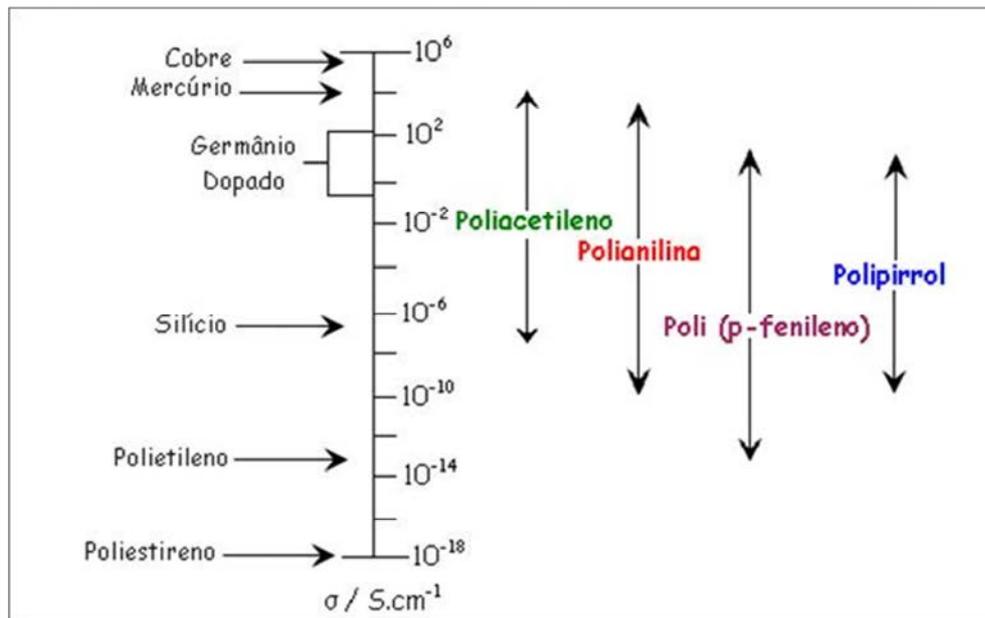


Figura 1: Comparação da condutividade de PIC's com alguns materiais [5].

As cadeias dos PIC's contêm anéis aromáticos ou cadeias lineares contendo duplas ligações C=C conjugadas, compostas por uma ligação *sigma* (σ), ligação forte, e uma ligação *pi* (π), menos localizada e fraca. Essa ligação dupla deve ser perturbada, pela remoção ou adição de elétrons o que permite um fluxo destes, formando íons. A oxidação/redução da cadeia polimérica ocorre por agentes de transferência de carga (dopantes) os quais convertem o polímero de isolante em condutor [3,6].

Os polímeros condutores têm inúmeras aplicações tecnológicas (Figura 2), as quais se baseiam na condutividade do polímero condutor puro ou de uma blenda do polímero condutor com um polímero convencional; nas propriedades eletroquímicas de oxi-redução; na formação de estados excitados no polímero e na morfologia/microestrutura do polímero [5,7,8].

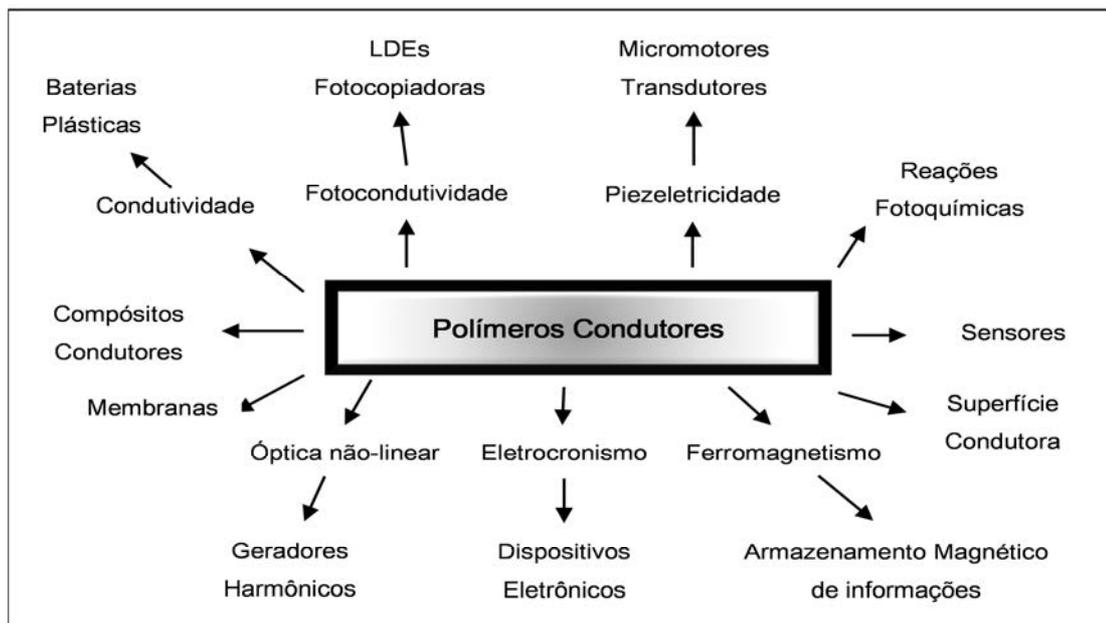


Figura 2: Aplicações de polímeros condutores em função das suas propriedades [5].

3.1.1 Histórico

Durante muitos anos os polímeros foram considerados uma classe de materiais intrinsecamente isolante, pois se acreditava que devido as suas ligações covalentes fortes não ocorria a movimentação dos portadores de carga elétrica, não havendo mobilidade para a condução de eletricidade. No entanto, em 1964, Willian Little propôs que certos compostos orgânicos cujos elétrons π obedecessem a uma distribuição especial poderiam ser condutores [9].

Os polímeros condutores iniciaram a sua trajetória em 1977, quando Alan MacDiarmid, Hideki Shirakawa e Alan Heeger conseguiram tornar o poliacetileno isolante em um condutor elétrico intrínseco pela exposição do polímero a agentes dopantes, oxidantes ou redutores, neste caso o iodo. Além disso, descobriram que a dopagem poderia ser realizada tanto por substâncias doadoras como por receptoras de elétrons, ou seja, a dopagem era reversível, com a diminuição da concentração dos agentes dopantes o polímero poderia voltar a ser isolante, desta forma se controlaria o grau de condutividade do polímero [3,4,10].

Apesar da descoberta dos polímeros condutores ter sido comprovada em 1977, o polipirrol já havia sido sintetizado eletroquimicamente em 1968, pela

formação de um precipitado sobre um eletrodo de platina em solução aquosa de ácido sulfúrico em um potencial oxidativo [11]. Já a polianilina teve sua primeira oxidação em 1862, porém apenas 100 anos após suas propriedades foram reconhecidas, sendo que despertaram grande interesse devido ao seu baixo custo, facilidade de síntese e alto rendimento. Em meados da década de 80, pesquisadores da BASF AG conseguiram para o poliacetileno condutividade semelhante à do cobre metálico a temperatura ambiente quando dopado com um novo catalisador e seu filme orientado por estiramento [3].

Nos anos seguintes, diversos outros polímeros condutores com estruturas mais complexas, estabilidade química e propriedades mecânicas superiores às do poliacetileno foram sintetizados e uma nova geração de polímeros foi descoberta abrindo o leque de aplicações destes materiais [12].

3.1.2 Mecanismo de Condução

As propriedades condutoras dos polímeros são provenientes de suas cadeias orgânicas com duplas ligações alternadas. Essa série alternada de ligações simples e duplas forma um sistema conjugado de orbitais moleculares sobrepostos, o que é fundamental para a condutividade, pois esta conjugação permite que seja criado um fluxo de elétrons em condições específicas [3,11].

A oxidação/redução da cadeia polimérica é efetuada por agentes de transferência de carga, os quais convertem o polímero de isolante em condutor ou semicondutor. As reações de oxidação ou redução da cadeia polimérica têm como consequência a formação de cargas positivas ou negativas deslocalizadas, as quais são neutralizadas pela incorporação de ânions ou cátions chamados de dopantes. Os agentes de transferência de carga, ou dopantes, são adicionados nos polímeros em concentrações de até 50% da massa total do composto, e pelo grau de dopagem os valores de condutividade do polímero podem variar de isolante até condutor [3,4,13].

A teoria do mecanismo de condução dos polímeros condutores primeiramente foi explicada pelo “modelo de bandas”, que partiu do suposto que o grupo de n estados energéticos ocupados de mais alta energia é a Banda de Valência (BV) e o

grupo de n estados energéticos desocupados de mais baixa energia é a Banda de Condução (BC), como explicado para os metais. A diferença de energia entre as duas bandas é uma região proibida chamada de *gap* que representa o espaçamento entre as BV e a BC (Figura 3). Cada material possui um espaçamento entre bandas que representa a magnitude de energia necessária para os elétrons passarem da BV para a BC. Desta forma, na Figura 3 (b) percebe-se que para os metais as BV e BC se sobrepõem já na Figura 3 (c) o espaçamento entre bandas é bem maior, necessitando de uma magnitude de energia muito maior para o transporte dos elétrons, enquanto que para os semicondutores, Figura 3 (d), esse espaço já se apresenta bem mais estreito [2].

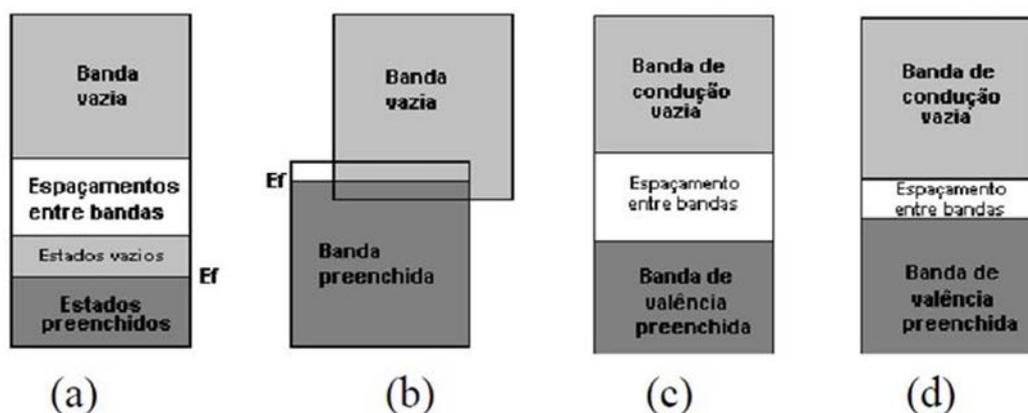


Figura 3: Representação do diagrama de bandas: (a) espaçamento entre bandas é o *band gap*, (b) metais, (c) isolantes, (d) semicondutores [2].

Como os polímeros são constituídos por cadeias finitas, estas apresentam defeitos originados durante a polimerização. Também, durante a dopagem do polímero ocorre a formação de cargas nesses defeitos as quais são contrabalanceadas por íons do dopante. A condutividade do poliacetileno é baseada na formação de defeitos nas cadeias, os quais levam a formação de radicais. A presença destes radicais, ou portadores de carga distribuídos ao longo da cadeia ocorre pela oxidação através da remoção de um elétron formando um cátion radical na banda de valência (BV). Esses cátions ao longo da cadeia polimérica, chamados de *sólitons*, provocam a distorção local do retículo pela quebra da simetria da cadeia e o surgimento de um estado eletrônico localizado no intervalo de energia proibida.

Nesta situação, o sistema apresenta portadores de cargas livres surgindo a condutividade. Durante a redução do polímero, ocorre uma adição de elétrons na banda de condução (BC) que é a banda com níveis eletrônicos vazios de mais baixa energia. Nesses processos, ocorre a formação de bandas totalmente preenchidas no estado fundamental [3,9]. Na Figura 4 podem ser observados os sólitons para o poliacetileno.

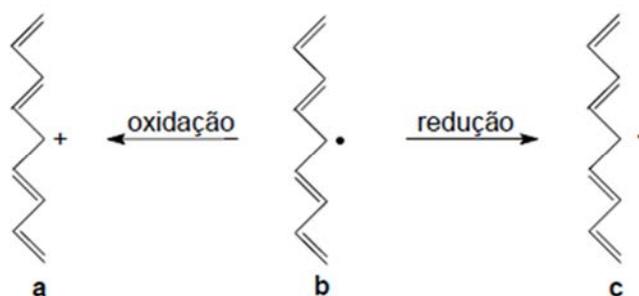


Figura 4: Representação dos sólitons do poliacetileno: (a) positivo, (b) neutro e (c) negativo [13].

Para outros polímeros como o polipirrol, a polianilina, o politiofeno, entre outros que são derivados de seus monômeros, verificou-se que a condução não pode ser explicada desta forma, pois as formas de ressonância não possuem a mesma energia. Considerando a oxidação e a remoção de um elétron da cadeia formando um cátion radical, ou *polarons*, que seriam a redistribuição de elétrons π , que polarizam a cadeia polimérica apenas localmente, produzindo uma distorção local na distribuição dos átomos de carbono, um defeito na cadeia. Assim, o *polaron* é como um íon radical (spin $\frac{1}{2}$) associado a uma distorção do retículo e a presença de um estado eletrônico localizado no *band gap*, que favorece a excitação dos elétrons da banda de valência que está cheia para a banda de condução que está vazia, não aparecendo o caráter metálico, uma vez que o nível parcialmente ocupado está localizado no *band gap* [3,13].

A remoção de um segundo elétron pode originar duas situações, ou o elétron é removido da cadeia ocasionando a criação de mais um estado *polaron* ou é removido do estado *polaron* já existente formando um *bipolaron*, que é definido como um par de cargas iguais (dicátion com spin = 0, associado a uma forte distorção do retículo). A formação do *bipolaron* é favorecida em relação à formação

de dois *polarons*, pois o ganho de energia decorrente da interação de duas cargas com o retículo é maior do que a repulsão coulômbica entre as cargas de mesmo sinal [3]. Desta forma, os *pólarons* são mais facilmente ionizados que a cadeia polimérica, e em altos graus de dopagem há formação preferencial de *bipólarons* e para baixos graus de dopagem há formação de *pólarons*.

Os mecanismos de condução da carga elétrica são diversos, os quais podem ser visualizados na Figura 5, que apresenta a condução macroscópica de cargas. Neste caso, a propagação dos portadores de carga é regida por três fatores: condução intracadeias, ou seja, transporte ao longo da cadeia do polímero, condução intercadeias, transporte entre as cadeias adjacentes e condução interfibras, salto dos portadores entre duas partículas do polímero. A condução intracadeias é determinada pela natureza e pela densidade de portadores (número de cadeia) envolvidos e, conseqüentemente, sua velocidade em uma mesma cadeia polimérica frente a campos elétricos. A condução intercadeias é limitada pela proximidade entre cadeias poliméricas adjacentes e a condução intracadeias é limitada pelo grau de acoplamento eletrônico. A condução interfibras envolve feixes de cadeias e depende da morfologia e do empacotamento das cadeias no polímero [14].

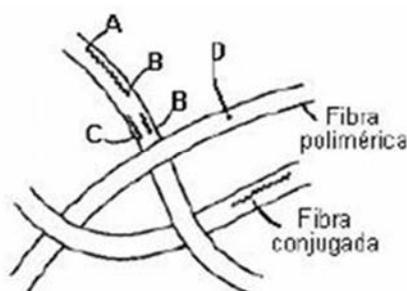


Figura 5: Representação esquemática do transporte macroscópico de carga, onde: (AB) = condução intracadeias, (BC) = condução intercadeias e (CD) = condução interfibras [15].

A maioria dos polímeros condutores conhecidos tem baixo grau de cristalinidade e, por isso, baixo grau de acoplamento eletrônico entre as cadeias poliméricas fazendo com que as suas condutividades sejam regidas basicamente pela condução intracadeias e interfibras.

3.1.3 Síntese de Polímeros Condutores

As propriedades dos polímeros condutores são fortemente dependentes de sua microestrutura e morfologia, as quais estão relacionadas à presença de defeitos, reticulações que são determinados pelo método de síntese, contra-íons, entre outros. Um dos maiores desafios para melhorar e garantir o desempenho destes materiais está na busca de polímeros com maior homogeneidade, estabilidade, baixa concentração de defeitos, maior organização entre as cadeias, reprodutibilidade e maiores valores de condutividade [5]. Muitos destes fatores são determinados pelo tipo de síntese a que o polímero é submetido.

Essa classe de polímeros pode ser sintetizada por dois diferentes métodos: química e eletroquímica. A que mais se destaca é a síntese química, devido à possibilidade de produção de grandes quantidades de polímeros em pó ou filmes grossos, sendo favorável para escala industrial, pois possui diversas rotas de síntese, sendo muitas delas muito simples para produção de uma variedade de PICs. Já a síntese eletroquímica produz filmes finos sobre a superfície de eletrodos de trabalho, os quais são muito difíceis de serem retirados. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado são fortemente dependentes das condições operacionais da síntese, como a natureza do meio eletrolítico, concentração do monômero, densidade de corrente, temperatura entre outras [3,4,11].

A síntese eletroquímica é o método mais utilizado para a obtenção de polímeros, quando a escala industrial não é almejada. O mecanismo de eletropolimerização para heterociclos forma um cátion radical no monômero, seguida do acoplamento de dois cátions radicais, com saída de dois prótons e reconstituição do sistema aromático. A estabilidade do cátion radical do monômero é o fator determinante para obtenção de um polímero com elevado grau de conjugação [5].

Quando os polímeros condutores são obtidos por síntese química, eles necessitam de um agente oxidante, o qual é introduzido no meio reacional provocando a formação do cátion radical. Para a escolha do agente oxidante, este deve possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero [5].

A Tabela 1 apresenta as vantagens e desvantagens da síntese química e eletroquímica.

Tabela 1: Comparação da polimerização química e eletroquímica de polímeros condutores [11].

Polimerização	Vantagens	Desvantagens
Química	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento na escala de produção; - Modificação das ligações covalentes da cadeia depois da síntese; - Mais opções para a modificação da cadeia do polímero condutor. 	<ul style="list-style-type: none"> - Dificuldade na produção de filmes finos; - Produto precisa ser extraído da mistura inicial monômero/oxidante/solvente.
Eletroquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Produção de filmes finos na síntese; - Facilidade de síntese; - Moléculas de polímero condutor com dopagem simultânea; - Obtenção de produto limpo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil remoção da película sobre a superfície do eletrodo; - Modificação das ligações covalentes da cadeia depois da síntese é muito difícil.

Todos os PCs podem ser sintetizados quimicamente, mas a síntese eletroquímica é limitada aos sistemas em que o monômero pode ser oxidado na presença de um potencial para formar íons radicais intermediários reativos para polimerização. Os PCs mais conhecidos como o polipirrol (PPI), politiofeno (PT), polianilina (PANI) e o PEDOT podem ser polimerizados tanto química como eletroquimicamente, no entanto, vários novos PCs com monômeros modificados são apenas passíveis de polimerização química [11]. O método de síntese dos PIC's geralmente é escolhido em função da aplicação a que o polímero se destina. Na Figura 6 podem ser visualizadas as estruturas químicas neutras dos principais polímeros condutores e seus valores de condutividade elétrica.

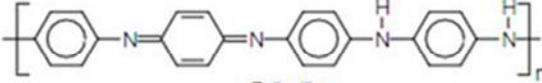
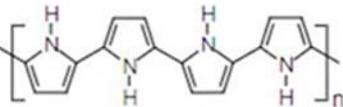
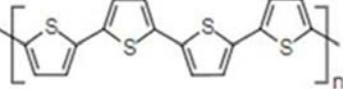
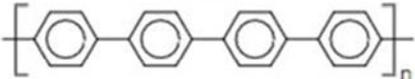
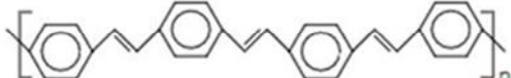
Polímero condutor	Condutividade / S cm ⁻¹
 Poliacetileno	10 ³ a 10 ⁶
 Polianilina	10 a 10 ³
 Polipirrol	600
 Politiofeno	200
 Poli(p-fenileno)	500
 Poli(p-fenileno vinileno)	1

Figura 6: Estrutura química neutra e condutividade elétrica dos principais PIC's [3].

3.2 Polipirrol

O polipirrol (PPI) está dentre os polímeros condutores mais conhecidos, sendo tema de muitos estudos, devido a sua elevada condutividade elétrica, boa estabilidade ambiental obtida pelo baixo potencial de oxidação, versatilidade de síntese, além de ser o polímero mais frequentemente utilizado em aplicações industriais, devido à longa estabilidade de sua condutividade e a possibilidade de formar homopolímeros ou compósitos com ótimas propriedades mecânicas [16]. Os polipirróis podem ser formados em solução pelo uso de um oxidante químico, na polimerização química, ou por oxidação em um substrato condutor, na polimerização eletroquímica [17]. Na Figura 7 pode ser observada a forma neutra do polipirrol.

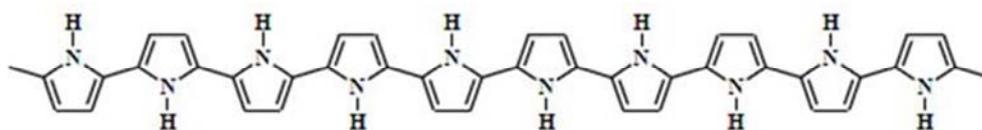


Figura 7: Polipirrol na forma neutra [16].

A polimerização do polipirrol é mostrada na Figura 8, onde se inicia através da oxidação do monômero, o que leva a formação de um intermediário cátion-radical. Na sequência há o acoplamento de dois cátions-radicais, e através de uma transferência de carga, ocorre a eliminação de dois prótons com a formação de um dímero neutro. O dímero oxida-se mais facilmente que o monômero e, assim, é imediatamente convertido a um novo cátion-radical após, sucessivamente, são formadas cadeias de oligômeros que formam o polipirrol, com acoplamentos principalmente nas posições 2 e 5 dos átomos de carbono do anel pirrólico, com a possibilidade de formação de defeitos com ligações nas posições 1 e 5 [18].

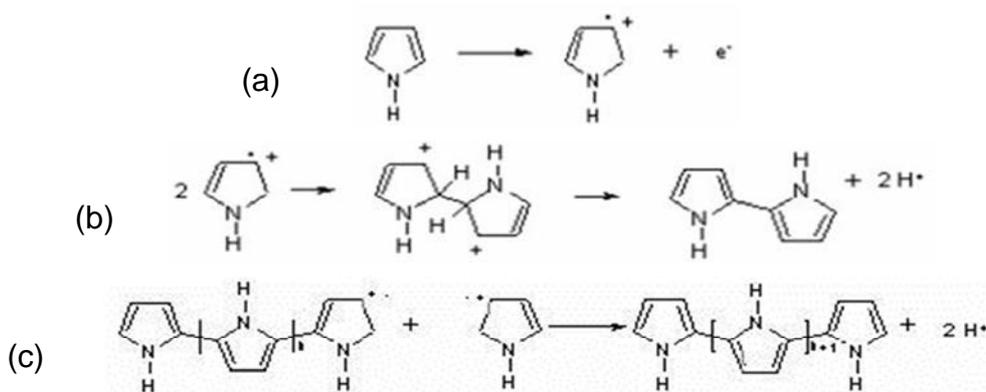


Figura 8: Mecanismo de polimerização do pirrol: (a) oxidação do monômero, (b) acoplamento radical-radical e (c) propagação da cadeia [18].

O processo de dopagem do polipirrol ocorre simultaneamente com a oxidação da cadeia, onde os elétrons são retirados durante a oxidação e há a inserção de contra íons dopantes para balancear a carga. A dopagem é do tipo-p, onde a remoção inicial de um elétron da cadeia leva à formação do estado eletrônico *polaron* e, conseqüentemente, à distorção da cadeia da forma aromática para a forma quinoide que se estende por quatro anéis pirrólicos, e possui energia de ionização menor e uma maior afinidade eletrônica que a estrutura aromática. Com a

perda de mais elétrons formam-se os *bipolarons* com duas cargas positivas localizadas na mesma região inicialmente distorcida. Ocorre então uma maior relaxação da rede cuja distorção encontra-se altamente localizada sobre quatro anéis pirrólicos. Os níveis bipolarônicos encontram-se vazios, mas em altos níveis de dopagem, estes níveis podem se sobrepor formando bandas bipolarônicas (Figura 9) [3,19,20,21].

