

Ricardo José Branco Leote

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS ENZIMÁTICOS COM ENZIMAS OXIDASE

Mestrado em Química
Departamento de Química

FCTUC

2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ricardo José Branco Leote

Desenvolvimento e caracterização de biossensores eletroquímicos enzimáticos com enzimas oxidase

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Coordenador

Prof. Dr. Christopher Michael Ashton Brett

Co-coordenador

Dra. Mariana Emília Ghica

Setembro de 2017

Coimbra

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Gostaria de deixar um agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na execução deste trabalho:

Em primeiro lugar quero agradecer ao Prof. Dr. Christopher Brett, por me ter aceiteado no seu grupo de investigação permitindo que eu cumprisse com um objectivo académico que à muito que eu ambicionava. Quero também agradecer a ajuda e motivação que o professor deu ao longo de todo o trabalho pois foi fundamental para a execução do mesmo.

Quero deixar um agradecimento especial a Dr. Mariana Emília Ghica, que acompanhou e ajudou ao longo do projecto, estou muito grato por todo o esforço, empenho e tempo que a Dra. Mariana despendeu para me orientar, assim como estou muito grato por todas as discussões científicas que travamos, pois considero que fui muito privilegiado em ter oportunidade de aprender consigo. Muito obrigado Madi

Quero deixar um agradecimento a todo o grupo de Electroquímica e Corrosão, pela ajuda, pela paciência, pela simpatia. Quero também deixar um agradecimento por tudo o que me ensinaram, sem a ajuda deles nunca seria possível terminar este projecto.

Quero agradecer a minha família por tudo o que fizeram por mim durante todo este tempo, sem eles nunca teria chegado até aqui, em especial à minha mãe e ao meu irmão, que me ajudaram a ultrapassar este desafio, dando-me a força que por vezes me faltou. Muito obrigado.

Conteúdo

Capítulo 1 Introdução	1
1. Biossensores	1
1.1. Biossensores electroquímicos – Definição	2
1.2. Biossensores electroquímicos – Classificação	4
1.3. Transdutores electroquímicos e materiais de eléctrodo	6
1.3.1. Nanotubos de carbono	7
1.3.2. Nanopartículas metálicas	8
2. Mediadores Redox	9
2.1. Ferroceno	10
2.2. Hexacianoferratos	10
2.2.1. Azul de Prússia	11
2.3. Azinas.....	11
2.3.1. Vermelho neutro	12
3. Enzimas.....	13
3.1. Enzimas flavodependentes	14
3.1.1. Glucose oxidase	15
3.1.2. Lactato oxidase	16
3.1.3. Piruvato oxidase.....	16
3.2. Cinética enzimática	17
3.2.1. Cinética de Michaelis-Menten.....	17
3.3. Imobilização enzimática	19
3.3.1. Métodos de retenção física	19
3.3.1.1. Retenção com membranas	19
3.3.1.2. Oclusão.....	19
3.3.1.3. Encapsulamento	20
3.3.2. Métodos de ligação química	20
3.3.2.1. Reticulação.....	21
3.3.2.2. Adsorção física.....	21
3.3.2.3. Ligação covalente	22
3.3.2.4. Bioafinidade	22
4. Fundamentos de electroquímica	23
4.1. Técnicas electroquímicas.....	23
4.1.1. Voltametria cíclica (CV)	23
4.1.2. Amperometria a potencial fixo.....	24
Capítulo 2 Experimental	27
2.1. Soluções e reagentes	27

2.2.	Instrumentação	28
2.3.	Modificação dos eléctrodos de carbono vítreo.....	29
2.3.1.	Preparação e imobilização dos CNT	29
2.3.2.	Preparação e imobilização dos mediadores redox	30
2.3.2.1.	Electrodeposição de filmes de PNR em CNT.....	30
2.3.2.2.	Electrodeposição de PB em CNT	30
2.3.2.3.	Síntese de nanopartículas de PB protegidas por quitosana.....	31
2.3.3.	Imobilização de enzimas.....	31
2.3.3.1.	Biossensor de glucose sem mediador	31
2.3.3.2.	Biossensor de glucose com PNR/CNT	32
2.3.3.3.	Biossensor de lactato sem mediador	32
2.3.3.4.	Biossensor de lactato com Fc/CNT.....	32
2.3.3.5.	Biossensor de piruvato sem mediador	33
2.3.3.6.	Biossensor de piruvato com CNT	33
2.3.3.7.	Biossensor de piruvato com PB/CNT	33
2.3.3.8.	Biossensor de piruvato com PB-QUIT-NP/CNT.....	33
Capítulo 3	Resultados e Discussão.....	35
3.1.	Biossensores de glucose	35
3.1.1	Biossensor de glucose sem mediador	36
3.1.2.	Biossensor de glucose com PNR/CNT	37
3.2.	Biossensores de lactato.....	43
3.2.1.	Biossensor de lactato sem mediador	43
3.2.2.	Biossensor de lactato com Fc/CNT.....	44
3.3.	Biossensores de piruvato.....	48
3.3.1.	Biossensor de piruvato sem mediador	49
3.3.2.	Biossensor de piruvato com CNT	50
3.3.2.1.	Efeito da concentração dos CNT	50
3.3.2.3.	Efeito da imobilização do FAD	53
3.3.2.4.	Efeito da solução tampão e dos cofactores	55
3.3.3.	Biossensor de piruvato com PB e CNT	59
3.3.3