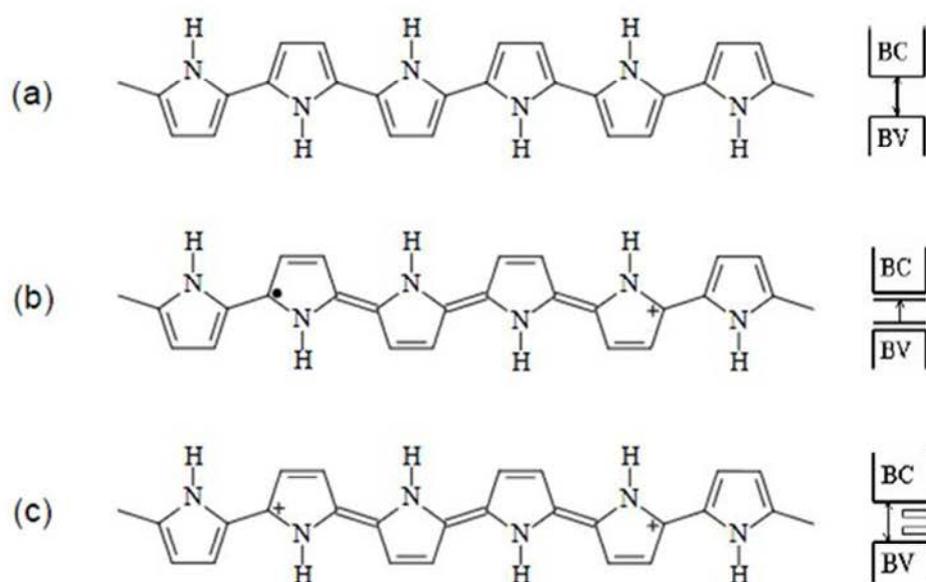


Figura 9: Estruturas para o polipirrol e no detalhe os níveis eletrônicos calculados para o aumento de dopagem: a) polímero neutro, forma aromática, b) *polaron* e c) *bipolaron*, forma quinóide com os orbitais bipolarônicos e a forma das bandas bipolarônicas [21].

Para os polímeros, os dopantes não fazem parte da estrutura, eles são inseridos entre as cadeias poliméricas, podendo ser removidos através da aplicação de um potencial elétrico, tornando a dopagem um processo reversível. Desta forma, para o polipirrol, a forma oxidada é condutora, enquanto a forma reduzida é isolante como pode ser observado na Figura 10 [3].

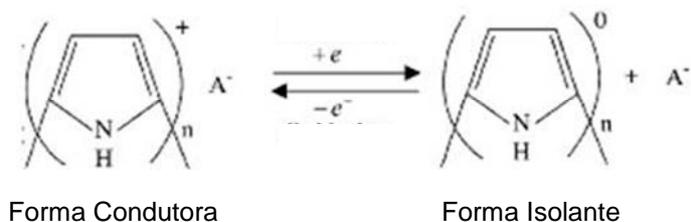


Figura 10: Forma isolante e condutora do polipirrol [18].

3.2.1 Síntese do Polipirrol

O polipirrol pode ser sintetizado por dois métodos: a síntese química e a síntese eletroquímica, e, em ambos, é obtido um pó preto insolúvel. A síntese eletroquímica é um processo considerado de fácil execução, rápido e limpo, contudo as condições de síntese devem ser muito bem controladas, pois influenciam diretamente as propriedades do polímero. Quando são variados os eletrólitos, sais dopantes, temperatura, natureza e forma do substrato, geometria da célula e condições elétricas de síntese afetam muito o produto final. A síntese pode ocorrer sob diferentes formas de perturbação anódica, como a aplicação de uma corrente constante (forma galvanostática), um potencial constante (forma potenciostática), uma ciclagem contínua de potenciais ou mesmo pulsos potenciostáticos. A técnica é realizada em uma célula eletroquímica com solução aquosa de um monômero e eletrólito onde são mergulhados três eletrodos, um eletrodo de trabalho que atua como suporte para a formação do polímero, um contra eletrodo que fornece a corrente requerida pelo eletrodo de trabalho sem influenciar nas características dos dados medidos, e um eletrodo de referência que mede o potencial e mantém o potenciostato estável durante a síntese [17,22,23].

Otero e Cantero [24] verificaram que as condições de síntese influenciam o filme obtido por eletrodeposição, sendo que as melhores propriedades de filme são obtidas quando este é obtido com baixos potenciais de oxidação (0,8V vs ECS), com curto tempo de polimerização e a temperatura ambiente. Além disso, baixas concentrações de monômero e eletrólito promovem filmes homogêneos e com alta densidade de carga.

A síntese química do polipirrol apresenta vantagens em relação à síntese eletroquímica, pois o número de variáveis envolvidas na polimerização química é reduzida, a gama de contraíons dopantes que podem ser incorporados à cadeia polimérica é limitado aos íons associados com o oxidante, o processamento pode ser realizado em grande escala formando pós ou dispersões. Além destas, a síntese química do polipirrol apresenta vantagens em relação à síntese de outros polímeros condutores, pois pode ser realizada em solução aquosa neutra ou em solventes orgânicos que dissolvam tanto o monômero do pirrol quanto o oxidante [18].

Wallace et. al. [18] realizaram estudos de polimerização do polipirrol através da síntese eletroquímica e síntese química, e destacaram a dificuldade de duplicar os produtos da eletropolimerização usando um agente oxidante químico. Concluíram ainda que os polímeros obtidos através das duas sínteses são similares na composição química, mas diferem marcadamente na morfologia do polímero.

3.2.2 Nanoestruturas de Polipirrol

As condições de polimerização utilizadas não só determinam a composição do polímero, mas também influenciam sua estrutura a nível molecular e microscópico. Atualmente as pesquisas com o polipirrol estão voltadas para a obtenção de nanoestruturas na forma de nanofibras [25,26], nanopartículas [27], nanofios, nanoredes [28], as quais proporcionam um elevado aumento na área superficial e uma boa condutividade elétrica devido ao rápido transporte iônico dentro da matriz, além de serem favoráveis para a imobilização de componentes biologicamente ativos [29].

Quando o polímero é obtido na forma convencional, e é usado para construir um sensor, o tempo de resposta é longo, devido à lenta penetração das moléculas a serem detectadas até o PIC. Em contraste para um sensor construído por nanoestruturas de PIC's o tempo de resposta é significativamente mais rápido, devido à estrutura porosa das nanoestruturas [30]. Desta forma, as nanoestruturas proporcionam maiores interações do polímero com o meio resultando em um desempenho muito superior quando comparado a polímeros obtidos por síntese

convencional, principalmente em sensores químicos, nanocompósitos entre outras aplicações que exigem maior sensibilidade e interação com o meio-ambiente [31,32].

Nos últimos anos foram desenvolvidas muitas formas de obtenção de nanoestruturas, como a polimerização interfacial, a mistura rápida de reagentes, a síntese eletroquímica, entre outras. Ainda a formação de nanoestruturas pode ser influenciada pela incorporação de um componente secundário, formando um nanocompósito. Esta incorporação torna-se interessante quando as propriedades do PIC são ampliadas, melhorando as propriedades químicas, físicas e biológicas [33]. Para o PPI a forma de obtenção de nanoestruturas mais conhecida é pela síntese eletroquímica, onde o polímero cresce sobre a superfície do eletrodo formando as nanoestruturas na forma de filme depositado. Além disso, as nanoestruturas podem crescer ao longo da direção do campo elétrico, formando estruturas orientadas, mas com quantidade de produto controlada. Já a síntese química produz os nanomateriais na forma de pó, os quais nesta forma possuem uma vasta gama de aplicações [28].

3.2.3 Aplicações do Polipirrol

Os polímeros condutores podem ser utilizados para uma série de aplicações, entre as quais podemos destacar eletrodos em baterias recarregáveis, sensores, circuitos eletrônicos, músculos artificiais, entre outros. As aplicações dos polímeros condutores são baseadas nas propriedades elétricas do estado dopado; nas propriedades eletrônicas do estado neutro semicondutor e na reversibilidade eletroquímica da transição entre o estado dopado e o neutro.

Algumas das aplicações biológicas do PPI são descritas na Tabela 2:

Tabela 2: Aplicações biológicas para Polipirrol [11].

Aplicação	Descrição	Vantagem	Limitação
Tecidos de Engenharia	Biocompatíveis, biodegradáveis, produz estímulos para melhorar a regeneração de tecidos;	Biocompatibilidade, boa condutividade e possíveis modificações químicas;	Não biodegradável se não for altamente poroso, hidrofobicidade;
Sondas Neurais	Eletrodos implantáveis para gravar ou para estimular neurônios, principalmente do cérebro;	Biocompatibilidade, boa condutividade e estabilidade eletroquímica, síntese pode ser realizada em eletrodos de metal;	Diminuição do contato elétrico na interface;
Biossensores	Dispositivos contendo biomoléculas como elementos sensores integrados com transdutores elétricos;	Capacidade de prender biomoléculas em filmes, superfície com modificações possíveis, transferência de carga elétrica eficiente, síntese eletroquímica em eletrodos de metal;	Hidrofobicidade pode desnaturar o aprisionamento de proteínas, surgir barreiras de difusão para aprisionamento de enzimas;
Dispositivos de entrega de drogas	Armazenamento e liberação de drogas de forma controlada;	Capacidade de prender biomoléculas, controle da liberação de drogas;	Hidrofobicidade pode desnaturar as proteínas, liberação rápida das drogas;
Bio-atuadores	Dispositivos para criar força mecânica que podem ser usados como músculo artificial;	Biocompatibilidade, boa condutividade, leve, pode trabalhar no corpo com temperatura e com fluidos corporais;	Curto prazo de estabilidade, delaminação de filmes, resposta limitada pela mobilidade de íons.

3.2.4 Polipirrol e Poliestireno Sulfonado

A maioria dos polímeros condutores pode ser alternada entre um estado eletricamente neutro e um estado oxidado, o que caracteriza a dopagem tipo-p do polímero, a qual corresponde a dopagem química com o uso de agente oxidante, pela incorporação da forma reduzida do agente oxidante como íon dopante

formando um complexo catiônico. Porém, pouquíssimos PIC podem ser eletroquimicamente reduzidos sofrendo a dopagem tipo-n que é a dopagem química com agente redutor, pela incorporação da forma oxidada do agente redutor como íon dopante e formando um complexo aniônico. Com o intuito de se conseguir materiais com esse tipo de dopagem, utilizam-se ânions como o poliestireno sulfonado (PSS⁻) (Figura 11) e o polivinilsulfonado (PVS⁻), os quais se caracterizam como dopantes poliméricos aniônicos grandes, que realizam a pseudodopagem do tipo-n (Figura 12), pois o ânion grande não pode ser extraído da matriz polimérica durante a redução do polímero, mantendo a neutralidade de carga pela inserção do cátion. Ocorre então um deslocamento do potencial de oxidação do polímero para valores mais negativos, aumentando o intervalo de voltagem entre este material (polímero/poliânion) e o polímero dopado através da dopagem tipo-p [34].

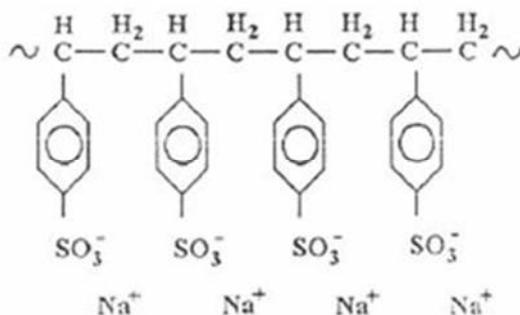


Figura 11: Representação da cadeia polimérica do NaPSS [35].

Quando o pirrol é oxidado a partir de soluções contendo poliânions como o PSS, o polímero condutor e o polieletrólito formam um emaranhado, onde as cargas positivas ao longo da cadeia são compensadas pelas cargas negativas do polieletrólito. Como resultado surge um composto com propriedades de ambos os polímeros, sendo incorporadas propriedades mecânicas e estabilidade ambiental provindas do PSS a condutividade elétrica e alta eletroatividade do PPI [36].

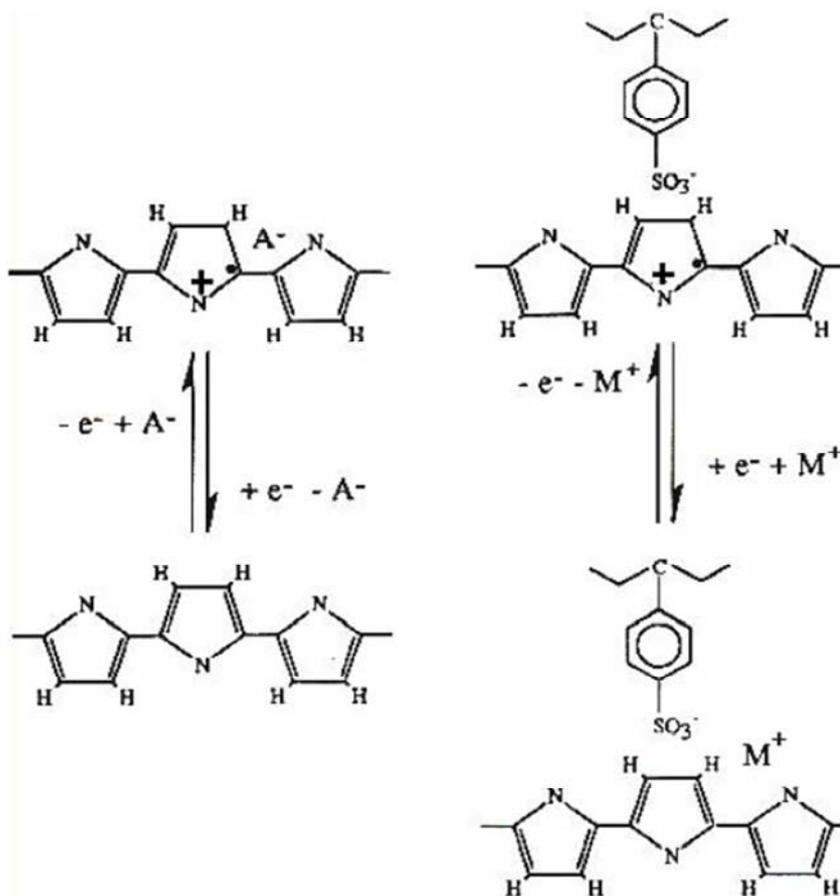


Figura 12: Mecanismo da pseudo-dopagem do tipo n do PPI [34].

3.3 Enzimas

As enzimas são proteínas de elevado peso molecular, especializadas na catálise de reações biológicas, que possuem extraordinária especificidade e poder catalítico. Possuem uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas, ou ainda, de resíduos de carboidratos. Elas catalisam certa espécie de reação química com um único reagente ou um número de reagentes estruturalmente similares. As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e, também, da própria enzima [37].

O nome enzima somente foi utilizado a partir de 1877, porém, em 1860 Pasteur reconheceu que a fermentação alcoólica era catalisada por enzimas, e que elas estavam intrinsecamente ligadas com a estrutura e a vida da célula do levedo.

Somente em 1936 que J. Northrop cristalizou as enzimas pepsina, tripsina e quimotripsina, podendo estabelecer definitivamente a natureza proteica das enzimas. Atualmente, cerca de 2 mil enzimas diferentes são conhecidas, quando muitas já foram isoladas em forma homogênea pura e algumas já foram cristalizadas [38].

Devido as várias propriedades como a possibilidade de isolamento, purificação, poder catalítico e especificidade, as enzimas tornaram-se atraentes como catalisadores para biotransformações e, sua aplicação na indústria, visando a confecção de biossensores vem sendo estudada. Isto se deve ao crescente aumento da utilização de enzimas nos diagnósticos clínicos. Atualmente existem diversas técnicas de purificação de enzimas (diálise, métodos cromatográficos, eletroforese), as quais permitem que uma enzima de alta pureza possa ser obtida e usada em escala industrial ou analítica, proporcionando a reutilização da mesma [39].

3.3.1 Nomenclatura e Classificação das Enzimas

As enzimas receberam dois nomes para a sua identificação. O primeiro nome refere-se ao seu nome curto para uso no dia a dia, o segundo é o nome sistemático, o qual é usado quando a enzima deve ser identificada sem ambiguidade. Desta forma, as enzimas foram nomeadas comumente pela adição do sufixo *ase* ao nome do substrato (molécula sobre a qual a enzima exerce ação catalítica), como por exemplo, a *sacarase* que catalisa a sacarose, a *uréase* que catalisa a úreia. Porém devido ao grande número de enzimas descobertas foi criado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) o segundo nome sistemático, que se baseia na divisão das enzimas em classes principais e conjuntos de subclasses, de acordo com o tipo de reação catalisada [38]. Na Tabela 3 pode ser visualizada a classificação internacional das seis principais classes das enzimas.

Tabela 3: Classificação internacional das enzimas [40].

Classes	Nº de Código	Tipo de Reações Catalisadas
Oxidoredutases	1	Reações de oxidação-redução, transferindo elétrons, hidretos ou prótons;
Transferases	2	Transferência de grupos funcionais contendo C, N ou P;
Hidrolases	3	Clivagem das ligações adicionando água, hidrolise;
Liases	4	Formam ou destroem duplas ligações, retirando ou adicionando grupos funcionais;
Isomerases	5	Reações de isomerização;
Ligases	6	Formação de pontes entre o C e o O, S, N; acoplados à hidrólise de fosfatos de alta energia.

3.3.2 Atividade Enzimática e Mecanismo de Ação

As enzimas convertem uma substância, substrato, em outra, produto, sendo extremamente específicas para a reação que catalisam e, desta forma, catalisam um só tipo de reação química. A velocidade da reação é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação (E_a) necessária para converter o substrato em produto, tornando a reação termodinamicamente favorável e não alterando o equilíbrio químico da mesma, como pode ser observado na Figura 13 [40]. Embora a enzima participe da sequencia da reação, ela não sofre nenhuma transformação com o decorrer desta. Sendo assim, poucas moléculas de enzima são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato [39].

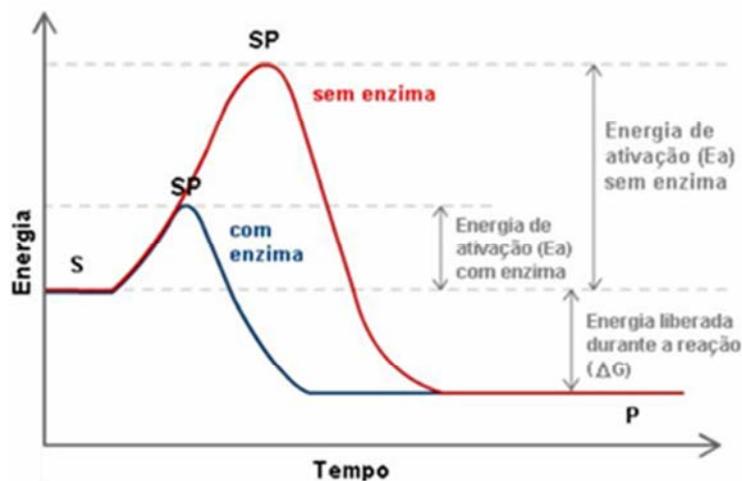


Figura 13: Energia de ativação de uma reação não enzimática e uma reação enzimática, onde: ΔG - energia livre de Gibbs, S - substrato e P – produto [40].

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional ao número de sítios ativos (fenda ou estrutura presente na enzima que se liga ao substrato) presentes na enzima, quando a concentração de substrato não está em níveis de saturação. Desta forma, existem vários fatores que afetam a velocidade de reação, sendo o principal a concentração de substrato S, que varia à medida que a reação ocorre. A partir deste pressuposto, Michaelis e Menten propuseram que a enzima E combina-se reversivelmente a seu substrato S em um processo rápido, para formar um complexo ES (enzima-substrato), que subsequentemente numa segunda etapa, mais lenta, quebra-se liberando o produto reacional P e a enzima livre. A seqüência dessas reações pode ser representada pela equação 1 [40]:



Onde: k_1 , k_2 e k_3 são as constantes de velocidade.

Pode-se então chegar à equação de Michaelis-Menten (equação 2) que descreve como a velocidade de reação varia com a concentração de substrato:

$$V_o = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \tag{2}$$

Onde: V_o = velocidade inicial de reação; V_{max} = velocidade máxima atingida; K_m = constante de Michaelis-Menten = $(k_2+k_3)/k_1$; $[S]$ = concentração de substrato [40].

A V_{\max} de reação é encontrada aumentando progressivamente a concentração de substrato, onde esta se torna constante (Figura 14). Neste estágio todos os centros ativos estão ocupados com substrato, não existindo enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima [37].

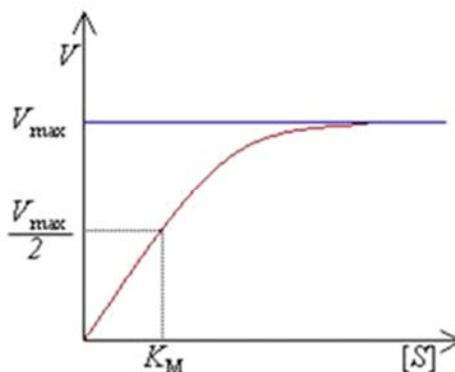


Figura 14: Curva de saturação numa reação enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato e a velocidade [41].

A atividade da enzima é geralmente descrita através da V_{\max} e também da K_m , que representa a concentração de substrato a qual se detecta uma velocidade de reação igual à metade da V_{\max} . Já a *Enzyme Commission* estabelece que a unidade de atividade enzimática U é a quantidade de enzima capaz de converter $1\mu\text{mol}$ de substrato por minuto nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). Pois fatores como pH, temperatura, cofatores e inibidores podem afetar as reações enzimáticas, atuando no mecanismo cinético das reações e aumentando ou diminuindo a velocidade reacional pela modificação na estrutura dos sítios ativos alterando a atividade catalítica [37].

Fatores que afetam a ação enzimática:

- *Temperatura*: as enzimas possuem temperaturas ótimas, nas quais apresentam um máximo de atividade. Em temperaturas baixas as enzimas encontram-se muito rígidas e em temperaturas altas (maior que 50°C) a atividade cai bruscamente devido a desnaturação da enzima;

- *pH*: cada enzima apresenta um pH ótimo de máxima atividade. Sua variação pode alterar os aminoácidos com grupos ionizados ou não-ionizados do sítio ativo enzimático, provocando conformações da enzima ou desnaturação da mesma;

- *Cofatores*: componentes não proteicos que se associam à enzima para sua ativação. Os cofatores podem ser íons metálicos como o Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ou moléculas orgânicas derivadas de vitaminas;

- *Inibidores*: são moléculas que podem inibir a ação catalítica de uma enzima pela ocupação temporária do centro ativo, através de uma semelhança estrutural com o substrato original, caracterizando os inibidores competitivos (Figura 15), ou pela alteração da conformação espacial da enzima pela ligação do inibidor em sítio ativo diferente ao do substrato, impedindo a ocorrência da reação, caracterizando o inibidor não competitivo [42].

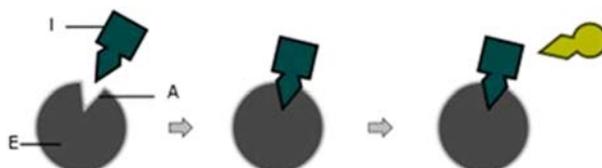


Figura 15: Inibição competitiva, inibidor I liga-se à enzima E pelo sítio ativo A, não permitindo ao substrato ter acesso e não produzindo produtos [41].

3.3.3 Especificidade Enzimática

As enzimas possuem uma alta especificidade em relação às reações que catalisam de modo que somente certos substratos sofrem sua ação e unicamente um tipo de reação ocorre, sem reações colaterais ou produtos derivados [43].

Um dos primeiros estudos sobre a especificidade das enzimas foi realizado por Emil Fisher, que observou em 1894 a capacidade das enzimas em hidrolisar glicosídeos através da distinção destes pelas suas formas estereoisômeras. Ele então anunciou o princípio de que a molécula do substrato se ajusta de maneira precisa ao sítio ativo da enzima como um conjunto de chave e fechadura (Figura 16) em uma relação de complementariedade [38].



Figura 16: Modelo chave fechadura proposto por Fischer, onde E é a enzima, S o substrato e A o sítio ativo [41].

No entanto, o modelo falha em explicar a estabilização dos estados de transição que as enzimas exibem. Em meados de 1960 Daniel Koshland sugeriu que as enzimas apresentam uma flexibilidade em suas estruturas e, devido a isso, o sítio ativo altera a sua conformação na presença do substrato, ocorrendo interações entre estes pela alteração das cadeias laterais dos aminoácidos que formam os sítios ativos, que sofrem uma reorientação de maneira que as suas posições potencializem a ação catalítica da enzima. O modelo de Koshland recebeu o nome de encaixe induzido (Figura 17) [42].

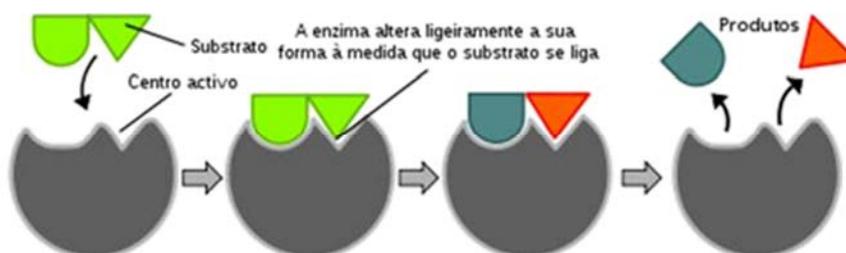


Figura 17: Modelo encaixe induzido proposto por Koshland [41].

3.3.4 Peroxidase

As peroxidases são um grupo de enzimas oxirredutases que oxidam substratos orgânicos, tendo o peróxido de hidrogênio seu principal substrato. Seu nome provém do inglês "*horseradish peroxidase*", (HRP), a qual se caracteriza como uma glicoproteína globular obtida a partir da raiz forte (*Amoracia rusticana*) e que contém vários tipos de isoenzimas. Sua produção é feita em larga escala devido ao seu uso comercial como um componente de kits de diagnóstico clínico e em imunoenaios [44].

A estrutura da HRP (Figura 18) possui dois domínios similares e bem definidos. Cada domínio contém um íon cálcio que garante a estabilidade estrutural e controla diretamente a atividade enzimática. Os domínios fornecem um ambiente hidrofóbico onde o grupo heme (grupo prostético no sítio ativo) se localiza, existe ainda um resíduo de histidina que ocupa a posição de 5ª coordenação do átomo de Fe. O domínio da enzima próximo a este ligante é chamado de proximal, e o outro análogo a ele de distal [44].

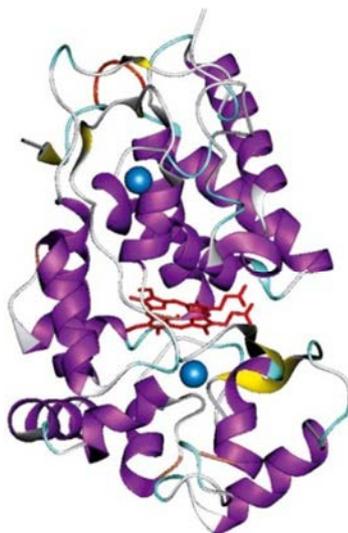


Figura 18: Representação tridimensional da estrutura da HRP. Apresenta o grupo prostético heme em vermelho localizado entre os domínios distal e proximal, cada um com um íon Ca^{2+} em azul. As regiões de α -hélice e folha β da enzima são mostradas em violeta e amarelo respectivamente [44].

A catalise da HRP pode ser visualizada na Figura 19, onde a primeira etapa que ocorre é a clivagem do peróxido de hidrogênio ou agente oxidante, sendo catalisada pela HRP. Nesta etapa, um dos oxigênios do peróxido deixa a molécula em forma de água, enquanto que o outro fica retido no grupo heme da enzima o qual contém o íon Fe^{3+} que é oxidado pelo peróxido de hidrogênio ao Composto I. Na ausência de doadores fortes de elétrons o composto I pode abstrair um elétron do substrato e se transformar no Composto II, que por sua vez aceita um elétron de outra molécula de substrato e retorna à forma nativa da enzima. Nesta etapa, a perda de um elétron do substrato geralmente é acompanhada pela perda de um próton, determinando a formação de um radical [45].

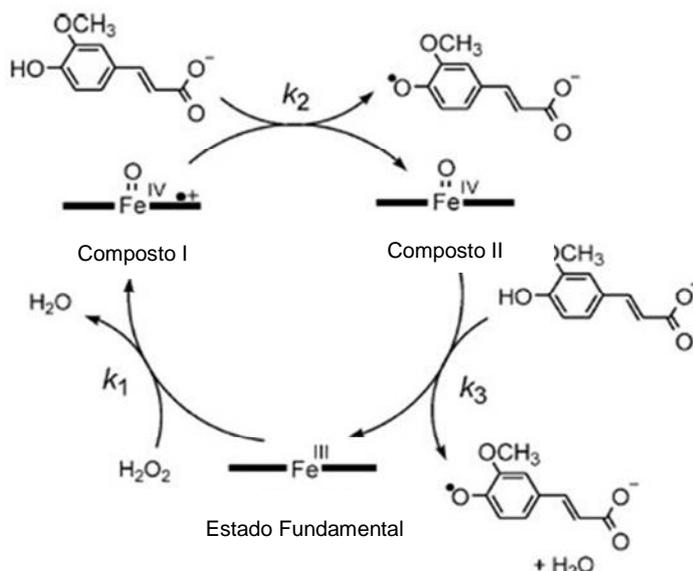


Figura 19: Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (agente oxidante). As constantes de velocidade k_1 , k_2 e k_3 representam a taxa de formação do Composto I, a taxa de redução do Composto I e a taxa de redução do Composto II, respectivamente [45].

Os substratos que reduzem os Compostos I e II são chamados de *substratos redutores* e a interação destes com o sítio ativo, acontecem através da posição delta da ponte heme. A redução do Composto II é geralmente a etapa determinante da velocidade da reação. O excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico normal, assim o Composto II passa a forma de Composto III, que por perda de oxigênio pode chegar ao Composto IV, o qual pode reagir com o H_2O_2 e retornar a forma de Composto II. Este caminho possui uma velocidade de reação muito inferior, o que pode fazer com que o Composto III não libere um oxigênio e, devido a isso, passa a uma forma inativa irreversível, ocasionando a perda total da atividade enzimática [45].

Temoçin e Yigitoglu estudaram a atividade e estabilidade da HRP imobilizada em fibras de polietilenotereftalato (PET). Eles verificaram que o comportamento da enzima modifica-se com o ambiente em que a mesma está inserida. Desta forma, verificaram que a enzima HRP possui um pH ótimo quando livre diferente do pH ótimo quando imobilizada em matriz sólida, devido aos encargos residuais sobre a matriz sólida e o valor de pH nas imediações do sítio ativo. Em geral concluíram que as enzimas imobilizadas possuem uma gama mais ampla de pH que as enzimas em livres [46].

Fernandes et al [47] verificaram a desnaturação da HRP livre e imobilizada em polianilina. No estudo foi observado que a enzima livre possui uma atividade máxima em temperaturas próximas a 45°C seguida de redução significativa da atividade com o aumento da temperatura. Enquanto que a enzima imobilizada exibiu uma atividade máxima a 60°C diminuindo lentamente sua atividade com o aumento da temperatura. Essa melhora na resistência a desnaturação da enzima imobilizada tem sido associada a múltiplas ligações adquiridas no processo de imobilização da enzima no polímero.

Mesmo que as enzimas reduzam a barreira energética de uma reação, sua utilização na forma pura inviabiliza o processo devido ao seu elevado custo. Para minimizar este fato uma opção seria a imobilização da enzima em suportes insolúveis, o que aumenta a sua estabilidade frente a flutuações de temperatura no processo [46].

3.3.5 Imobilização Enzimática

A imobilização de enzimas teve um desenvolvimento muito grande nos últimos anos, pois se busca a obtenção de um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, usando um suporte que possa agir para aumento da eficiência da enzima imobilizada. As enzimas quando imobilizadas possuem uma maior estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura além de poderem ser reutilizadas. Ainda, para a escolha do suporte de imobilização devem ser observadas algumas propriedades, como resistência, grau de porosidade, grupos funcionais passíveis de modificação, estabilidade mecânica, custo-benefício, entre outros [48].

Existem muitas técnicas de imobilização de enzimas, entre elas podemos destacar a adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada, confinamento (*Entrapment*) e encapsulamento (Figura 20). Nos processos mais simples como adsorção e confinamento, ocorrem poucas perturbações sobre o suporte e a estrutura da enzima, havendo apenas ligações físicas da enzima com a matriz inerte. Nos processos que envolvem reações químicas como as ligações covalentes ou ligações covalentes cruzadas, as alterações são mais drásticas, podendo levar a

uma perda da atividade enzimática quando a ligação da enzima na matriz ocorre através do sítio ativo, mas geralmente, conferem ao biossensor melhor estabilidade operacional. Desta forma, todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens. A seguir serão descritos os métodos de imobilização enzimática [46,49].



Figura 20: Mecanismos de Imobilização de Enzimas.

3.3.5.1 Adsorção

A grande vantagem deste método reside na sua simplicidade e nas condições brandas de como é realizado, preservando a atividade enzimática. A imobilização ocorre principalmente através de interações fracas entre o suporte e a enzima, sendo estas interações Van der Waals, pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas ou adsorção física, que embora fracas ocorrem em número suficiente para que a imobilização seja possível (Figura 21). O método é realizado por simples mistura da enzima com o suporte, nas condições de pH e temperatura adequados e, em seguida, lava-se a enzima que não ficou ligada ao suporte [50].



Figura 21: Adsorção da enzima sobre matriz imobilizadora, com orientação randômica [50].

Como desvantagens apresenta com o decorrer do tempo uma dessorção progressiva das moléculas da enzima, além de serem altamente afetadas pelo pH, força iônica do meio, temperatura ou mesmo pelo substrato [49,51].

3.3.5.2 Ligações Covalentes

A imobilização covalente da enzima em um suporte sintético envolve a ligação de grupos funcionais, que não sejam essenciais para a atividade catalítica, da enzima no suporte através da ativação prévia de grupos reativos da matriz (Figura 22). Assim os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados, boa estabilidade mecânica e elevada área superficial [52].



Figura 22: Ligação Covalente da enzima na matriz, percebe-se que a enzima nem sempre se liga com o sítio ativo disponível [50].

As reações para promoção da ligação da enzima na matriz, em geral, são realizadas em meio aquoso em temperaturas baixas e com o pH próximo à neutralidade. Pode-se ainda utilizar um agente ativador para os grupos funcionais da matriz. Quando realizada a ligação covalente, deve-se ter o cuidado de não comprometer o sítio ativo da enzima ao se efetivar a ligação, pois levaria a inativação desta. O emprego do método de ligação covalente pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que a enzima é ligada irreversivelmente à matriz [50].

3.3.5.3 Confinamento (*Entrapment*)

A imobilização ocorre em espaços vazios presentes na rede polimérica, onde a enzima aloja-se ficando limitada pela estrutura da rede (Figura 23). Ocorre uma simples ligação física entre a enzima e o suporte e, devido a isto, não existe o risco de desnaturação da enzima pela aplicação de reagentes químicos e nem pela inativação do sítio ativo quando este se liga na matriz [50].



Figura 23: *Entrapment*, enzima confinada entre as malhas de um polímero [50].

A desvantagem deste processo caracteriza-se na dificuldade de transporte do substrato e do produto através da estrutura do polímero, o que aumenta o tempo de resposta. Além disso, as limitações difusionais são intensas, podendo a enzima desprender-se da rede de forma muito fácil. Estas podem ser solucionadas com o aumento da concentração de enzima imobilizada o que encarece o processo [11,51].

3.3.5.4 *Ligações Covalentes Cruzadas*

Neste método as enzimas ligam-se entre si por pontes intermoleculares, formando uma ampla rede tridimensional. A ligação cruzada (Figura 24) envolve a formação de ligações covalentes entre enzimas utilizando agentes multifuncionais como o glutaraldeído. O grande porém, caracteriza-se quanto à toxicidade destes reagentes, o que limita o seu uso em células vivas e em diversas enzimas [49,51].

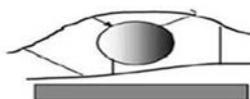


Figura 24: Ligação covalente cruzada entre polímero e enzima [53].

3.4 *Biossensores*

Os biossensores são dispositivos híbridos do tipo *chip*, capazes de converter uma reação biológica/bioquímica em um sinal apropriado. Este sinal pode ser

potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, piezelétrico ou entalpimétrico, podendo desta forma ser utilizado em análises clínicas.

O desenvolvimento dos biossensores é definido pela natureza de aplicação destes, e alguns fatores desempenham um papel decisivo na arquitetura do sensor, como sensibilidade, meio ambiente da amostra, custo, tempo de vida útil e uso específico. Desta forma, para o biossensor ser utilizado como instrumento de análise deve apresentar características como seletividade, exemplificada pela especificidade das enzimas; faixa de sensibilidade; acurácia e precisão; tempo de resposta e de recuperação; frequência de amostragem; estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados, entre outros [54].

O dispositivo deve ser capaz de responder de forma contínua e direta sem perturbar a amostra. Assim, são utilizados para medição direta de um analito ou substrato em uma amostra, sendo o sinal criado proporcional à concentração de substrato. Os sensores eletroquímicos consistem em um eletrodo que é usado como elemento de transdução coberto com uma camada de matriz e biomoléculas imobilizada, esta camada interage com o substrato específico e as mudanças resultantes desta interação são traduzidas pelo transdutor em uma resposta quantitativa, como sinais elétricos, óticos, térmicos, entre outros [53].

O elemento chave do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas que permitem avaliar a concentração do componente desejado contido na amostra. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor e faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação. Já os materiais empregados nos transdutores devem garantir que o biossensor apresente resposta rápida além de serem econômicos, pois este tem o papel de converter o sinal produzido pelo componente biológico em uma resposta mensurável tal como corrente, potencial, variação de temperatura, entre outros [54].

Um esquema geral de funcionamento de um biossensor é apresentado na Figura 25, onde a matriz ou suporte envolvendo o componente biológico detecta o substrato e, em seguida, como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato ocorrem variações nos parâmetros físico-químicos. Estes são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado que manda o sinal para o amplificador que detecta e então processa os dados e produz uma resposta [55].

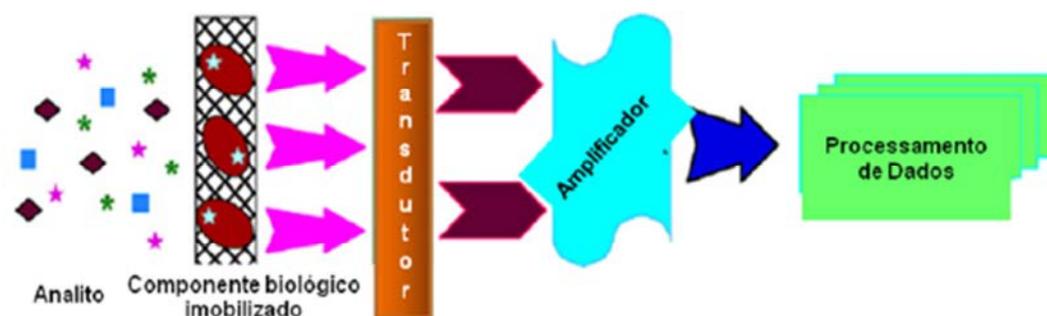


Figura 25: Esquema geral de funcionamento de um biossensor [55].

Para a escolha do biocomponente utilizado no biossensor, alguns requisitos básicos são exigidos, como a disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o substrato, estabilidade face ao meio e às condições de medição e possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho. Com base nestas exigências, duas categorias de biossensores eletroquímicos podem ser identificadas, dependendo da natureza biológica do processo: *dispositivos biocatalíticos* utilizando enzimas, células, bactérias ou tecidos como componentes imobilizados e *sensores de afinidade* com base em anticorpos/antígenos, membranas receptoras ou ácidos nucléicos [53]. Na Tabela 4 podem ser visualizadas as principais classes de biossensores quanto a sua sensibilidade, e que se enquadram dentro destas duas categorias.

Tabela 4: Classe de biossensores quanto a sua sensibilidade [54].

Biossensor	Funcionamento	Particularidades
Enzimático	Enzimas são catalisadores altamente específicos e seletivos as quais são imobilizadas na molécula do substrato;	Estabilidade relativamente baixa nas variações das condições do meio reacional;
Microbiológico	Microorganismos imobilizados que assimilam compostos orgânicos produzindo uma variação na atividade respiratória ou de metabolitos;	Reconhece a espécie de interesse interligada a um adequado sistema de transdução;
Quimiorreceptor	Proteínas que interagem com espécies químicas como hormônios, resultando em variações conformacionais;	Apresentam problemas relacionados à ligação ao transdutor, dificuldade de manipulação e tempo de vida curto;
Imunossensor	Anticorpos que se ligam a substâncias particulares (antígenos) com alta especificidade e alta afinidade;	Elevado peso molecular dos anticorpos que dificulta a sua adaptação ao transdutor.

3.4.1 Transdutores

A função do transdutor é converter o sinal bioquímico em um sinal eletrônico. O transdutor de um dispositivo elétrico responde de uma forma que um sinal pode ser eletronicamente amplificado, armazenado e exibido. O sistema de transdução adequado pode ser adaptado em um conjunto de sensores, dependendo da natureza da interação bioquímica com as espécies de interesse [51].

Existem três requisitos básicos que devem ser considerados para realizar a escolha do transdutor: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado; que seja altamente específico para o substrato de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada [56].

Os transdutores podem ser classificados de acordo com o sistema de transdução utilizado em: biossensores eletroquímicos, que englobam os

biossensores amperométricos, potenciométricos e condutimétrico; biossensores calorimétricos ou biossensores óticos.

3.4.1.1 Biossensores Amperométricos

Os biossensores amperométricos medem a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou reagente geralmente na aplicação de um potencial constante. O fator mais importante que afeta o funcionamento de um biossensor amperométrico é a transferência de elétrons entre a molécula do catalisador ou enzima e a superfície do eletrodo através do envolvimento do substrato que pode ser um polímero condutor (Figura 26) [51].

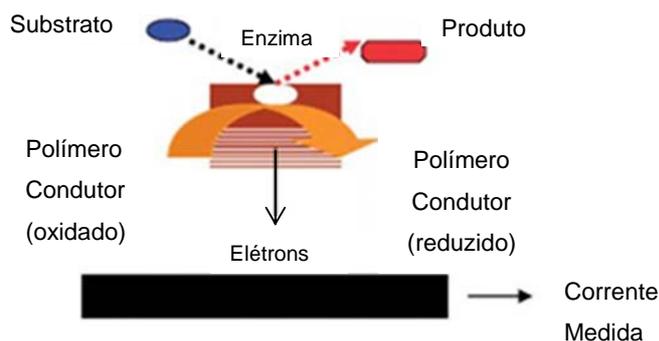


Figura 26: Esquema representando a transferência de elétrons em biossensor amperométrico [11].

Estes biossensores dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente substratos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo [54].

Os biossensores amperométricos podem ser classificados de acordo com o processo de transferência de cargas em biossensores amperométricos de primeira, segunda e terceira gerações. Os de primeira geração trabalham a altos potenciais e

baseiam-se na diminuição da concentração de oxigênio, onde dois eletrodos são separados da amostra por uma membrana permeável a gás. Os de segunda geração baseiam-se no uso de um mediador para transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, a fim de se diminuir o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, estes mediadores podem ser polímeros condutores, materiais inorgânicos. Os de terceira geração caracterizam-se pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo, trabalhando a baixos potenciais (Figura 27) [39].

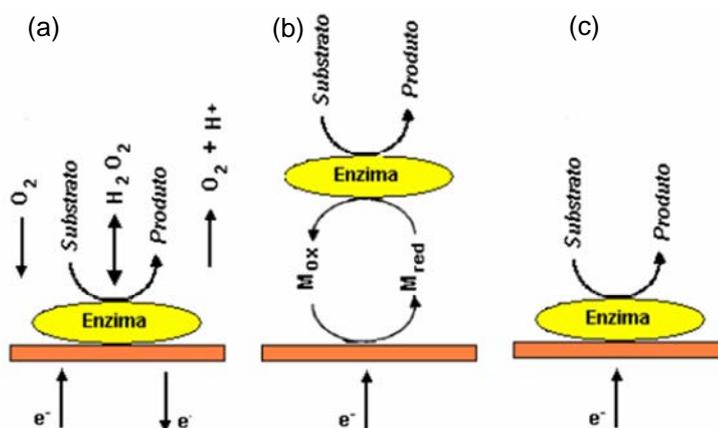


Figura 27: Representação esquemática para biossensor amperométrico segundo o processo de transferência de cargas. a) 1ª geração; b) 2ª geração; c) 3ª geração [39].

Devido a esses sensores serem operados por difusão, eles apresentam como desvantagens uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima, os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse, a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o substrato difunde até a superfície do eletrodo, entre outros. Apesar destes, este tipo de biossensor é o mais utilizado nos dispositivos comerciais, pois são baseados em enzimas oxireductases, ou seja, o maior grupo de enzimas disponíveis no mercado [54].

3.4.1.2 Biossensores Potenciométricos

Os biossensores potenciométricos são dispositivos do tipo íons-seletivos constituídos por uma membrana contendo biocatalisadores imobilizados. Em geral, utilizam um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho ambos em contato com a amostra, e se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo de trabalho por acumulação de carga e, conseqüentemente, densidade de carga aumentada na superfície do eletrólito. Assim, as enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons durante a catálise, como a geração de prótons H^+ que altera o pH do meio e uma diferença de potencial é criada entre o eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo ou de trabalho. Esta diferença de potencial é transformada em um sinal possível de ser lido e determinado [39,55].

Estes dispositivos íons seletivos têm como vantagens a rapidez da detecção, a sensibilidade, o baixo custo e a simplicidade de medição, onde somente a medição do pH é necessária. Em geral a sua faixa de trabalho é de 10^{-1} a 10^{-5} mol sendo a sua resposta obtida logarítmica. Portanto, como o potencial elétrico desenvolvido pelo eletrodo é proporcional ao logaritmo da atividade do íon em solução, a precisão da medida é constante por toda a sua faixa dinâmica [54].

3.4.1.3 Outros tipos de Biossensores

Apesar da eficiência dos dois métodos de transdução apresentados existem muitos outros métodos que estão sendo estudados. Entre estes podemos citar os biossensores condutimétricos, óticos e calorimétricos.

Os biossensores condutimétricos medem as mudanças de condutância do componente biológico que produzem ou consomem espécies iônicas nas reações por elas catalisadas, alterando a condutividade global da solução, sendo esta detectada por um par de eletrodos de metal. As medidas condutimétricas com dispositivos simples são difíceis de serem realizadas devido ao sinal depender fortemente da temperatura sendo sensíveis a variações na ordem de $\pm 1^{\circ}C$, as

amostras utilizadas não podem ser diluídas previamente e a magnitude do sinal não é estável [51,54].

Biossensores óticos baseiam-se no uso de tiras colorimétricas, as quais contêm enzimas oxiredutases e uma substância (cromógeno) capaz de mudar suas propriedades óticas em resposta a uma mudança nas condições do meio. O produto gerado na reação entre a enzima e o substrato oxida o cromógeno o qual produz uma emissão de luz, sendo esta transmitida via fibra ótica e monitorada em equipamento ótico. Assim, a sua intensidade é proporcional à concentração do substrato a ser determinado [39,51].

Os dispositivos calorimétricos são baseados nas reações bioquímicas que envolvem uma mudança na entalpia. Essa mudança de entalpia representa uma liberação de energia a qual se relaciona com a quantidade de substrato reagido e é medida na forma de calor. Porém, esses biossensores são altamente complexos e possuem baixa especificidade na análise, pois detectam todo o calor liberado na reação, podendo este ser efeito da diluição ou mistura dos componentes e, não apenas, o calor relacionado a ação enzimática e, ainda, apresentam altos custos [51,54].

3.4.2 Biossensores e Polímeros Condutores

Os polímeros condutores têm atraído muito interesse como novos materiais para aplicações potenciais em atuadores químicos, biossensores, capacitores, catalisadores e dispositivos eletrônicos. Entre estas pode ser destacado o interesse quanto a sua utilização como uma matriz para imobilização de enzimas, pois melhoram a velocidade de detecção, a sensibilidade e a versatilidade de biossensores utilizados em diagnósticos clínicos. Nos últimos anos, polímeros condutores têm sido estudados como materiais de sensoriamento, pois apresentam um funcionamento privilegiado a temperatura ambiente além de possuírem fácil processamento [51,57,58].

Os PIC's apresentam boa compatibilidade com os biocomponentes quando estes se encontram em solução aquosa neutra e possuem flexibilidade na estrutura química conforme a necessidade de imobilização, sendo possível alterar o método

de síntese do polímero conforme a estrutura que se deseja obter. Outro fator positivo é a eficiente transferência de carga elétrica produzida pela reação de catálise ao circuito eletrônico, o que é favorecido pela alta condutividade elétrica dos PIC's [51,59].

Como uma classe especial, os polímeros condutores nanoestruturados, mantêm as propriedades dos PIC's, mas também possuem as características dos nanomateriais, como grande área superficial, que aumenta ainda mais o mérito dos PIC's em projetar e fabricar novos sensores, pois esta aumenta a sensibilidade de um sensor de forma considerável. Além desta, quando um PIC convencional é usado na construção de um sensor, o tempo de resposta deste é relativamente longo, pois a penetração das moléculas do substrato no polímero é lenta. Em contraste para um sensor construído com nanoestruturas, o tempo de resposta é significativamente mais rápido devido à estrutura porosa dos nanotubos, nanofibras, nanopartículas [30].

Entre os PIC's mais comumente utilizados para a aplicação em biossensores, o polipirrol destaca-se devido à síntese poder ser realizada em um meio neutro, como água, sendo este um meio estável para a enzima, por possuir alta condutividade, baixos potenciais de oxidação, ótimo desempenho a temperatura ambiente, além de estabilidade ambiental [59].

Desta forma, o uso dos polímeros condutores em biossensores está se tornando permanente, pois atua como um meio simples e eficaz para a imobilização de biocomponentes.

3.4.3 Biossensores produzidos por *Silk-Screen*: Tiras de Teste Rápido

Existem diversos métodos para a preparação de sensores, os mais comuns são aqueles produzidos através da técnica de filmes espessos. A película do biossensor é normalmente considerada como aquela produzida por camadas de tintas ou pastas especiais depositadas sequencialmente em um suporte isolante. O uso de técnicas de produção de filmes mostra vantagens significativas, como a flexibilidade de *design*, escolha de materiais de baixo custo, automação do processo de fabricação e a capacidade do uso de uma tecnologia simples. A técnica de

serigrafia parece ser uma das mais promissoras tecnologias de fabricação de sensores, pois pode ser realizada em larga escala, tem fácil reprodução, é uma técnica versátil que permite a miniaturização do sensor além de apresentar baixo custo [60,61].

A fabricação de sensores descartáveis baseado no método de serigrafia pode ser considerada a técnica mais utilizada, devido a sua simplicidade e economia. Os sensores podem ser impressos em uma folha, normalmente de policloreto de vinila (PVC), o qual possui propriedades mecânicas satisfatórias e é de fácil manuseio, através de uma tela de impressão esticada em uma armação de madeira, que pode ser de seda, náilon ou poliéster. Para a produção das trilhas que compõem os eletrodos do sensor e que são responsáveis pelo contato elétrico, são utilizadas pasta de carbono, e para a constituição do eletrodo de referência utiliza-se pasta de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), por ser um material já conhecido como eletrodo de referência [62].

Na Figura 28 podem ser visualizados modelos de sensores, onde com a evolução e desenvolvimento, foram integrados em um único dispositivo os três eletrodos; de trabalho, referência e contra eletrodo, como forma de miniaturizar, simplificar e ampliar os métodos de aplicação do dispositivo [61]. Desta forma, o sensor é composto por três trilhas, sendo elas: o eletrodo de trabalho (ET), o eletrodo de referência (ER) e o contra eletrodo (CE). As trilhas do eletrodo de trabalho e do contra eletrodo apresentam apenas pasta de carbono, quando o eletrodo de referência apresenta na sua extremidade a pasta de Ag/AgCl. Sobre o eletrodo de trabalho é aplicado na sua extremidade a enzima imobilizada na matriz polimérica.

No desenvolvimento deste estudo, observa-se que a construção de um biossensor vem despertando interesse cada vez maior na comunidade científica e nas indústrias farmacêuticas, pois com a vantagem da realização de análises clínicas de forma simples, otimizada e, principalmente, pela obtenção de um resultado rápido e confiável, os estudos desenvolvidos neste âmbito estão cada vez mais promissores.

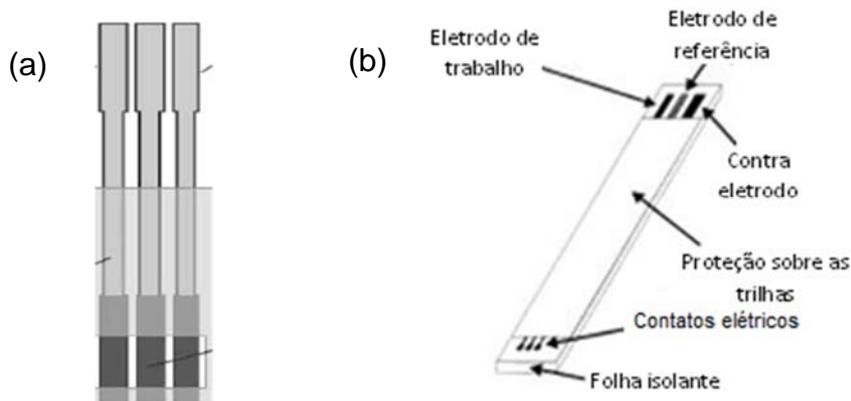


Figura 28: a) Esquema de sensor para ser impresso em tela de *silk-screen*; b) Modelo de sensor comercial [61,62].

Porém os pesquisadores desta metodologia ainda apresentam dificuldades em otimizar todas as etapas de produção envolvidas no desenvolvimento destes dispositivos. Desta forma, os estudos são direcionados às técnicas de imobilização de enzimas nos polímeros condutores e aplicação destes em sensores laboratoriais, mas não na aplicação destes nas tiras de teste rápido.

Atualmente os estudos direcionam a imobilização da enzima e síntese do polímero diretamente no sensor pelo método eletroquímico, que apresenta desvantagens para aplicação industrial, devido principalmente à dificuldade de produção em larga escala.

Desta forma, cabe aos pesquisadores buscarem técnicas de aplicação da mistura polímero e enzima em sensores que possam de fato ser utilizados como uma tira de teste rápido, visando à otimização de uma metodologia de imobilização de enzimas em polímeros condutores que possa ser realizada em escala industrial e aplicação em uma tira de fácil construção e de baixo custo.

Portanto neste trabalho se objetivou desenvolver todas as etapas de preparação do biossensor: a construção e fabricação da tira de teste rápido e a imobilização da enzima em um PIC previamente sintetizado.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Nas sínteses do polipirrol e polipirrol dopado com poliestireno sulfonado foram utilizados monômero de pirrol 99% p.A. (Acros) previamente destilado, poli(4-estirenosulfonado) de sódio em pó de Mw ~1.000.000g/mol (Sigma), $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Synth) como agente oxidante e água destilada.

As tiras de teste rápido foram preparadas em folha de PVC de 0,6 mm de espessura, onde foram pintadas, através da técnica de *silk-screen*, três trilhas de pasta de carbono (Gwent Group, referência C2030519P4), sendo a extremidade de uma das trilhas pintada com pasta de Ag/AgCl (Gwent Group, referência C61003P7).

Para a imobilização da enzima foi utilizada a enzima *Horseradish Peroxidase* (HRP) tipo VI com aproximadamente 1500 UI/mg (Sigma). As medidas de absorvância da imobilização de enzima foram realizadas em Leitor de Elisa onde foram utilizados TMB como agente colorimétrico revelador, composto por 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (Sigma) e Dimetil Sulfóxido – DMSO (Synth), diluente de TMB composto por Na_2HPO_4 anidro (Nuclear), ácido cítrico anidro (Synth) e água de osmose reversa, e H_2O_2 40% (Vetec), determinado por titulação, como substrato e agente de perturbação nos testes de sensibilidade. Como reagente para encerrar a reação foi utilizado H_2SO_4 1M (Vetec).

Os sensores foram lavados, para verificação da enzima imobilizada, com agentes detergentes: Tampão Fosfato Salino (PBS) pH=7,2 obtido a partir de tampão fosfato salino estoque 10X composto de NaH_2PO_4 anidro (Synth), Na_2HPO_4 anidro (Synth), NaCl anidro (Vetec) e água de Osmose Reversa; Tween 20 composto de 0,05% de Tween 20 (Vetec) em PBS e SDS 10% composto de Dodecil Sulfato de Sódio - SDS (Synth) em água de Osmose Reversa.

4.2 Síntese do Polipirrol

O polipirrol (PPI) foi sintetizado conforme o método proposto por Yang e Liu [27], sendo realizado em reator de 2 L de capacidade, com agitação e resfriamento controlados. Para a reação de polimerização é utilizado como oxidante uma solução aquosa de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (persulfato de amônio – PSA) 0,4 M. Desta forma, foi adicionado 0,03 M de pirrol em água e agitado. Em seguida, a mistura foi resfriada a -1°C e, após, o agente oxidante foi adicionado lentamente. A reação prosseguiu por 10 horas a -1°C a fim de que todos os reagentes fossem consumidos e que seja formada a microestrutura desejada.

A síntese do PPI com poliestireno sulfonado (PSS) foi realizada pelo mesmo método, seguindo para todas as sínteses as mesmas relações de monômero e oxidante, porém adicionando-se o poliânion como agente dopante nas concentrações de 1, 10 e 20% em peso de monômero de pirrol. O PSS foi adicionado na água destilada junto com o monômero e deixado sob agitação e resfriamento, após a reação seguiu da mesma forma que para o PPI puro.

As quatro amostras de polímeros obtidos apresentaram pH ácido, próximo de 1. As amostras foram filtradas em papel filtro e posteriormente lavadas com água destilada para a retirada de impurezas resultantes da síntese. As amostras foram diluídas novamente em água destilada e, então, dispersas em ultrassom de alta energia da Sonics/Vibracell modelo VCX 750. Foi então retirada uma alíquota a qual teve seu pH ajustado para 5 com NaOH 4 M.

Todas as amostras obtidas, com pH 1 e 5, tiveram uma alíquota separada, a qual foi filtrada em papel filtro e seca em estufa a 60°C .

4.3 Caracterização do Polipirrol

As amostras obtidas foram caracterizadas quanto à morfologia apresentada (a ocorrência ou não da formação de nanoestruturas), a variação da condutividade (com a adição do poliestireno sulfonado e a alteração do pH), a espectroscopia de infravermelho (para verificação se o polipirrol está dopado) e a eletroatividade.

4.3.1 Morfologia

A morfologia e a estrutura do PPI dependem do método de síntese empregado e nas condições de processamento utilizadas, pois estas favorecem na obtenção de polímeros na forma convencional ou de nanoestruturas. Existem várias técnicas de microscopia para o estudo de estruturas finas e morfologia de materiais. Entre estas são destacadas a microscopia eletrônica de varredura, a microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia óptica.

A microscopia óptica (MO) utiliza luz para formação da imagem, enquanto que os microscópios eletrônicos (ME) utilizam elétrons. Outra diferença é a resolução com que se deseja obter a amostra. Desta forma, o tamanho da estrutura a ser analisada determina o tipo de instrumento a ser utilizado. Os MO's garantem a visualização de detalhes em escala micrométrica, enquanto que os ME's permitem a visualização de detalhes em escala nanométrica [63]. Os polímeros foram caracterizados por microscopia eletrônica de transmissão, enquanto que a superfície das tiras de teste rápido foram observadas por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura.

4.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das amostras e visualização da formação de nanoestruturas foi examinada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) em microscópio modelo JEOL JEM 1200, sendo com as amostras dispersadas em água e depositadas em grades, *grids*, de cobre com filme de carbono.

4.3.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica foi medida utilizando o método padrão das quatro pontas o qual é baseado na aplicação de corrente elétrica nos terminais externos, e a voltagem medida entre os terminais internos, conforme pode ser visualizado na

Figura 29. As medidas foram realizadas em equipamento Cascade Microtech CS 4-64, associado a uma fonte Keithley 227 e a um nanovoltímetro Keithley 2182A.

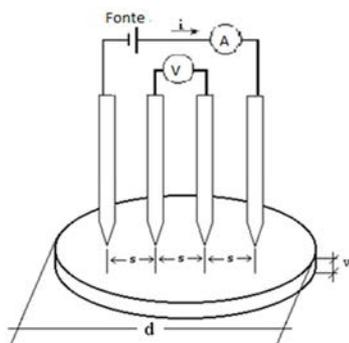


Figura 29: Modelo de medida de condutividade em pastilha cilíndrica.

Para o cálculo das medidas de condutividade, as equações utilizadas diferem conforme o formato das amostras, além disso, são utilizados fatores de correção que também estão relacionados ao formato e arranjo das mesmas. As amostras utilizadas são pastilhas circulares de dimensões laterais finitas, sendo definida a equação da resistividade para estas conforme Giroto e Santos [64], para $w \cong s$ e $w > s$:

$$\rho = \frac{V}{i} \cdot w \cdot F_2 \cdot F_4 \quad (3)$$

Onde: ρ = resistividade, V = voltagem medida nas pontas internas, i = corrente medida nas pontas externas, w = espessura da pastilha, s = distância entre as pontas e F_2 e F_4 = parâmetros de correção determinados de acordo com o diâmetro e espessura da amostra.

Desta forma, pode ser determinada a condutividade elétrica dos polímeros, pois a mesma é definida como o inverso da resistividade elétrica [64]:

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (4)$$

Onde: σ = condutividade elétrica.

4.3.3 Espectroscopia de Infravermelho

O ensaio de espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) estuda a transição das vibrações normais moleculares que podem ser do tipo estiramento de ligação, deformação angular e torção [63]. Desta forma, é utilizado para caracterização de polímeros convencionais e condutores, onde podem ser obtidas informações referentes ao estado de oxidação do polipirrol e a interação entre o agente dopante e a cadeia polimérica.

As análises de FT-IR foram realizadas em um espectrômetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum 1000, através de pastilhas de KBr com o pó dos polímeros.

4.3.4 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é frequentemente utilizada em conjunto com o método de quatro pontas para caracterizar as propriedades redox de um material. Porém, a voltametria cíclica não pode ser usada para medir quantitativamente a condutividade como o método de quatro pontas, ela pode ser utilizada para avaliar se um material é condutor e fornecer informações sobre a estabilidade da eletroatividade bem como do potencial de oxidação/redução e da reversibilidade do material [11].

A técnica de voltametria cíclica consiste na aplicação de uma rampa de potenciais a um eletrodo de trabalho. O potencial é variado continuamente com o tempo e registra a ocorrência de reações de oxidação e redução de espécies eletroativas no conjunto solução, substrato e filme. A variação nas respostas das espécies eletroativas entre um eletrodo de trabalho (ET) e um contra eletrodo (CE) produz uma variação na corrente, a qual pode ser medida em função do potencial aplicado, construindo assim o voltamograma cíclico [65].

Como pode ser visualizado na Figura 30, o potencial aplicado varia linearmente a partir de um potencial inicial (E_i), a uma velocidade de varredura constante (v), até um potencial máximo estabelecido (E_{max}), revertendo o sentido e atingindo um potencial mínimo ou potencial inicial para fechar o ciclo. A resposta eletroquímica obtida pode ser em potenciais positivos e negativos, em curvas

anódicas e catódicas, porém ela fornece a região onde ocorrem as reações de oxidação e a redução dos filmes poliméricos com as características intrínsecas destes materiais [66].

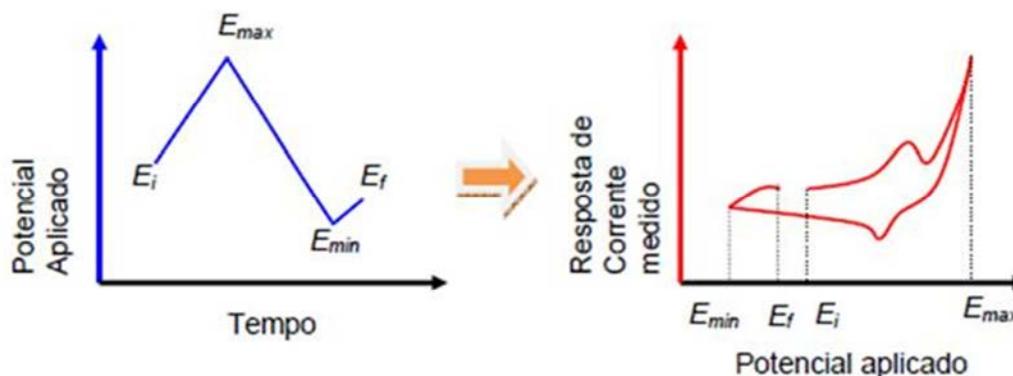


Figura 30: Gráficos apresentando exemplo de potencial aplicado pela técnica de voltametria cíclica e a resposta de corrente obtida [66].

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em um potenciostato Autolab PGSTAT 302, com utilização do software GPES. As medidas foram feitas em uma célula com três eletrodos sendo o eletrodo de trabalho uma rede de Pt, contendo a amostra polimérica na forma de pó, a qual foi envolvida em papel filtro para evitar que o pó se desprendesse da rede prejudicando o contato elétrico, o contra eletrodo um fio de platina e o eletrodo de referência de Calomelano saturado (ECS). A eletroatividade dos polímeros foi testada em dois eletrólitos, solução tampão de fosfato salino (PBS) pH = 7,2 e cloreto de potássio (KCl) 1M com pH = 5, escolhidos para avaliar a influência do meio na eletroatividade dos polímeros. A velocidade de varredura testada foi de 50 mV/s e o ciclo teve como potencial inicial e final -0,9 V e potencial máximo -0,2V.

4.4 Preparação do Biossensor e Confecção das Tiras de Teste Rápido

As tiras de teste rápido foram produzidas pela técnica de *silk-screen*, sobre folha de PVC. O desenho esquemático do biossensor foi impresso na tela de poliéster com armação de madeira, a qual foi utilizada como molde de serigrafia do

sensor. A tela possibilita a produção de 12 tiras em cada aplicação da pasta de carbono (Figura 31). As tiras são então deixadas para secar e, após, é aplicada na extremidade da trilha correspondente ao eletrodo de referência a pasta de Ag/AgCl. As tiras são separadas uma a uma para poderem ser utilizadas como sensores, e ser aplicados o polímero e a enzima.

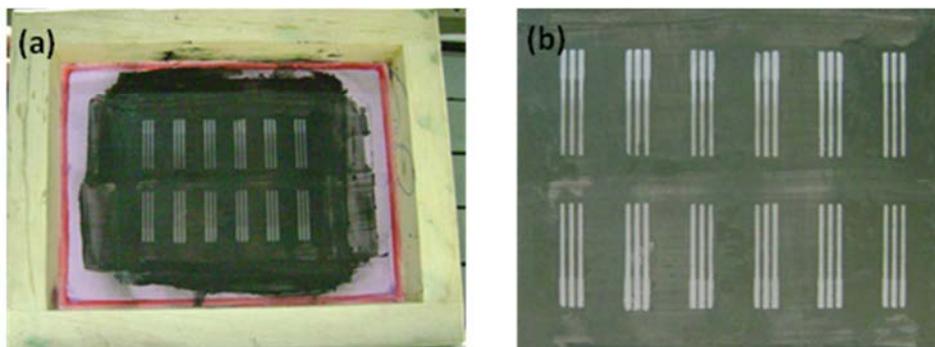


Figura 31: Tela de serigrafia utilizada para produção das tiras com tinta de carbono. a) Tela inteira, b) Detalhe do desenho dos 12 eletrodos na tela.

Foi aplicada uma amostra de polímero sobre a pasta de carbono no eletrodo de trabalho, a fim de verificar a cobertura deste sobre a trilha. O eletrodo de trabalho foi produzido com a aplicação de 5 μL de cada amostra polimérica com $\text{pH} = 5$, pois essas serão as amostras poliméricas utilizadas para a imobilização da enzima que perde sua atividade enzimática em pH ácidos como 1. As tiras foram secas em estufa a 37°C por 30 minutos.

4.5 Caracterização das Tiras de Teste Rápido

As amostras foram caracterizadas quanto: à cobertura da película polimérica por microscopia óptica, verificação da eletroatividade e estrutura formada sobre o sensor por microscopia eletrônica de varredura.

4.5.1 Morfologia

4.5.1.1 Microscopia Óptica

A função da microscopia óptica é produzir uma imagem ampliada da amostra que contém a informação estrutural pretendida a qual não é percebida pelo olho humano. A resolução máxima do microscópio óptico é cerca de 0,1 μm , sendo possível observar a superfície dos filmes formado nas tiras, visualizando as trilhas de pasta de carbono e a cobertura do eletrodo de trabalho com o polímero condutor. As imagens foram obtidas em microscópio óptico trinocular Axio Scope A1 com luz refletida.

4.5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As mesmas tiras observadas no microscópio óptico foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, buscando a visualização da morfologia presente na superfície do eletrodo. A superfície das amostras foi examinada em um microscópio JEOL JSM-6060 onde a voltagem utilizada foi de 10 kV. As amostras antes da análise foram metalizadas em ouro.

4.5.2 Voltametria Cíclica

A eletroatividade das tiras foi analisada no mesmo potenciostato utilizado para a realização da voltametria cíclica do polímero, potenciostato Autolab PGSTAT 302, com utilização do software GPES. Neste caso a tira foi ligada em um cabo USB, onde a distância de cada trilha presente na tira correspondia a distância dos contatos elétricos do cabo. Um dos contatos não foi utilizado, visto que os cabos USB apresentam quatro contatos elétricos no seu interior (Figura 32). Os contatos correspondentes a cada eletrodo da tira foram então ligados no potenciostato.

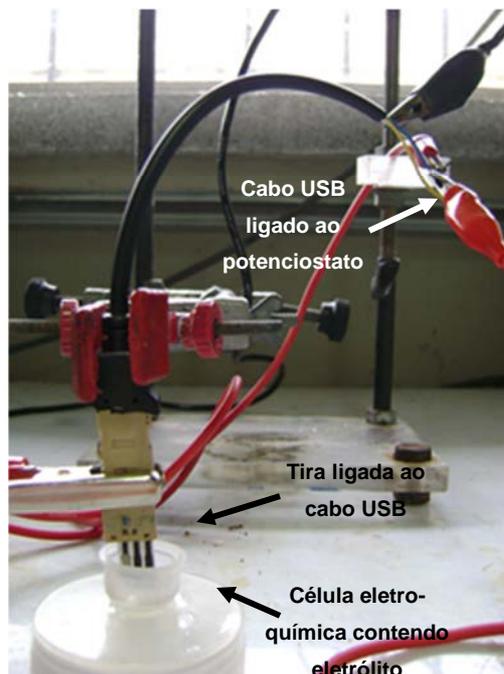


Figura 32: Aparato montado para realização de voltametria cíclica nas tiras.

Neste caso, o eletrodo de trabalho apresentava o polímero condutor, o eletrodo de referência era composto pela pasta de Ag/AgCl e o contra eletrodo de pasta de carbono. Como anteriormente já descrito, a eletroatividade das tiras foi testada também em dois eletrólitos, solução de PBS pH = 7,2 e KCl 1M com pH = 5. A velocidade de varredura testada foi de 50 mV/s e o ciclo teve como potencial inicial e final -0,9 V e potencial máximo -0,2V. Foi ainda comparada a eletroatividade da tira produzida sem a presença do polímero condutor, com uma tira comercial também sem o polímero condutor.

4.6 Imobilização da Enzima e Aplicação nas Tiras de Teste Rápido

Os estudos de imobilização da enzima foram realizados na empresa FK Biotecnologia, a qual forneceu o material necessário para a realização destes.

Para a imobilização da enzima HRP foram escolhidas três amostras poliméricas (PPi e PPi dopado com PSS nas concentrações de 1 e 20%) todas com pH 5. A enzima foi misturada diretamente em água de osmose reversa em concentrações pré-definidas. A partir de estudos preliminares, a imobilização da

HRP foi realizada pela mistura da solução de enzima diretamente na solução de polímero na proporção de 1:4. Depois de preparadas as soluções, 5 µL da mistura de polímero condutor e HRP foram aplicados nas trilhas correspondentes ao eletrodo de trabalho das tiras. As tiras foram secas em estufa a 37°C por 30 minutos. A imobilização da enzima foi verificada através de medidas de absorvância por teste colorimétrico pelo leitor de ELISA marca Thermo Plate, modelo: TP-Reader. O equipamento utilizado mede valores de absorvância até 3,5, os quais são interpretados como valores de saturação, pois a absorvância apenas é condizente com valores até 1, que representam o valor mínimo de transmitância. Os valores de absorvância são medidos em comprimentos de onda de 570nm.

Para a leitura da absorvância foi preparada uma solução padrão estabelecida pela empresa FK Biotecnologia, a qual é composta por 10% de TMB como agente colorimétrico revelador, 90% de diluente de TMB e 0,3% de H₂O₂ como substrato. Essa solução foi colocada em microplaca e as tiras foram colocadas uma a uma em cada um dos poços, permanecendo em reação por 15 minutos para alteração na coloração. Após, as tiras foram retiradas da microplaca e foi injetado solução de H₂SO₄ para encerrar a reação. A placa foi então colocada no leitor de ELISA, onde foi medida a absorvância de cada poço.

ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) é um ensaio imunoenzimático que permite a detecção de substratos específicos. O método utiliza uma placa de superfície inerte com poços onde são depositados os substratos de interesse juntamente com uma solução reveladora e com um diluente específico. Em seguida são adicionadas as amostras e através da reação do substrato catalisado com a enzima é produzida uma coloração. A intensidade da cor é medida através de valores de absorvância [67].

4.6.1 Estudo da Concentração Mínima de Enzima na Tira

O estudo da concentração de enzima foi realizado com objetivo da quantificação mínima de HRP que deve ser aplicada no sensor para realizar a produção das tiras e os ensaios de sensibilidade. A partir de testes preliminares foram escolhidas cinco concentrações de HRP para serem imobilizadas nos

polímeros: 50, 100, 250, 500 e 1000 UI/mL. Para cada uma das concentrações foi preparada uma solução de enzima a qual foi misturada no polímero na proporção anteriormente apresentada. Foram feitas tiras contendo apenas polímero, sem enzima, representando o branco do estudo. Todas as tiras preparadas foram secas, colocadas para reagir em microplaca por 15 minutos e após foi lida a absorbância pelo leitor de ELISA.

Foram ainda preparadas tiras com HRP livre, sem polímero condutor, nas mesmas concentrações, ao nível de comparação da atividade da enzima quando livre e quando imobilizada.

4.6.2 Estudo da Imobilização da HRP

A realização do estudo da imobilização da enzima visa uma aproximação do método de imobilização. Para a realização deste estudo foram imobilizadas as enzimas no polímero nas cinco concentrações estudadas para a determinação da concentração ótima. Foram feitas tiras contendo apenas polímero, sem enzima, representando o branco do estudo. Após as tiras foram secas e lavadas em três soluções diferentes, cada uma com um grau de severidade de remoção: PBS para fazer a retirada das enzimas depositadas na superfície da tira, PBS TWEEN para remover as enzimas depositadas entre os aglomerados poliméricos da matriz polimérica, e SDS para romper as ligações fracas realizadas entre polímero e enzima.

Depois de lavadas as tiras foram colocadas em microplaca para reação com H_2O_2 por 15 minutos e, então, retiradas para que a reação pudesse ser encerrada com H_2SO_4 . Neste estudo ao obter-se menores leituras de absorbância, tem-se que mais moléculas de enzima foram removidas pela lavagem.

4.6.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

Com a realização da imobilização da enzima, pode ser estudada a influência de concentrações variadas de H_2O_2 para avaliar o nível de detecção das tiras pela

medida de resposta ao sinal colorimétrico, e assim comparar com os resultados obtidos pela cronoamperometria. Para a realização deste estudo foram testadas cinco concentrações de H_2O_2 (0,002; 0,005; 0,01; 0,02 e 0,04 mmol). Os valores de concentração de substrato estudados foram escolhidos em função do método ELISA adotado na empresa FK Biotecnologia, que sugere 0,3% de H_2O_2 , desta forma foram escolhidos dois pontos acima e dois pontos abaixo a fim de detectar pequenas quantidades de substrato, assim como maiores concentrações e, ainda, avaliar se a concentração de peróxido influencia na atividade da HRP.

Para a realização deste estudo as tiras foram preparadas com as concentrações de HRP anteriormente estudadas e foram secas na estufa. Foram feitas tiras contendo apenas polímero, sem enzima, representando o branco do estudo. Após foram preparadas as soluções de peróxido, respeitando a mesma proporção inicial de 10% de TMB como agente colorimétrico revelador, 90% de diluente de TMB e variando apenas a concentração de H_2O_2 em 0,075; 0,15; 0,3; 0,6 e 1,2% como substrato. As soluções preparadas foram injetadas em microplacas onde foram colocadas as tiras para reagirem por 15 minutos, após as mesmas foram retiradas e foi encerrada a reação para realização da leitura das absorbâncias. Neste estudo, acreditasse que maiores concentrações H_2O_2 produzirão maiores sinais colorimétricos.

4.6.4 Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio

A sensibilidade das tiras frente ao H_2O_2 foi avaliada por cronoamperometria. A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica investigada em célula com três eletrodos que consiste na aplicação de um potencial fixo entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo, ao longo de um tempo t , sendo medida a resposta da corrente em função do tempo em forma de processo faradaico. A resposta de corrente obtida é limitada pela difusão das espécies em solução e na interface eletrodo/solução [66].

Atualmente a cronoamperometria é utilizada para análise de perturbação de grau, os quais são ocasionados por injeção de substâncias na célula eletroquímica. Desta forma, a curva da corrente reflete as mudanças ocorridas no gradiente de concentração nas proximidades da superfície por pulsos em intervalos

de tempo, quando a corrente chega a um limite e depois decai com o tempo até uma nova perturbação do sistema [53].

Os testes de sensibilidade das tiras foram realizadas no potenciostato utilizado para voltametria cíclica, potenciostato Autolab PGSTAT 302, com utilização do software GPES, sendo o eletrodo de trabalho, a trilha de carbono com aplicação de HRP imobilizada no polímero condutor, o contra eletrodo de pasta de carbono e o eletrodo de referência de Ag/AgCl. O potencial fixo aplicado foi obtido por estudos preliminares de voltametria cíclica, observando-se intervalos onde não ocorrem picos de oxidação e redução do polipirrol, este foi estabelecido em -0,25 V.

O teste foi realizado pela aplicação do potencial constante na amostra, esta foi então deixada para estabilizar no sistema por 450 s. Após foram realizadas 10 perturbações no sistema pela adição de 10 μL de H_2O_2 em cada uma delas e medidas as respostas de corrente obtidas. Depois de realizada a primeira adição e obtido o pico de corrente, foi esperado a redução desta até um nível estável caracterizando a verdadeira perturbação do sistema para poder ser realizada a próxima adição. O meio utilizado na célula eletroquímica foi solução de PBS pH = 7,2 pois se caracteriza como um meio adequado para a enzima, não prejudicando a sua atividade.

Foi ainda determinado o tempo de resposta do sensor que corresponde ao tempo até atingir o pico de corrente e esta começar a decair.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Polipirrol e Polipirrol dopado com Poliestireno Sulfonado

As amostras de polímeros obtidos foram nomeadas conforme a mistura polimérica realizada na síntese e o percentual de agente dopante, no caso PSS adicionado, como pode ser visualizado na Tabela 5:

Tabela 5: Nomenclatura das amostras obtidas.

Polímero Condutor	Percentual de PSS (%)	Nomenclatura
Polipirrol	-	PPi
Polipirrol	1	PPi + PSS 1%
Polipirrol	10	PPi + PSS 10%
Polipirrol	20	PPi + PSS 20%

Todas as amostras foram obtidas em pH 1. Após serem lavadas e dispersas em ultrassom, uma alíquota foi retirada para ter seu pH corrigido para 5. Na Figura 33 podem ser visualizadas as amostras antes (Figura 33a) e depois (Figura 33b) da lavagem e dispersão.

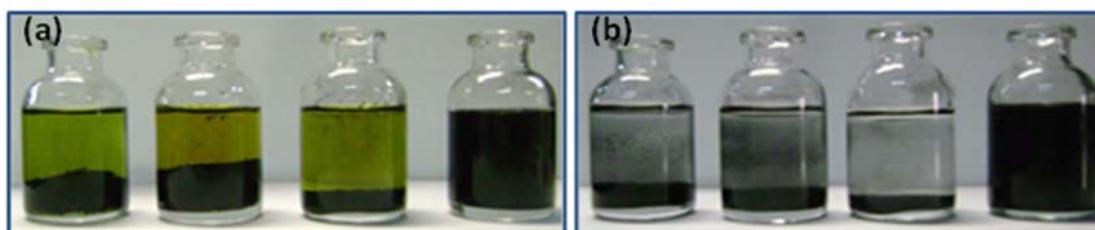


Figura 33: Amostras PPi, PPi + PSS 1%, PPi + PSS 10% e PPi + PSS 20%, a) Polímeros em solução após a síntese; b) Polímeros em solução após lavagem e dispersão para correção do pH para 5.

Pode-se perceber que ocorreu a formação de polipirrol oxidado nas 4 amostras, devido à obtenção de um pó preto insolúvel. Após as lavagens das amostras e a dispersão em ultrassom, consegue-se visualizar que o polímero ficou mais fino, não estando suas partículas tão aglomeradas quanto antes da dispersão. O PSS não influenciou na síntese do PPI, porém a adição do mesmo intervém na dispersão das nanopartículas sintetizadas. Para a solução PPI – PSS 1% algumas partículas permaneceram dispersas, enquanto que a grande maioria precipita. Já na solução de PPI – PSS 20% as partículas ficaram dispersas por toda a solução o que favorece na aplicação das soluções sobre as trilhas de carbono.

5.2 Caracterização dos Polímeros Condutores

A caracterização dos polímeros condutores é de fundamental importância, pois se consegue verificar a formação da morfologia do polímero bem como a condutividade e eletroatividade deste. Essencial para a aplicação destes polímeros no biossensor.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras analisadas por MET foram as que tiveram seu pH corrigido para 5, pois essas são as amostras empregadas nas tiras. A correção do pH foi realizada nas soluções poliméricas depois das mesmas serem lavadas e dispersas, com a adição de gotas de NaOH 4M e leve agitação, assim, acredita-se que não houve alteração na morfologia do polímero.

Pelas imagens obtidas no MET (Figura 34), pode-se perceber a formação de nanopartículas em todas as amostras, estando aglomeradas na solução.

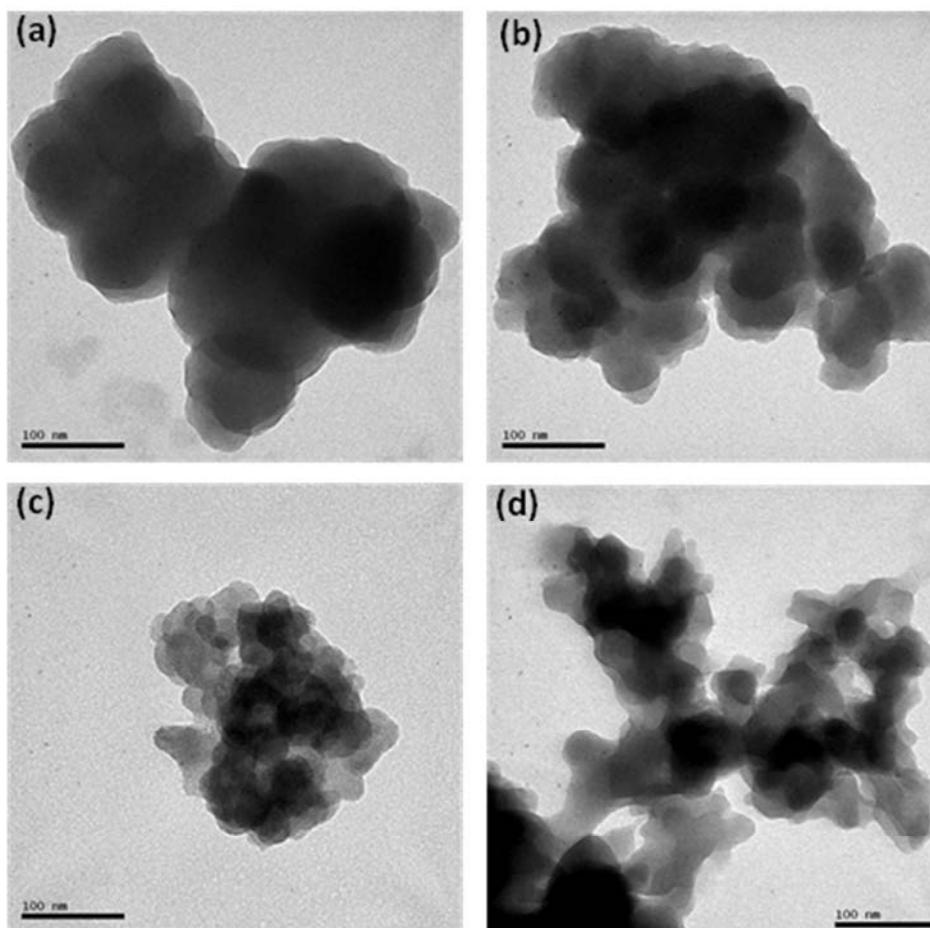


Figura 34: Imagens obtidas por MET para: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.

Para a amostra de PPI (Figura 34 (a)), as nanopartículas apresentam tamanhos variados, sendo a sua grande maioria com cerca de 100 nm, algumas maiores e outras poucas menores. A amostra de PPI + PSS 1% (Figura 34 (b)) apresenta nanopartículas um pouco menores, com diâmetros variando em 100 nm, com algumas poucas maiores mas na sua maioria menores. Já para a amostra de PPI + PSS 10% (Figura 34 (c)) as nanopartículas formadas apresentam tamanhos bem menores do que 100 nm, estando bem aglomeradas umas sobre as outras. Para a amostra de PPI + PSS 20% (Figura 34 (d)) as nanopartículas apresentam diâmetros com cerca de 50 nm, estando aglomeradas e unidas em toda a solução. Acredita-se que o PSS auxilia na formação de nanopartículas cada vez menores, aglomeradas umas nas outras, mas dispersas na solução. Com o aumento da concentração de PSS durante a síntese, o polímero formado apresentou-se mais

fino que para a amostra de PPI, dificultando inclusive a filtração do pó polimérico formado. Esse fato pode ser comprovado pelas imagens do MET, visto que as nanopartículas para a maior concentração de PSS são as de menor diâmetro. Estes fatos já haviam sido descritos por Yang e Liu [27], quando adicionaram um poliânion em diferentes concentrações na síntese química do polipirrol.

5.2.2 Condutividade Elétrica

A condutividade é a medida da capacidade que um material tem de conduzir corrente elétrica. Para os PIC's ela depende da condutividade intercadeias, intracadeias e interfibras. Ao adicionarmos polímeros convencionais aos polímeros condutores ocorre a redução dos valores de condutividade quando comparadas à condutividade do polímero puro, pois a condutividade intercadeias e interfibras fica prejudicada pela presença da matriz isolante entre as moléculas do polímero condutor [11,68,69].

A condutividade elétrica dos polímeros condutores torna importante o seu uso como transdutores em biossensores, pois os mesmos possuem a capacidade de interpretar as mudanças ocorridas na reação do substrato e através do transporte de elétrons produzirem um sinal elétrico. A Tabela 6 apresenta os valores de condutividade elétrica para as amostras em pH 1 e pH 5.

Os valores de condutividade elétrica para as amostras poliméricas evidenciam o fato de que a adição de um poliânion durante a síntese diminui a condutividade do polímero condutor. Pode ser verificado que o PPI sem a adição de PSS apresentou valores mais baixos quando comparados com o PPI com pequenas adição de PSS, como o PPI + PSS 1%. Este fato pode ter ocorrido devido ao uso de um agente oxidante, PSA, com carga 2-, o qual não é o mais favorável para oxidação do PPI. A condutividade aumentou para as amostras com PSS, pois este agiu como um agente dopante mais favorável em concentrações mais baixas. Em concentrações mais elevadas de PSS, como 20%, o poliânion já está influenciando na condutividade do PPI atuando como um material isolante no meio.

Tabela 6: Medidas de Condutividade para as amostras poliméricas

Amostra	Condutividade (S/cm)
PPi pH 1	$1,1 \times 10^{-2}$
PPi pH 5	$2,2 \times 10^{-2}$
PPi + PSS 1% pH 1	58×10^{-2}
PPi + PSS 1% pH 5	$0,8 \times 10^{-2}$
PPi + PSS 10% pH 1	$3,2 \times 10^{-2}$
PPi + PSS 10% pH 5	$0,7 \times 10^{-2}$
PPi + PSS 20% pH 1	$0,4 \times 10^{-2}$
PPi + PSS 20% pH 5	$0,3 \times 10^{-2}$

Observa-se ainda que para as amostras com alteração do meio para pH= 5 a condutividade diminuiu. Ansari [70] relata que o PPi quando sofre um tratamento com solução de NaOH a sua condutividade decai devido a estabilização dos portadores de carga, ocorrendo um processo de desprotonação em solução aquosa provocando uma profunda mudança na estrutura eletrônica e uma baixa condutividade.

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho

As análises de infravermelho foram realizadas para as amostras de pH= 1 e pH= 5 para verificação da alteração do estado de oxidação do polímero quando este se encontra em meio menos ácido. A análise foi realizada em um comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , porém apenas será apresentado o intervalo de comprimento de onda onde ocorrem as bandas características dos polímeros estudados. Nas Figuras 35 e 36 estão apresentados os espectros para as amostras de pH 1 e pH 5 respectivamente.

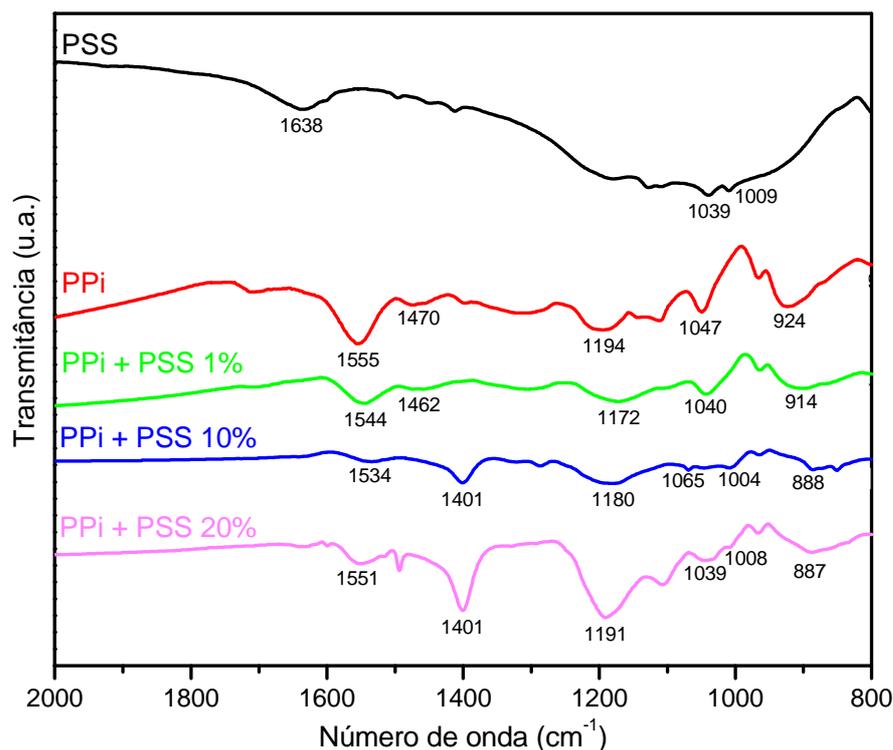


Figura 35: Espectroscopia de Infravermelho para PSS, PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em pH 1.

Para o espectro do PSS foi observada uma banda extensa, a qual apresenta duas bandas reduzidas em 1039 e 1009 cm^{-1} as quais são atribuídas às vibrações de alongamento simétricas e ao estiramento assimétricos dos grupos SO_3^- presentes no poliestireno sulfonado [32,71]. Acredita-se que a banda apresentou-se com essa extensão devido à alta massa molar do PSS, mascarando a verdadeira intensidade das bandas e não apresentando as mesmas de forma clara.

O espectro do PPI apresentou uma banda intensa em 1555 cm^{-1} e uma banda reduzida em 1470 cm^{-1} que são características da formação do polipirrol e podem ser atribuídas às vibrações de estiramento do anel do pirrol. Em 1194 e 924 cm^{-1} apresentam-se duas bandas referentes às vibrações de estiramento correspondentes ao polipirrol dopado, ou seja, oxidado. Em 1047 cm^{-1} aparece uma banda devido ao alongamento das ligações C – N. Todos esses resultados obtidos para as amostras com morfologia de nanopartículas demonstram praticamente as mesmas posições das principais bandas do infravermelho associadas com a estrutura do PPI [25,27].

As amostras de PPI contendo PSS apresentam as mesmas bandas características do PPI, porém a banda correspondente ao estiramento do anel do

pirrol (em 1470 cm^{-1} no caso do PPI) nas amostras de PPI + PSS 10% e PPI + PSS 20% apresentaram-se deslocadas em 1401 cm^{-1} . Com o aumento do PSS na amostra, a banda que representa o alongamento das ligações C – N começa a perder a sua intensidade dando lugar as bandas características do PSS. Na amostra de PPI + PSS 1% consegue-se perceber apenas a intensidade diminuída da banda C – N, porém na amostra de PPI + PSS 10% aparecem duas bandas reduzidas em 1065 e 1004 cm^{-1} , representando as bandas do PSS, e conseqüentemente a dopagem do PPI. Para a amostra de PPI + PSS 20%, as bandas representativas do PSS aparecem de forma mais intensa em 1039 e 1008 cm^{-1} , mostrando assim que a quantidade de PSS incorporada na amostra aumentou.

O espectro das amostras com pH 5 (Figura 36) apresenta todos os picos característicos do PPI, assim como para as amostras de PPI dopado com PSS. A diferença entre os dois espectros pode ser encontrada nas bandas correspondentes ao PPI dopado. As bandas em 900 cm^{-1} para o PPI + PSS 1%, 912 cm^{-1} para o PPI + PSS 10% e 906 cm^{-1} para o PPI + PSS 20% apresentam uma redução na intensidade quando comparadas com as amostras com pH 1, mostrando uma leve redução da eletroatividade dos polímeros devido ao pH próximo do neutro.

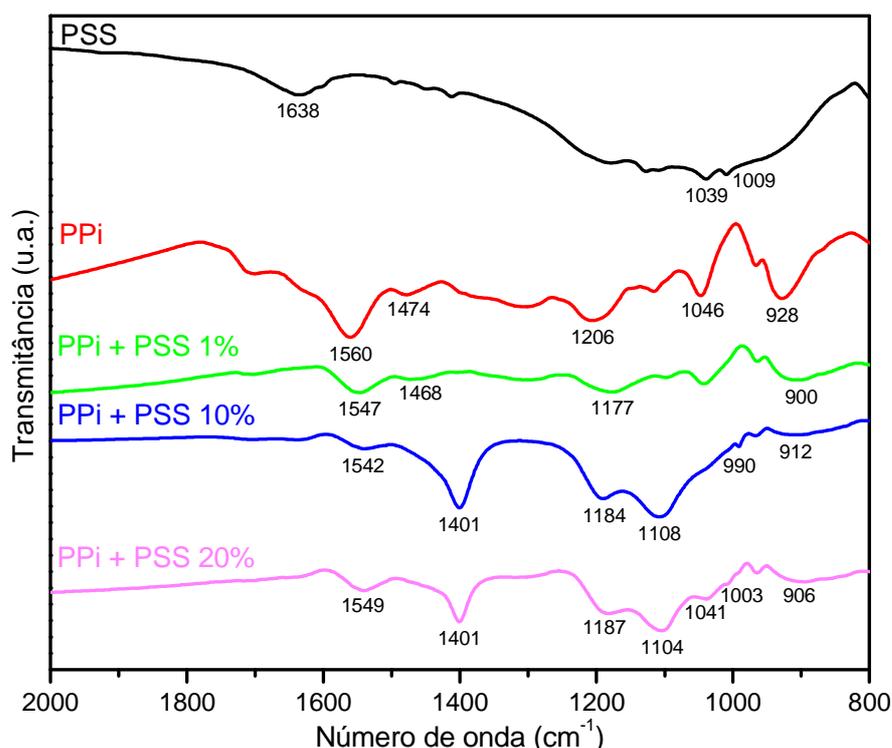


Figura 36: Espectroscopia de Infravermelho para PSS, PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20 % em pH 5.

5.2.4 Voltametria Cíclica

O estudo de voltametria cíclica foi realizado em intervalos de potenciais negativos em dois eletrólitos: KCl 1M e PBS, a fim de verificar o comportamento eletroquímico do polímero com pH= 1 e pH= 5.

Os voltamogramas obtidos para o PPI e PPI + PSS em KCl e PBS são mostrados nas Figuras 37 e 38. A oxidação do polipirrol ocorre pela incorporação de ânions no polímero e na redução a eletroneutralidade é mantida pela expulsão desses ânions ou incorporação de cátions [70,72].

As voltametrias cíclicas obtidas com o eletrólito KCl (Figura 37) assemelham-se para as amostras poliméricas em pH= 1 e pH= 5, onde podem ser visualizados nos ciclos dois picos (um anódico e um catódico), indicando as reações de oxidação e redução do PPI e PPI + PSS. Portanto, observa-se que quando um potencial suficientemente negativo é aplicado, os ânions são expulsos desdopando o polímero, e ao inverter esse potencial para valores perto do positivo ocorre oxidação e a dopagem da amostra pela incorporação de ânions a estrutura do polímero [70,73].

No voltamograma representado pela Figura 37 (a), percebe-se que com o aumento do teor de PSS na amostra os picos anódicos e catódicos ficam mais definidos, o que pode novamente ser atribuído ao fato de que o PSS caracteriza-se como um agente dopante mais efetivo para o PPI do que o PSA. Além disso, o PSS caracteriza-se como um dopante de massa molar elevada, o qual fica incorporado na cadeia polimérica não sendo liberado nem durante a redução eletroquímica. Em consequência ocorre um aumento da estabilidade da amostra [70]. Os picos observados certamente são devidos ao movimento de incorporação e expulsão do Cl⁻ do meio para a cadeia polimérica [74].

Na Figura 37 (b), podem ser observados os ciclos representativos do PPI e PPI dopado com PSS com pH 5 em KCl. O mesmo comportamento descrito anteriormente pode ser observado para essas amostras, porém nesse caso ocorre uma redução na intensidade dos picos e, conseqüentemente, da eletroatividade, devido ao aumento do pH do meio onde foram realizados os ensaios.

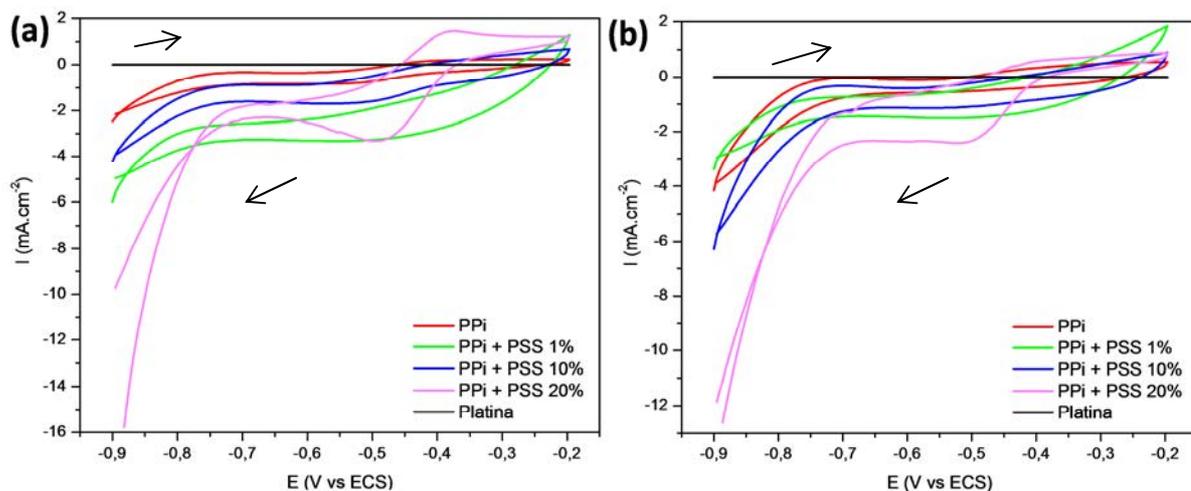


Figura 37: Voltamogramas cíclicos do PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em KCl 1 M com a) pH 1 e b) pH 5.

Na Figura 38 podem ser observados os voltamogramas obtidos para as amostras poliméricas em PBS com pH=1 e pH=5. Percebe-se que apesar do meio não ser o mais adequado para medir a eletroatividade do PPI, os dados obtidos mostraram-se bastante satisfatórios. Todas as amostras da Figura 38 (a) e (b), apresentaram os picos de oxidação e redução do polímero de forma menos clara, que no meio KCl, e o PSS não influenciou de forma significativa na eletroatividade do PPI como para as voltametrias em KCl. Os menores valores de corrente (I) obtidos indicam uma menor atividade dos polímeros em solução de PBS, cujo ânion predominante é o PO_4^{-3} e HPO_4^{-2} .

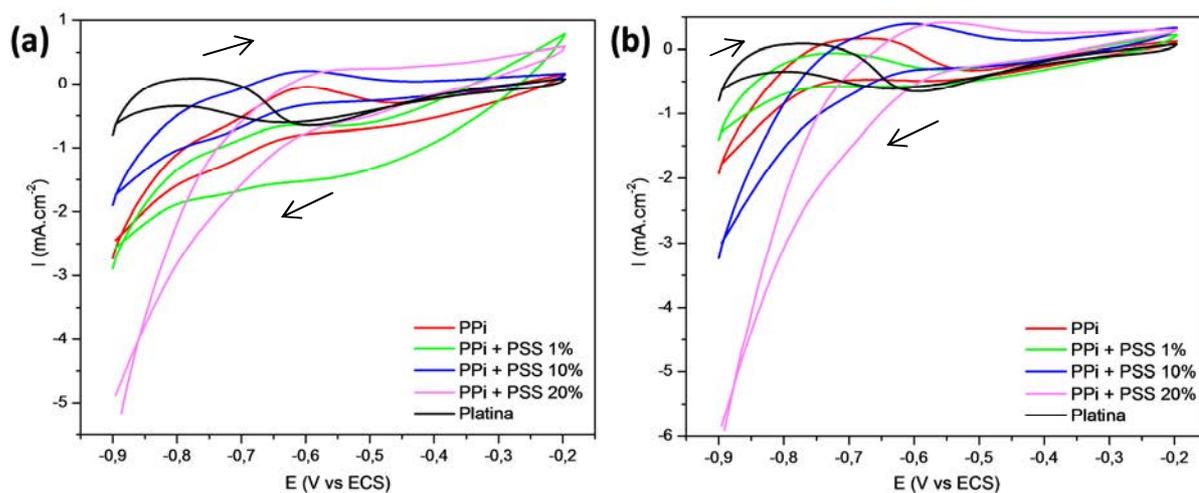


Figura 38: Voltamogramas cíclicos do PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% em PBS com a) pH 1 e b) pH 5.

5.3 Tiras de Teste Rápido

As tiras foram produzidas pela técnica de *silk-screen* com pasta de carbono e pasta de Ag/AgCl como eletrodo de referência. Depois de serigrafadas na folha de PVC com a pasta de carbono, as tiras foram deixadas para secar para então ser aplicada a pasta de Ag/AgCl sobre o eletrodo de referência. As tiras foram então recortadas e separadas para seguir para análise. Na Figura 39 pode ser visualizada a tira contendo apenas a pasta de carbono (Figura 39 (a)) e a tira pronta (Figura 39 (b)). Para comparação é apresentada um tira comercial (Figura 39 (c)) de estrutura similar.

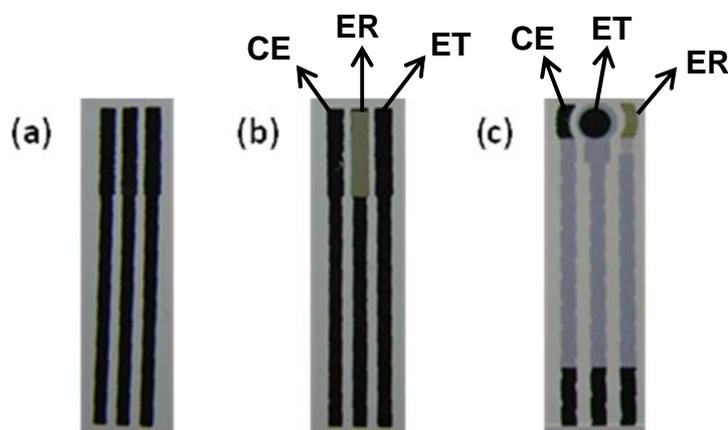


Figura 39: Tiras para teste rápido: a) produzida estando apenas com eletrodos pintados; b) produzida estando com eletrodo de referência pintado e c) tira comercial.

Depois que a tira foi produzida, as amostras poliméricas foram aplicadas sobre o eletrodo de trabalho. O polímero e a tira foram caracterizados quanto a sua morfologia e eletroatividade.

5.4 Caracterização das Tiras de Teste Rápido

A caracterização da tira foi realizada para verificação da utilização desta como biossensor. Foi ainda realizada a comparação da tira produzida com uma tira comercial.

5.4.1 Morfologia

5.4.1.1 Microscopia Óptica

As tiras para teste rápido foram observadas em microscópio óptico e comparadas com a trilha de pasta de carbono do sensor comercial. As imagens obtidas para as duas tiras podem ser visualizadas na Figura 40.

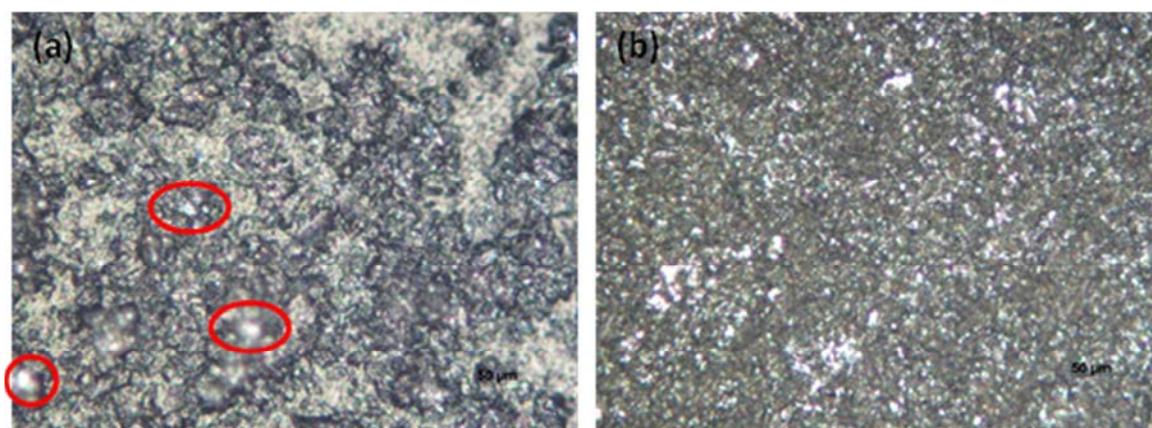


Figura 40: Superfície de carbono das tiras de teste rápido: a) produzida e b) comercial.

Pode-se verificar que a tira produzida apresenta alguns pequenos defeitos em sua superfície, como buracos sem pasta, os quais estão marcados na imagem da Figura 40 (a). Esses defeitos podem atrapalhar no envio do sinal elétrico. O restante da superfície é homogênea e aparentemente apresenta desníveis os quais não são visualizados na superfície do sensor comercial.

As imagens obtidas pelo microscópio óptico para as tiras com polímeros estão apresentadas na Figura 41. Pode-se perceber que os polímeros estão presentes em toda a superfície da tira, formando aglomerados, e cobrindo alguns pontos de forma mais efetiva que outros. O melhor recobrimento foi alcançado com amostra PPI (Figura 41 (a)), onde pequenos e poucos pontos da pasta de carbono aparecem. Já para as amostra de PPI dopado com PSS, percebe-se que com o aumento da quantidade de PSS as partículas já cobriram mais a superfície da pasta de carbono, mas não se assemelham a formação da camada obtida pelo PPI. Este fato pode ter

ocorrido devido a aplicação da amostra polimérica ter sido feita de forma manual ou ainda por as partículas já estarem precipitando para o fundo da solução durante a aplicação, podendo uma amostra apresentar mais partículas que a outra.

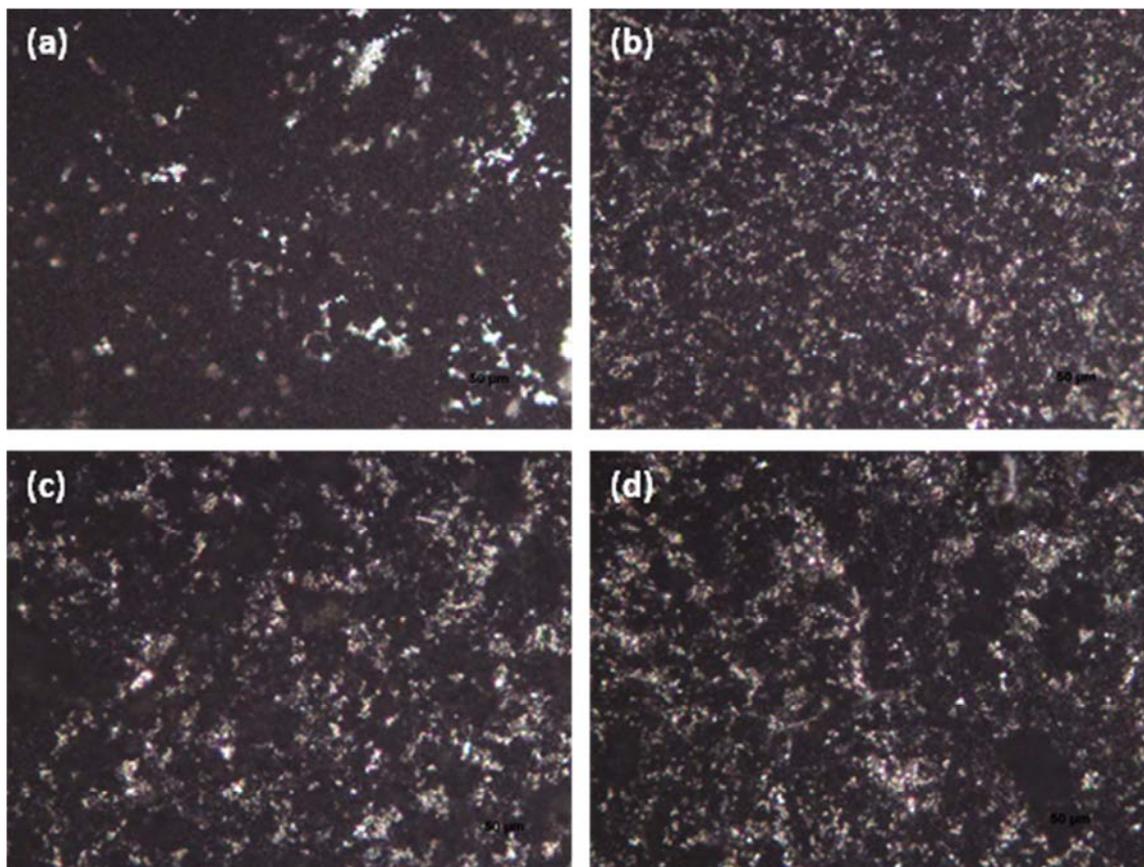


Figura 41: Imagens da película polimérica no sensor produzido: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.

5.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das tiras revestidas com o polímero foi avaliada por MEV. As imagens obtidas estão apresentadas na Figura 42.

Para as quatro amostras analisadas pode-se observar a formação de micropartículas e a formação de aglomerados micrométricos mais homogêneos à medida que o teor de PSS vai aumentando nas amostras.

Para as imagens do PPI e do PPI + PSS 1% podem ser observadas nanopartículas espalhadas por toda a superfície entre as micropartículas, como observado no MET (Figura 34 (a) e (b)). Já para as imagens de PPI + PSS 10% e PPI + PSS 20% são apenas observadas micropartículas. Atribui-se essas, a formação de aglomerados de nanopartículas na solução, formando micropartículas, as quais são depositadas na tira e mascaradas nas imagens obtidas por MEV, não podendo ser observadas as nanopartículas obtidas para as amostras como visualizado no MET (Figura 34 (c) e (d)).

As superfícies das tiras contendo as amostras de polímeros condutores apresentaram morfologia satisfatória, pois com a presença das nanopartículas ocorre um aumento da área de contato aumentando o sinal elétrico.

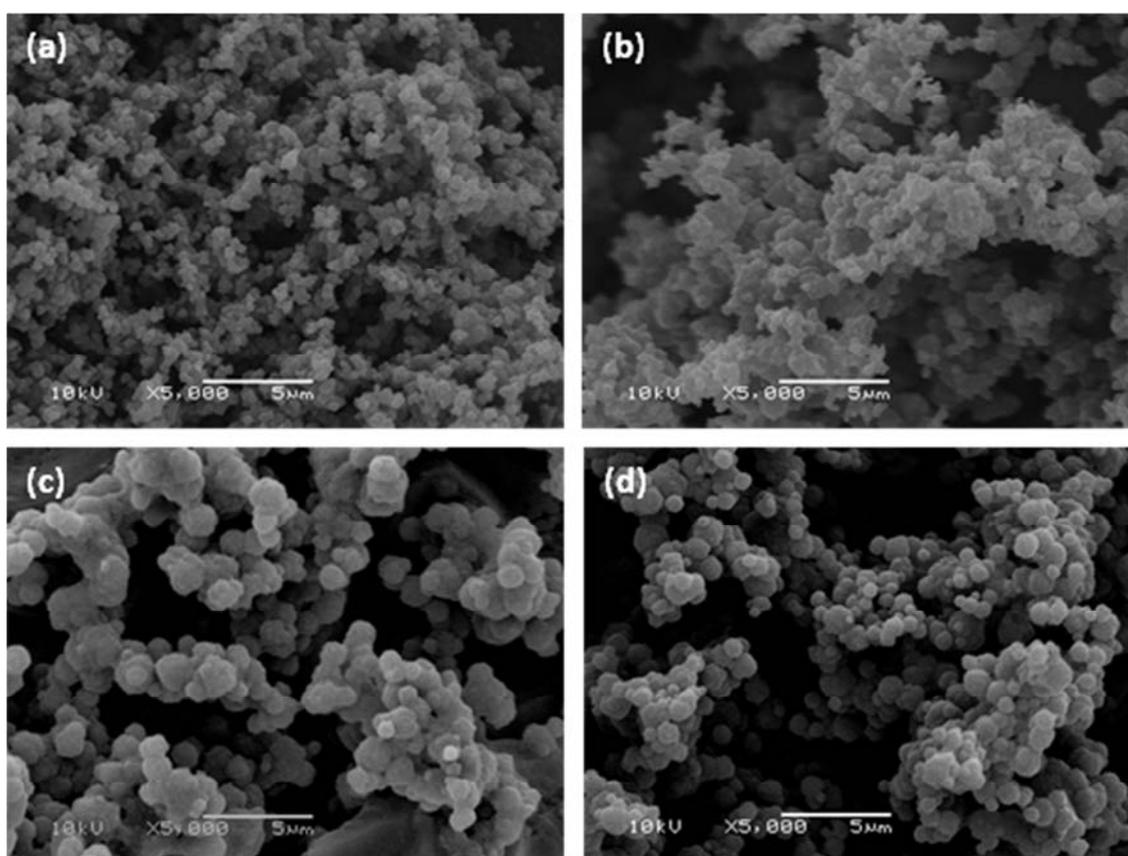


Figura 42: Imagens obtidas por MEV para superfície polimérica da tira produzida: a) PPI; b) PPI + PSS 1%; c) PPI + PSS 10% e d) PPI + PSS 20%.

5.4.2 Voltametria Cíclica

O sensor produzido sem conter polímero e o sensor comercial foram testados por voltametria cíclica em KCl e em PBS, sendo estas apresentadas na Figura 43. O comportamento de cada tira em cada um dos eletrólitos foi bastante semelhante nos intervalos utilizados, variando os valores de densidade de corrente em cada meio.

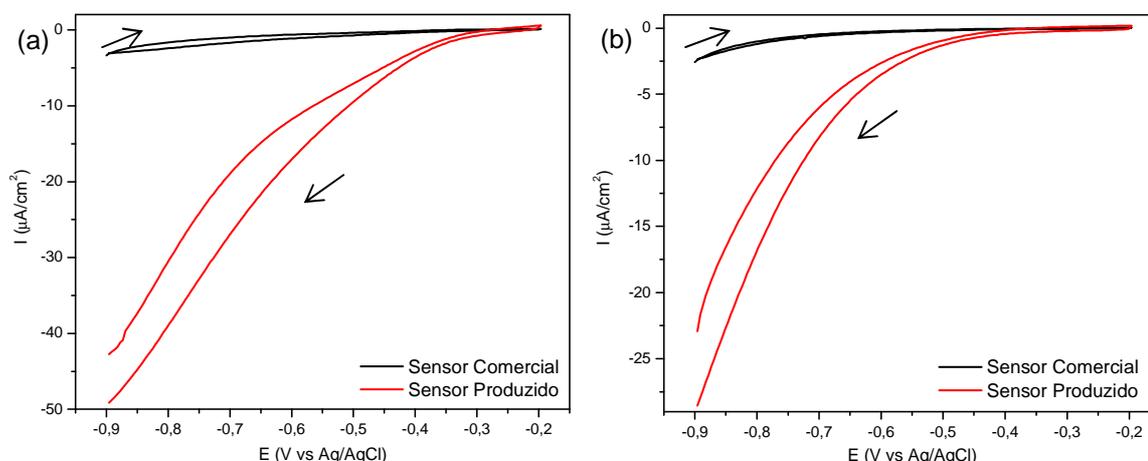


Figura 43: Voltamogramas cíclicos para sensores: produzido e comercial em a) KCl e b) PBS.

São apresentadas na Figura 44 os voltamogramas cíclicos em KCl e PBS das tiras produzidas sobre as quais foram aplicados os PIC's.

Pode-se visualizar nos voltamogramas obtidos para as tiras uma diminuição significativa da densidade de corrente medida, quando comparada esta com a densidade de corrente medida nas voltametrias cíclicas do pó polimérico, mudando a ordem de grandeza de miliAmpére para microAmpére. Acredita-se que este fato ocorreu devido a menor condutividade elétrica das pastas frente a Pt, usada para testes da atividade elétrica com o pó.

Observa-se que as tiras com polímero no eletrodo de trabalho comportaram-se melhor quando ensaiadas em PBS, que em KCl. Para nenhuma das amostras em nenhum dos eletrólitos puderam ser visualizados de forma clara os picos de oxidação e redução do polímero.

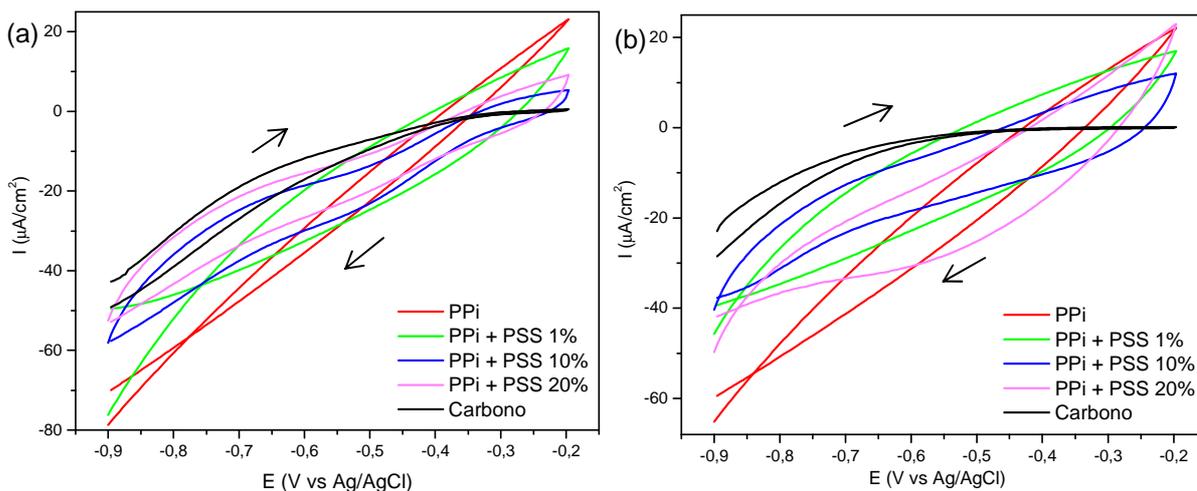


Figura 44: Voltamogramas cíclicos para as tiras com filme de PPI e PPI + PSS 1, 10 e 20% com pH= 5 em a) KCl e b) PBS.

5.5 Imobilização da Enzima e Aplicação nas Tiras de Teste Rápido

A imobilização da enzima HRP foi realizada na empresa FK Biotecnologia, sendo realizada nas amostras poliméricas com pH= 5, pois a enzima perde a sua atividade biológica em meios com pH= 1. As amostras escolhidas para a imobilização foram: PPI, PPI + PSS 1% e PPI + PSS 20%, considerando assim a amostra de polímero condutor com e sem a adição de um poliânion em pequena e em grande quantidade para verificação da influência deste. A amostra PPI + PSS 10% não foi trabalhada na imobilização devido a mesma não apresentar um comportamento diferenciado e por apenas representar um ponto entre os extremos de adição do PSS.

5.5.1 Estudo da Concentração Mínima de Enzima na Tira

A concentração de enzima a ser imobilizada foi fixada entre 50 UI/mL e 1000 UI/mL a partir de ensaios preliminares. As medidas colorimétricas obtidas pelo método ELISA para a imobilização da HRP nas tiras estão apresentadas na Figura 45. Os valores de absorbância foram obtidos pelo método ELISA em $\lambda = 570$ nm. Absorbância maior que 1 indicam zonas de saturação com excesso de enzima no

meio. As concentrações de enzima verificadas na Figura 45 correspondem às soluções de enzima a serem misturadas nas soluções de PIC's.

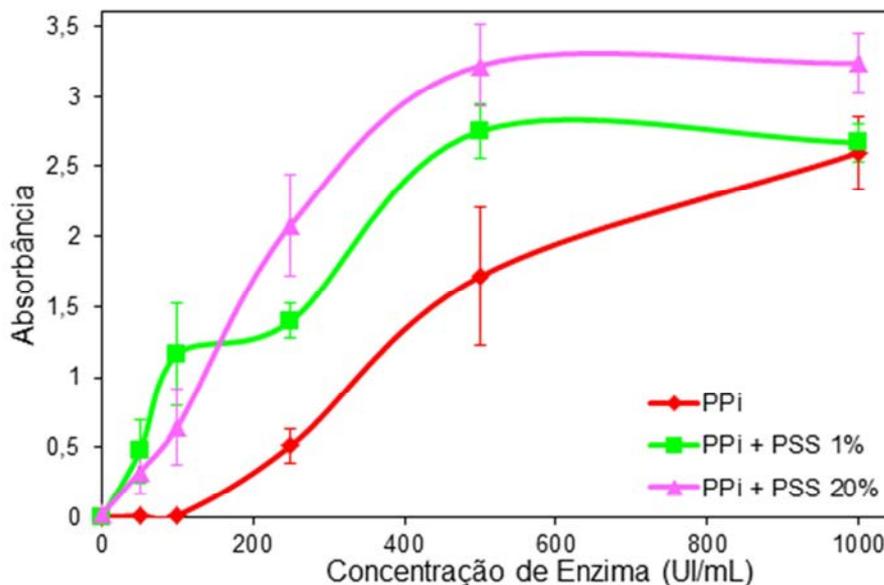


Figura 45: Medida de absorvância determinando a atividade da enzima imobilizada nas tiras.

Todas as tiras onde não foi imobilizada a enzima e que representaram o branco do estudo obtiveram valores de absorvância insignificantes, os quais foram reduzidos de todos os valores lidos.

Pode-se perceber que as leituras apresentaram valores de absorvância altos, indicando que a HRP está imobilizada no polímero e apresenta-se ativa. Percebe-se que todas as amostras em concentrações de enzima próximas de 150 a 250 UI/mL apresentaram valores de absorvância próximo de 1, indicando a quantidade ideal de enzima a ser imobilizada. Concentrações mais altas de HRP como 500 e 1000 UI/mL podem ser imobilizadas, mas indicam a saturação da reação com excesso de enzima no meio, com valores de absorvância maiores que 1. O uso de soluções de HRP mais concentradas aumentaria o custo da tira e o desperdício de enzima. Já concentrações menores que 150 UI/mL apresentam uma atividade quase nula.

A solução de PPI + PSS 20% mostrou-se mais efetiva na imobilização da enzima apresentando valores de absorvância maiores em todas as concentrações estudadas.

Foram testadas ainda soluções de HRP livre nas mesmas concentrações de enzima, entre 50 UI/mL e 1000 UI/mL, as quais foram diluídas em água na mesma proporção anteriormente estudada, de 4:1 de água e solução de enzima. Estas soluções foram diretamente aplicadas sobre as tiras de teste rápido, seguiram para estufa e após ocorreram às medidas colorimétricas. Todas as concentrações de HRP livre apresentaram valores de absorvância nos níveis de saturação. As soluções de enzima livre foram então diluídas 10 vezes e foi realizada uma nova leitura da absorvância, conforme dados da Figura 46.

Após a diluição por 10 com água, valores próximos de 25 UI/mL de HRP apresentam valores de absorvância perto de 1. Isso mostra que o polímero prejudica a atividade da enzima, pois concentrações de enzima livre (diluídas dez vezes) apresentam comportamento semelhantes as medidas realizadas para as amostras com enzima imobilizada no polímero. Acredita-se que o pH do meio onde o polímero encontra-se é o principal responsável pela diminuição da atividade enzimática, pois a atividade ótima da enzima normalmente é encontrada em pH= 6 ou 7, os quais reduzem a condutividade polimérica.

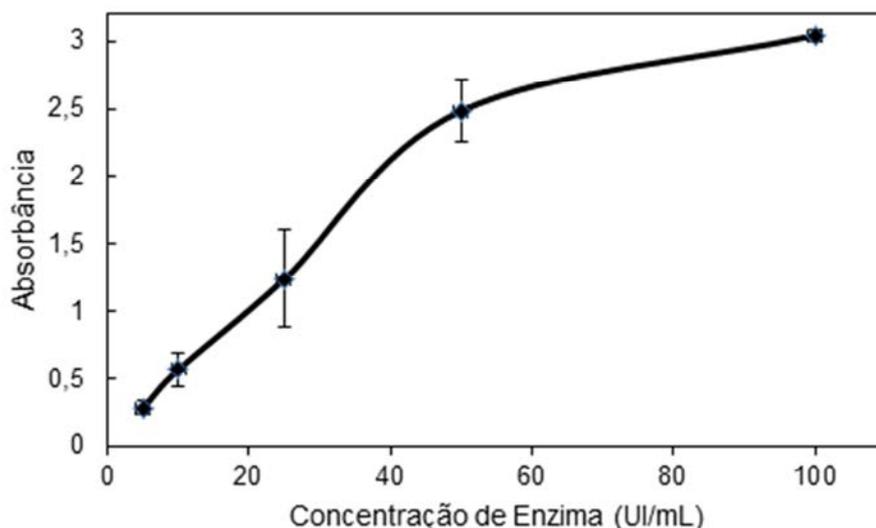


Figura 46: Medida de absorvância para HRP livre após diluição de 10 vezes.

Assim pode-se dizer que a HRP quanto livre apresenta-se em excesso, mas quando imobilizada perde grande parte de sua atividade devido ao pH do meio

polimérico. Concentrações de 250 UI/mL apresentam valores de absorvância perto de 1 sendo a ideal para ser imobilizada nas tiras de teste rápido para a realização dos ensaios de sensibilidade frente ao H₂O₂.

5.5.2 Estudo da Imobilização da HRP

O estudo da forma de imobilização da HRP na matriz polimérica foi pesquisado através da realização de lavagens nas tiras com três diferentes soluções, as quais apresentam graus de severidade de remoção diferentes: PBS para fazer a retirada das enzimas depositadas na superfície da tira, PBS TWEEN para remover as enzimas depositadas entre os aglomerados poliméricos da matriz polimérica, e SDS para romper as ligações fracas realizadas entre polímero e enzima. As cinco concentrações de HRP foram estudadas a fim de verificar a forma de imobilização da enzima. Da mesma forma, todas as tiras onde não foi imobilizada a enzima, com apenas solução polimérica e que representaram o branco do estudo mostraram valores de absorvância insignificantes, os quais foram reduzidos de todos os valores lidos. Da mesma forma, as concentrações de enzima verificadas nas Figuras 47, 48 e 49 correspondem às soluções de enzima a serem misturas nas soluções de PIC's.

Na Figura 47 podem ser observadas as medidas de absorvância para as tiras com PPI e HRP que não sofreram lavagem e para as tiras que foram lavadas com PBS, PBS TWEEN ou SDS.

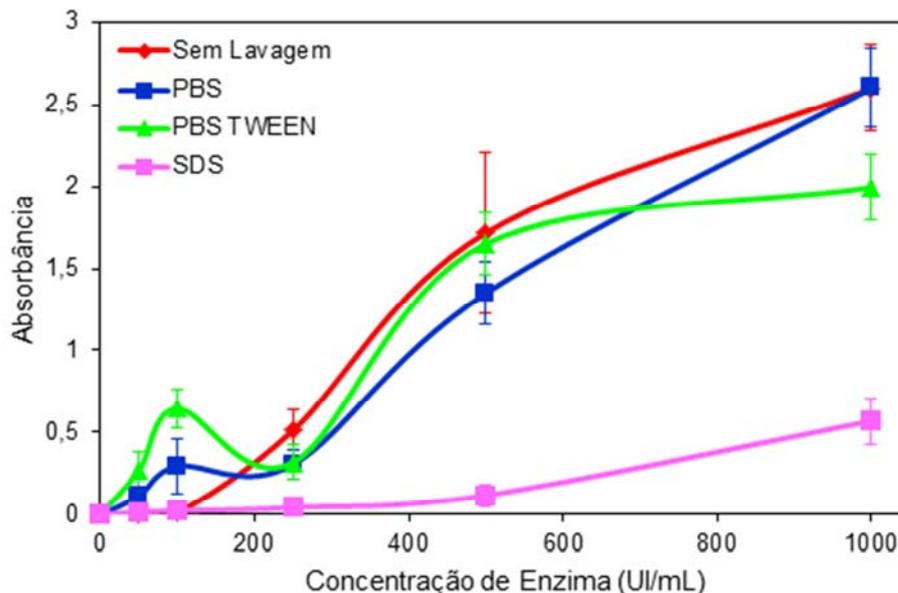


Figura 47: Curvas de absorbância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI, com e sem lavagem.

Na Figura 48 podem ser observadas as leituras de absorbância para as tiras com PPI + PSS 1% e HRP que não sofreram lavagem e para as tiras que foram lavadas com PBS, PBS TWEEN ou SDS.

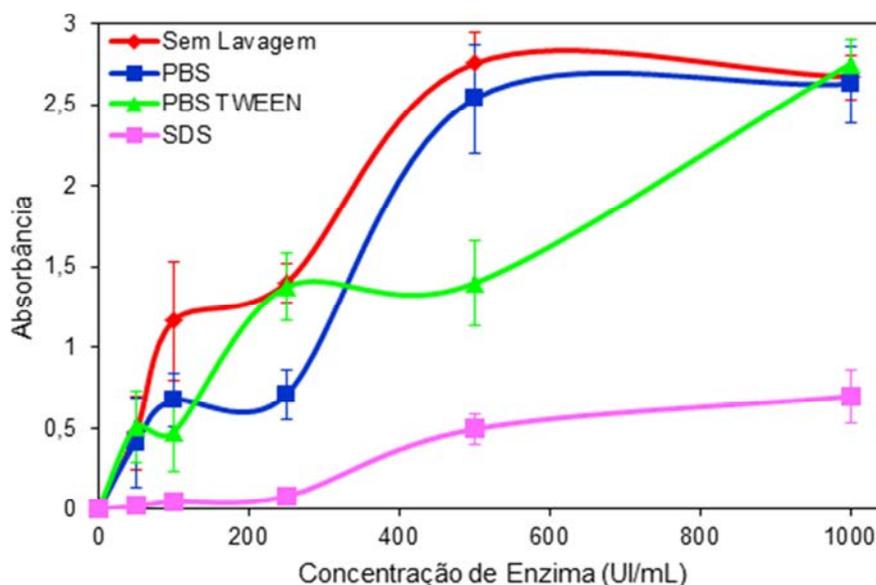


Figura 48: Curvas de absorbância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI + PSS 1%, com e sem lavagem.

Na Figura 49 podem ser observadas as leituras de absorbância para as tiras com HRP imobilizada em PPI + PSS 20%, que não sofreram lavagem e que foram lavadas com PBS, PBS TWEEN ou SDS.

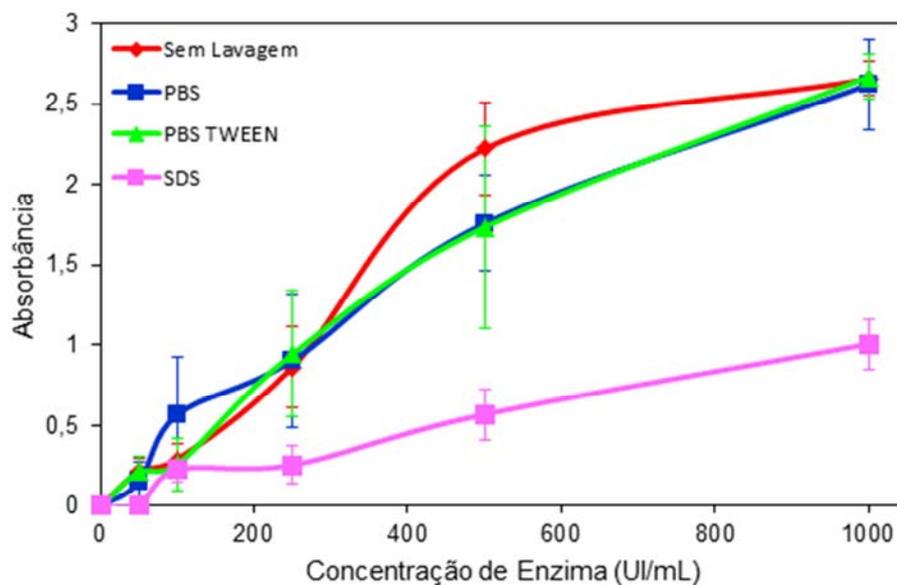


Figura 49: Curvas de absorbância para as diferentes concentrações de enzima imobilizadas em PPI + PSS 20%, com e sem lavagem.

As leituras de absorbância para as tiras com HRP imobilizada na matriz do PPI, PPI + PSS 1% e PPI + PSS 20%, não sofreram alterações significativas quando as tiras foram lavadas com PBS ou PBS TWEEN, indicando que as enzimas na sua maioria não se encontram depositadas sobre a superfície do eletrodo de trabalho e nem depositadas entre os aglomerados poliméricos da matriz polimérica, pequena parcela de unidades enzimáticas encontram-se nesta situação. Quando as tiras sofreram lavagem com SDS ocorreu uma diminuição significativa nas leituras de absorbância, indicando que grande parte das enzimas está adsorvida na cadeia polimérica, formando ligações fracas com o polímero. Para as concentrações mais altas de HRP imobilizadas no polímero o valor de absorbância lido nas tiras com PPI que sofreram lavagem com SDS, chegou a 0,5. Assim, a solução de SDS não foi capaz de remover todas as enzimas presentes podendo algumas enzimas estarem confinadas na rede polimérica em todas as concentrações de HRP imobilizadas.

Ao realizar-se a lavagem com o SDS nas tiras com PPI + PSS 1%, percebe-se que este removeu quantidades menores de enzima quando comparado com o PPI, o que pode ser um indicativo de que o PSS auxilia na imobilização da enzima através do confinamento de HRP na rede polimérica. Desta forma, pode-se dizer que a parte das enzimas está adsorvida na matriz polimérica realizando ligações fracas e uma parcela está confinada na rede da matriz polimérica.

Percebe-se de forma mais intensa a influência do PSS na lavagem com o SDS, das tiras com PPI + PSS 20%. Para a concentração mais alta de enzima obteve-se valores próximos de 1 de absorvância, indicando o confinamento da enzima na rede polimérica, o que confirma o auxílio do PSS na imobilização enzimática, pois o SDS removeu a parcela de enzima adsorvida, rompendo as ligações fracas da HRP com o PIC.

Verifica-se a ocorrência de variações inesperadas nas leituras, as quais ocorreram devido à aplicação manual da mistura polímero e HRP, o que pode gerar erros nas leituras.

Portanto maiores concentrações de PSS favorecem a imobilização da HRP por confinamento, pois este, forma complexos entre a enzima e o polieletrólito, conforme observado por Cooper et al. [75]. Portanto acreditasse que a HRP está confinada na rede polimérica.

5.5.3 Estudo da Influência da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

A influência da concentração de H_2O_2 nas leituras colorimétricas foi verificada pela mudança da concentração de substrato na solução reveladora colocada nas microplacas. Com este estudo pode-se estimar um intervalo de detecção para as tiras de teste rápido, avaliando a faixa de concentrações capaz de ser analisada. Como citado anteriormente, todas as tiras onde não foi imobilizada a enzima e que representaram o branco do estudo obtiveram valores de absorvância insignificantes, os quais foram reduzidos de todos os valores lidos. Novamente, as concentrações de enzima verificadas nas Figuras 50, 51 e 52 correspondem às soluções de enzima a serem misturas nas soluções de PIC's.

Na Figura 50 podem ser observadas as leituras de absorvância para as amostras de PPI com HRP imobilizada nas cinco diferentes concentrações, variando as concentrações de substrato dentro da solução reveladora.

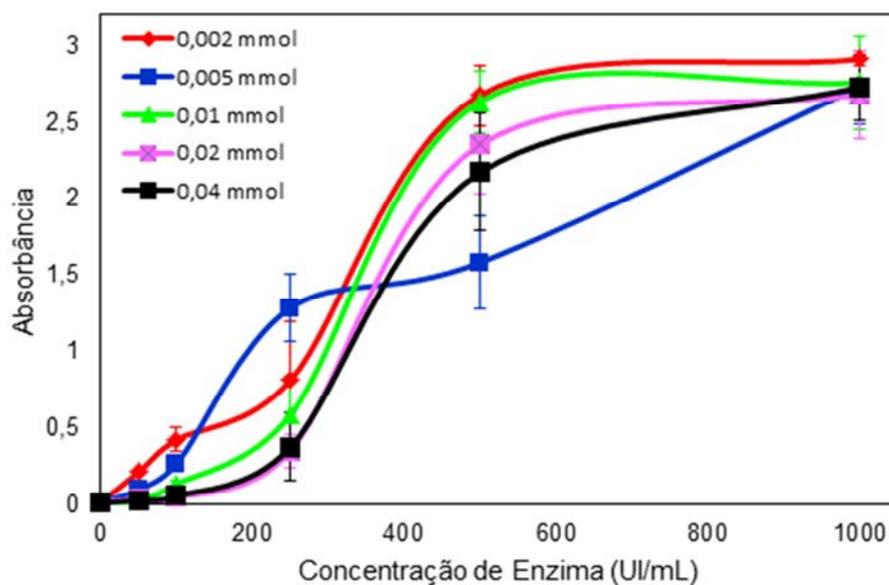


Figura 50: Curva de absorvância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI, para as várias concentrações de H₂O₂.

Pode-se visualizar na Figura 51 as leituras de absorvância para as diversas concentrações de HRP imobilizadas no PPI + PSS 1%, verificadas nas cinco concentrações de H₂O₂ estudadas.

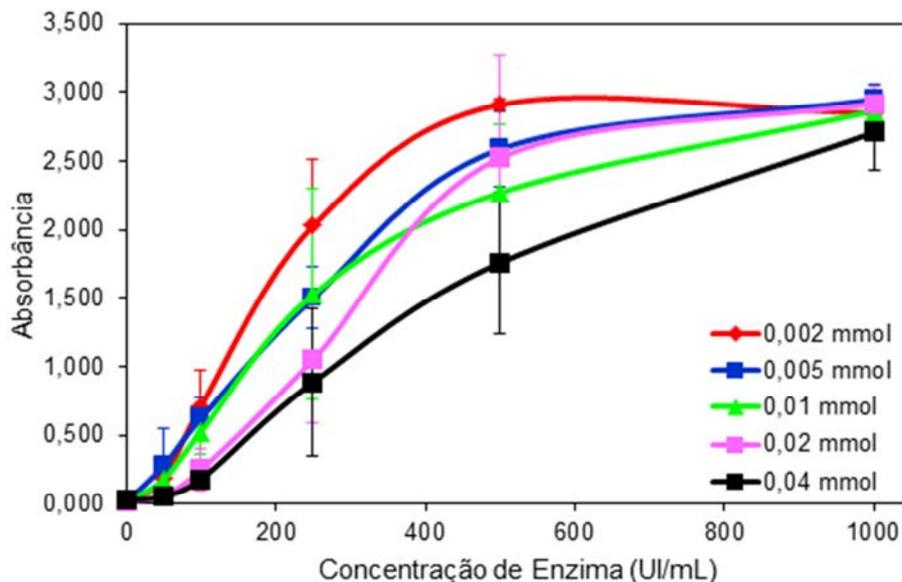


Figura 51: Leituras de absorbância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI + PSS 1%, para as várias concentrações de H₂O₂.

Na Figura 52 pode-se observar o comportamento da HRP imobilizada nas cinco concentrações estudadas em PPI + PSS 20% e testada nas diversas concentrações de H₂O₂.

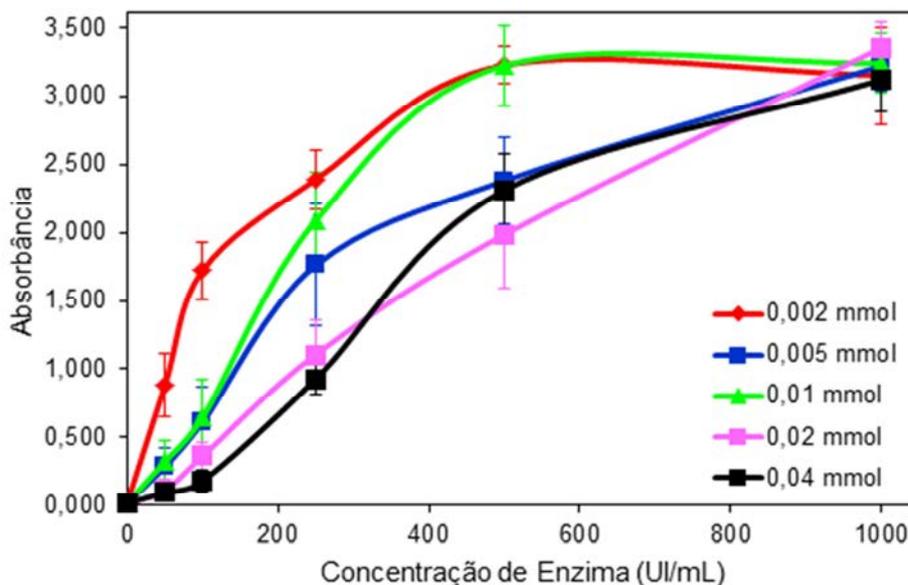


Figura 52: Curvas de absorbância para as concentrações de HRP imobilizadas no PPI + PSS 20%, para as várias concentrações de H₂O₂.

Observando as Figuras 50, 51 e 52, pode-se perceber que as leituras realizadas sofreram leves modificações conforme a variação da concentração de H_2O_2 , comportando-se de forma inesperada, pois com o aumento da concentração de substrato na solução as leituras de absorvância sofreram uma leve diminuição. Este fato pode estar ligado ao excesso de substrato o qual provoca a inativação da enzima. Mahmoudi et al. [76] observaram o mesmo comportamento para a HRP em altas concentrações de H_2O_2 , onde atribuíram que o excesso de substrato leva a inativação das proteínas, descrevendo este processo como inativação suicida, onde a enzima não consegue se ligar ao seu sítio ativo com as moléculas de peróxido de hidrogênio devido a grande quantidade de moléculas ao seu redor, e devido a isso ela acaba se inativando.

A presença do polieletrólito não influenciou de forma positiva para minimizar o comportamento de inativação da enzima.

5.5.4 Sensibilidade da HRP frente ao H_2O_2

Os estudos de sensibilidade nas tiras de teste rápido foram realizados com a imobilização de 250 UI/mL de HRP em cada uma das amostras poliméricas com pH= 5. O valor foi escolhido porque apresentou valores de absorvância perto de 1 nos estudos anteriormente discutidos. O potencial constante aplicado foi de -0,25 V, pois caracteriza um intervalo de potencial onde não ocorrem picos de redução e oxidação do PPI e PPI dopado com PSS.

Cada perturbação foi realizada com adição de 10 μ L de solução de substrato, o que representa uma adição de 0,14 mmol de H_2O_2 , como pode ser observada na Figura 53. A concentração de substrato utilizada para a cronoamperometria foi maior que as concentrações utilizadas no estudo colorimétrico da influência de concentrações de H_2O_2 nas leituras de absorvância. Este aumento na concentração foi necessário em razão do volume da célula eletroquímica, a qual continha 1,5 mL de eletrólito, enquanto que o poço da microplaca do teste colorimétrico continha 0,25 mL de solução reveladora. E ainda, devido ao tipo de resposta medido por cada ensaio, onde para o teste eletroquímico o sinal ocorre pela transferência de elétrons

através de difusão. Já no ensaio colorimétrico todas as enzimas à medida que reagem com o substrato proporcionam a alteração na cor da solução contribuindo para o sinal. Assim menores concentrações de H_2O_2 produzem um sinal colorimétrico significativo, enquanto que para o ensaio eletroquímico necessita-se de maiores concentrações de substrato [77].

Pela análise da Figura 53, percebe-se que estes valores maiores não ocasionaram o excesso de substrato no meio provocando a inativação da HRP. Na Figura 53 podem ser visualizados os efeitos da adição representando as perturbações para a HRP imobilizada em PPi e PPi dopado com PSS, aplicados nas tiras de teste rápido como eletrodo de trabalho

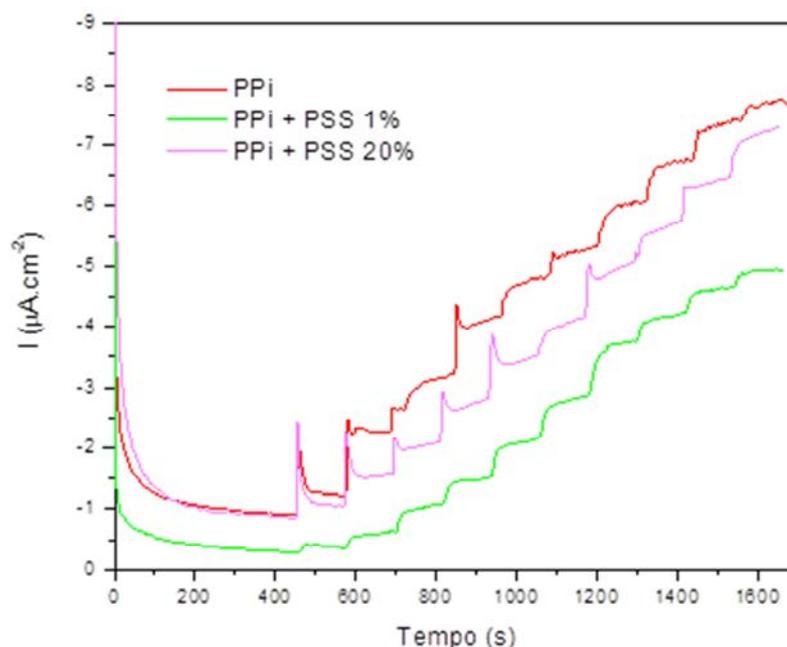


Figura 53: Efeito da adição de H_2O_2 em célula eletroquímica tendo como eletrodos a tira de teste rápido.

Analisando os dados obtidos percebe-se que as amostras de PPi e PPi com 1 e 20% de PSS, comportaram-se da mesma forma. Após o tempo de estabilização da tira dentro do eletrólito, foram realizadas 10 adições sucessivas de substrato no meio, cada adição representou uma perturbação no sistema ocorrendo um acréscimo na corrente elétrica proporcional a concentração de H_2O_2 no meio, seguida de seu decaimento até a estabilização.

No teste de sensibilidade o polímero mais sensível, ou seja, que apresentou os maiores valores de corrente para a mesma quantidade de enzima imobilizada na solução inicial foi o PPI, diferentemente do ensaio colorimétrico em que foi o PPI + PSS 20%. Esta amostra apesar de imobilizar a enzima com maior eficiência apresenta uma condutividade elétrica inferior a do PPI devido a quantidade de PSS presente.

Através da análise da sensibilidade da tira pode-se estimar o tempo de resposta do biossensor. Na Figura 54 está representada a primeira perturbação provocada ocasionada no sistema, onde é possível estimar o tempo que a tira demora a atingir seu valor máximo de corrente até que ela comece a diminuir. Este é o tempo de resposta do sensor.

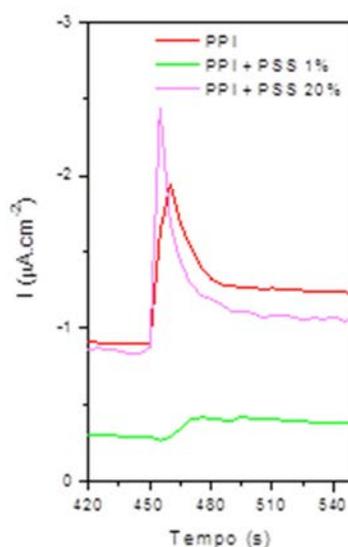


Figura 54: Representação de uma perturbação degrau para estimar o tempo de resposta da tira de teste rápido.

Pode-se estimar um tempo de resposta para o PPI de 10 segundos, para o PPI + PSS 1% de 15 segundos e para o PPI + PSS 20% de 5 segundos. O tempo de resposta menor do PPI + PSS 20% pode estar associado a uma maior quantidade de enzima imobilizada e por ter apresentado resposta eletroquímica mais eficaz e mais rápida, mesmo com uma menor condutividade elétrica que prejudica as medidas de sensibilidade da tira.

A Figura 55 apresenta a relação da concentração de H_2O_2 aplicado nas tiras de teste rápido e a corrente elétrica obtida. Apresenta ainda a equação obtida para cada relação entre concentração de substrato aplicado e corrente medida e o R^2 , coeficiente de relação da reta calculada.

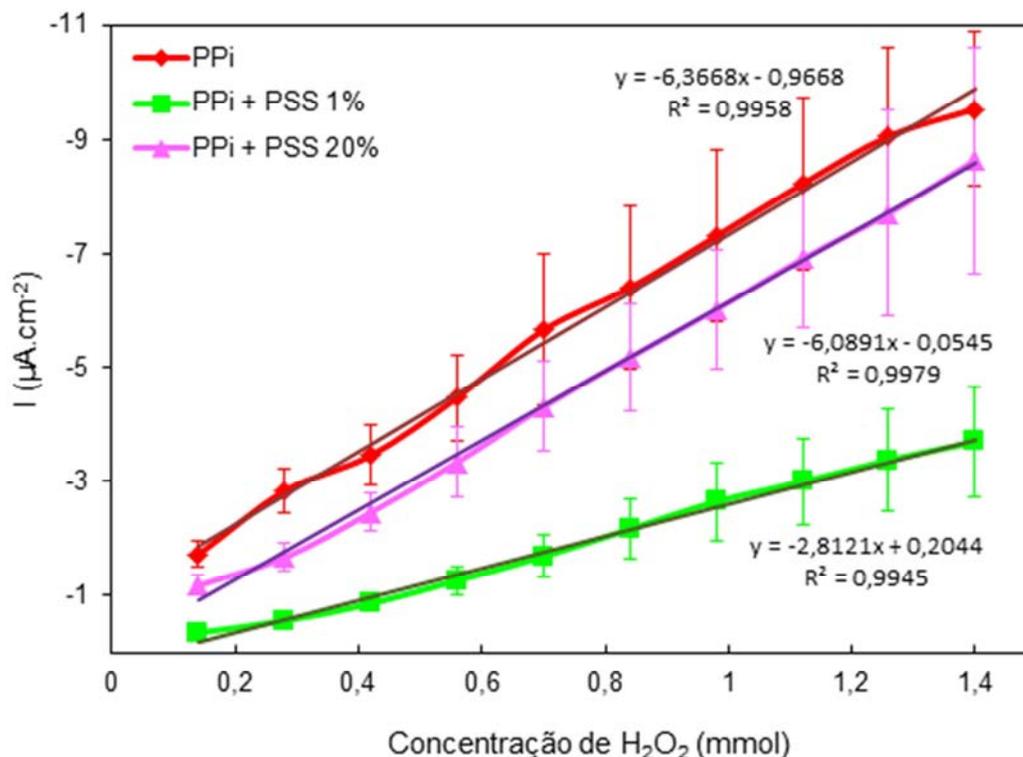


Figura 55: Relação entre a concentração de H_2O_2 aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.

Percebe-se que apesar das 10 adições de substrato no meio, o eletrodo não atingiu a sua saturação, pois as medidas de corrente para o aumento da concentração de substrato continuaram aumentando em uma razão linear nas três amostras estudadas. Assim o eletrodo mostra-se sensível a concentrações de substrato maiores do que as aplicadas.

Através da curva de resposta de corrente conforme a concentração aplicada foi possível determinar a equação da reta e o fator de correção para esta. Para a amostra de PPI o fator de correção é 0,9958; para o PPI + PSS 1% é 0,9945 e para o PPI + PSS 20% é 0,9979, mostrando que a corrente aumenta de forma linear com o aumento da concentração. Pelas equações da reta pode-se determinar um valor

de concentração conforme uma medida de corrente, caracterizando assim o funcionamento de um biossensor amperométrico de terceira geração. Assim, pode ser definida para a tira de teste rápido com PPI como transdutor a equação característica do biossensor:

$$I = -6,3668 C - 0,9668 \quad (5)$$

Onde: C= concentração de H₂O₂ a ser medida; I= corrente elétrica produzida na detecção do H₂O₂ pela enzima.

Desta forma, os polímeros estudados comportam-se como bons transdutores, pois conseguem imobilizar a enzima de forma satisfatória e produzir um sinal de corrente que pode ser medido pelo eletrodo desempenhando o papel de uma tira de teste rápido. Assim aplica-se certa quantidade de substrato e através do valor de corrente lido para esta perturbação consegue-se calcular pela equação da reta definida a real concentração deste substrato.

A metodologia sugerida para o desenvolvimento de uma tira de teste rápido mostrou-se eficiente, pois foi possível imobilizar a enzima em um polímero condutor, aplicar estes no eletrodo de uma tira confeccionada e obter a equação que define o biossensor.

6 CONCLUSÕES

A síntese de polipirrol e polipirrol dopado com um poliânion, poliestireno sulfonado, conduziu a obtenção de nanopartículas, que foram observadas por microscopia eletrônica de transmissão, e representam um fator importante para o polímero condutor servir de transdutor de um biossensor.

Apesar dos valores baixos de condutividade elétrica obtidos, as amostras poliméricas mostraram-se eletroativas em meios com pH próximo da neutralidade, que é meio de análise adequado para tiras de teste rápido. A utilização do poliestireno sulfonado melhorou a condutividade elétrica do PPI quando utilizado em pequenas concentrações (até 10% em massa), mas em concentrações maiores a condutividade diminuiu. Os polímeros mostraram-se capazes de seguir para a imobilização da enzima e serem usados como transdutores.

A técnica de *silk-screen* para produção de tiras de teste rápido mostrou-se eficaz devido à facilidade e rapidez de execução, além do baixo custo dos materiais utilizados para sua realização. Porém, a produção manual por serigrafia podem provocar falhas nas trilhas que podem prejudicar o sinal elétrico não apresentando características homogêneas.

O polímero condutor formou aglomerados na superfície das tiras, os quais se mostraram eletroativos nos eletrólitos estudados. A aplicação do polímero condutor no eletrodo de trabalho precisa ser melhorada para a obtenção de um filme polimérico, que recubra toda a superfície melhorando e aumentando a área de contato entre o polímero e o substrato.

O método de imobilização enzimática no polímero condutor foi satisfatório, pois pequenas concentrações de enzima puderam ser imobilizadas, e toda a enzima misturada ao polipirrol pode ser aplicada nas tiras, não se perdendo solução. Além disso, acredita-se que grande parte da enzima imobilizada fica adsorvida na cadeia polimérica, ou realiza ligações físicas com o polímero, o que é favorável para a preservação da atividade enzimática. A utilização de poliestireno sulfonado favoreceu a imobilização com a HRP devido à formação de complexos entre estes.

As tiras de teste rápido com a enzima HRP imobilizada no polímero, mostraram-se sensíveis ao H_2O_2 , permitindo a sua detecção e obtenção de uma equação que relacione a corrente elétrica com a concentração de peróxido de hidrogênio. Assim pode-se estimar a concentração de H_2O_2 numa amostra através da leitura de uma corrente elétrica utilizando as tiras de teste desenvolvidas.

O desenvolvimento da metodologia para produção de biossensores enzimáticos amperométricos utilizando polipirrol nanoestruturado mostrou-se satisfatória, pois foi possível obter uma tira para detecção de peróxido de hidrogênio a qual responde de forma linear a concentrações de substrato variadas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização da síntese do polipirrol com outros agentes oxidantes para verificação da variação da condutividade elétrica, e teste para avaliação se maiores valores de condutividade interferem no sinal elétrico do biossensor;
- Síntese do polímero condutor na forma de filme para melhora do recobrimento do eletrodo de trabalho;
- Testar a síntese do PPI com PSS com Mw ~75.000g/mol;
- Testar outros PIC como tiofeno e derivados;
- Busca de meios automatizados de produção das tiras de teste rápido para redução do número de erros devido a falhas nos sinais elétricos;
- Otimização da aplicação da solução de enzima imobilizada no polímero;
- Estimar o ponto de saturação de detecção da tira.
- Desenvolvimento do dispositivo eletrônico para leitura dos biossensores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 MANO, E. B. Introdução a Polímeros. São Paulo, Ed. Edgard Blucher Ltda, 4ª edição, 1990.
- 2 CALLISTER Jr, W. Ciência e engenharia de materiais: uma introdução. Rio de Janeiro, Ed LTC, 7ª edição, 2007.
- 3 FAEZ, R.; REIS, C.; DE FREITAS, P. S.; KOSIMA, O. K.; RUGGERI, G.; DE PAOLI, M.-A. Polímeros Condutores. **Química Nova**, 11 (2000), 13-18.
- 4 MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**. 19 (1996), 388-399.
- 5 MAIA, D. J.; DE PAOLI, M.-A.; ALVES, O. L. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, 32 (2000), 204-215.
- 6 FRANÇA, E.; DALL' ANTONIA, L. H. Novos compósitos de polianilina e exopolissacarídeos com aplicações em biomateriais: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 28 (2007) 37-46.
- 7 HECHAVARRIA, L.; HU, H.; RINCÓN, M. E. Polyaniline-poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanosulfonic acid) composite thin films: structure and properties. **Thin Solid Films**, 441 (2003) 56-62.
- 8 MIRMOHSENI, A.; WALLACE, G.G. Preparation and characterization of processable electroactive polyaniline-polyvinyl alcohol composite. **Polymer**, 44 (2003) 3523-3528.
- 9 MELO, C. P. Polímeros Condutores. **Ciência Hoje**, 36 (2007), 39-40.
- 10 SHIRAKAWA, H. The discovery of polyacetylene film. The dawning of conducting polymers. **Synthetic Metals**, 125 (2002), 3-10.
- 11 GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, 32 (2007), 876-921.
- 12 PRON, A.; RANNOU, P. Processable conjugated polymers: from organic semiconductors to organic metals and superconductors. **Prog. Polym.**, 27 (2002), 135-190.

13 DAVOGLIO, R. A. Eletrossíntese, caracterização e testes de compósitos de polipirrol e poli (DMcT) sobre fibra de carbono como catodos de baterias secundárias e eletrodos de supercapacitores. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. São Paulo (2009) UFSCar.

14 CORNIL, J.; DOS SANTOS, D. A.; SILBEY, R.; BRÉDAS, J. L. The role of intermolecular interactions on the optical and charge-transfer properties of conjugated polymers. **Synthetic Metals**, 101 (1999), 492-495.

15 RINALDI, A. W. Desenvolvimento de blendas e sensores utilizando polímeros condutores eletrônicos e iônicos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Paraná (2005) UEM.

16 SAUNDERS, B. R.; FLEMING, R.J.; MURRAY, K.S. Recent advances in the physical and spectroscopic properties of polypyrrole films, particularly those containing transition-metal complexes as counteranions. **Chemistry of Materials**, 7 (1995), 1082-1094.

17 NALWA, H. S. Handbook of organic conductive molecules and polymers. Inglaterra, Ed. John Wiley & Sons Ltd, 1997, vol 2.

18 WALLACE, G. G.; SPINKS, G. M.; TEASDALE, P.R. Conductive electroactive polymers – Intelligent materials systems. Estados Unidos, Ed. CRC Press Taylor & Francis Group, 3ª edição, 2009.

19 BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons and solitons in conducting polymers. **Acc. Chem. Rev.**, 18 (1985), 309-315.

20 OLIVEIRA Jr, Z. T.; SANTOS, M. C. Relative stability of polarons and bipolarons in emeraldine oligomers: a quantum chemical study, **Solid State Communications**, 114 (2000), 49-53.

21 MUNDSTEDT, H.; KOHLER, G.; MOHWALD, H.; NAEGELE, D.; BITTHIN, R.; ELY, G.; MEISSNER, E. Rechargeable polypyrrole/lithium cells. **Synthetic Metals**, 18 (1987), 259-264.

22 SCHUHMANN, W.; KRANZ, C.; WOHLSCHLÄGER, H.; STROHMEIER, J. Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces. **Biosensors & Bioelectronics**, 12 (1997), 1157-1167.

23 BAKKER, E. Electrochemical sensors. **Analytical Chemistry**, 76 (2004), 3285-3298.

-
- 24 OTERO, T. F.; CANTERO, I. Conducting polymers as positive electrodes in rechargeable lithium-ion batteries. **Journal of Power Sources**, 81-82 (1999), 838-841.
- 25 AL-MASHAT, L.; TRAN, H. D.; WLODARSKI, W.; KANER, R. B.; KALANTAR-ZADEH, K. Polypyrrole nanofiber surface acoustic wave gas sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 134 (2008), 826-831.
- 26 FENG, J.; YAN, W.; ZHANG, L. Synthesis of polypyrrole micro/nanofibers via a self-assembly process. **Microchim Acta**, 166 (2009), 261-267.
- 27 YANG, C.; LIU, P. Water-dispersed polypyrrole nanoparticles via chemical oxidative polymerization in the presence of a functional polyanion. **Reactive & Functional Polymers**, 70 (2010), 726-731.
- 28 LI, C.; BAI, H.; SHI, G. Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications. **Chemical Society Reviews**, 38 (2009), 2397-2409.
- 29 BISWAS, S.; DRZAL, L. T. Multilayered nanoarchitecture of graphene nanosheets and polypyrrole nanowires for high performance supercapacitor electrodes. **Chemistry of Materials**, 22 (2010), 5667-5671.
- 30 XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, 341 (2010), 1-11.
- 31 HUANG, J.; VIRJI, S.; WEILLER, B. H.; KANER, R. B. Nanostructured polyaniline sensors. **Chemistry - A European Journal**, 10 (2004), 1314-1319.
- 32 KUO, C.-W.; WEN, T.-C. Dispersible polyaniline nanoparticles in aqueous poly(styrenesulfonic acid) via interfacial polymerization route. **European Polymer Journal**, 44 (2008), 3393-3401.
- 33 LU, X.; ZHANG, W.; WANG, C.; WEN, T.-C.; WEI, Y. One-dimensional conducting polymer nanocomposites: synthesis, properties and applications. **Progress in Polymer Science**, 36 (2011), 671-712.
- 34 KILLIAN, J. G.; COFFEY, B. M.; GAO, F.; POEHLER, T. O.; SEARSON, P.C. Polypyrrole composite electrodes in an all-polymer battery system. **Journal Electrochemical Society**, 143 (1996), 936-942.

-
- 35 KAIBARA, P. S. O. Preparação e caracterização de compósitos de polipirrol (LiMn₂O₄) / fibra de carbono para cátodos em baterias secundárias. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. São Paulo (2004) UFSCar.
- 36 OTERO, T. F.; SANSINENA, J. M. Influence of synthesis conditions on polypyrrole-poly(styrenesulphonate) composite electroactivity. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 412 (1996), 109-116.
- 37 LEHNINGER, A. L. Princípios de bioquímica. São Paulo, Ed. Sarvier, 5ª edição, 1989.
- 38 LEHNINGER, A. L. Bioquímica: volume 1 componentes moleculares das células. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda, 3ª edição, 1980.
- 39 VIEIRA, N. C. S. Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de In₂O₃:Sn. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação de em Ciências dos Materiais. Itajubá (2006) UNIFEI.
- 40 CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Bioquímica Ilustrada. Porto Alegre, Ed. Artes Médicas Sul Ltda, 2ª edição, 1996.
- 41 <http://pt.wikipedia.org/wiki/Enzima>, acessada em 21/07/2011.
- 42 KIELING, D. D. Enzimas aspectos gerais. Apostila da Disciplina de Engenharia Bioquímica. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. Florianópolis (2002), UFSC.
- 43 JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. **Current Opinion in Biotechnology**, 15 (2004), 305-313.
- 44 VEITCH, N. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, 65 (2004), 249-259.
- 45 NAVES, A. F. Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. São Paulo (2008), USP.
- 46 TEMOÇIN, Z.; YIGITOGU, M. Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate grafted acrylamide fiber. **Bioprocess Biosyst Eng**, 32 (2009), 467-474.

-
- 47 FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M.; COLLINS, C. H. Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. **Process Biochemistry**, 39 (2004), 957-962.
- 48 D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethelenimime. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 52 (2002), 59-62.
- 49 YESILOGLY, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, 40 (2005), 2155-2159.
- 50 BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of enzymes and cells. New Jersey. Ed. Humana Press Inc. 1997.
- 51 GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, 17 (2002) 345-359.
- 52 YING, L.; KANG, E. T.; NEOH, K. G. Covalent immobilization of glucose oxidase on microporous membranes prepared from poly(vinylidene fluoride) with grafted poly (acrylic acid) side chains. **Journal of Membrane Science**, 208 (2002), 361-374.
- 53 LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal Electroceram**, 16 (2006) 79-91.
- 54 MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Rio de Janeiro (2008) UFRJ.
- 55 ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 23 (2008) 1083-1100.
- 56 MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**, 72 (2007) 335-348.
- 57 JOSHI, A.; GANGAL, S. A.; GUPTA, S. K. Ammonia sensing properties of polypyrrole thin films at room temperature. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 156 (2011) 938-942.
- 58 JIANG, L.; JUN, H.-K.; HOH, Y.-S.; LIM, J.-O.; LEE, D.-D.; HUH, J.-S. Sensing characteristics of polypyrrole-poly(vinyl alcohol) methanol sensors prepared by in situ vapor state polymerization. **Sensors and Actuators B**, 105 (2005) 132-137.

-
- 59 DU, Z.; LI, C.; LI, L.; ZHANG, M.; XU, S.; WANG, T. Simple fabrication of a sensitive hydrogen peroxide biosensor using enzymes immobilized in processable polyaniline nanofibers/chitosan film. **Materials Science and Engineering C**, 29 (2009) 1794-1797.
- 60 A.-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators B**, 69 (2000), 153-163.
- 61 G.-VIDAL, C. A.; MUNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, C.; ALEGRET, S. Glucose biosensor strip in a three electrode configuration based on composite and biocomposite materials applied by planar thick film technology. **Sensors and Actuators B**, 52 (1998) 257-263.
- 62 XU, H.; LI, G.; WU, J.; WANG, Y.; LIU, J. A glucose oxidase sensor based on screen-printed carbon electrodes modified by polypyrrole. *Anais do 27th Annual Conference Engineering in Medicine and Biology, China* (2005) 1917-1920.
- 63 CANEVAROLO Jr., S. V. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo, Ed. Artliber, 2^a edição, 2007.
- 64 GIROTTO, E. M.; SANTOS, I. A. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: como efetuá-las corretamente. **Química Nova**, 25 (2002) 639-647.
- 65 FOSCHINI, M. Eletrossíntese e caracterização de filmes de polipirrol-2-ácido carboxílico para uso em biossensores amperométricos construídos em eletrodos miniaturizados. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos. São Carlos (2009) USP.
- 66 DENARO, A. R. Fundamentos de Eletroquímica, vol 1. São Paulo. Ed. Bliicher Ltda, 1974.
- 67 DANTAS, T. V. M. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de maedi-visna vírus de ovinos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em ciências veterinárias. Fortaleza (2004) UECE.
- 68 MACDIARMID, A. G. Polyaniline and polypyrrole: Where are we headed? **Synthetic Metals**, 84 (1997) 27-34.
- 69 DALAS, E.; SAKKOPOULOS, S.; VITORATOS, E. Thermal degradation of the electrical conductivity in polyaniline and polypyrrole composites. **Synthetic Metals**, 114 (2000) 365-368.

70 ANSARI, R. Polypyrrole conducting electroactive polymers: synthesis and stability studies. **E-Journal of Chemistry**, 13 (2006) 186-201.

71 TANG, Y.; PAN, K.; WANG, X.; LIU, C.; LUO, S. Enhancing electrochemical and electrocatalytic activities of polyaniline via co-doping with poly(styrene sulfonate) and gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 639 (2010) 123-129.

72 WOJDA, A.; MAKSYMIUK, K. Electrochemical properties of bilayers of conducting polymers: polypyrrole with poly(4-styrenesulfonate) ions/ poly(N-methylpyrrole). Studies of the permeability of the outer layer towards cations. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 424 (1997) 93-99.

73 CUI, X.; HETKE, J. F.; WILER, J. A.; ANDERSON, D. J.; MARTIN, D. C. Electrochemical deposition and characterization of conducting polymer polypyrrole/PSS on multichannel neural probes. **Sensors and Actuators A**, 93 (2001) 8-18.

74 VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, 23 (2000) 664-679.

75 COOPER, C. L.; DUBIN, P. L.; KAYITMAZER, A. B.; TURKSEN, S. Polyelectrolyte-protein complexes. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10 (2005) 52-78.

76 MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; KHOSRANEH, M.; MOHAJERANI, B.; KELAY, V.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Can amino acids protect horseradish peroxidase against its suicide-peroxide substrate? **Enzyme and Microbial Technology**, 43 (2008) 329-335.

77 MORRIN, A.; GUZMAN, A.; KILLARD, A. J.; PINGARRON, J. M.; SMYTH, M. R. Characterisation of horseradish peroxidase immobilization on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques. **Biosensors and Bioelectronics**, 18 (2003) 715-720.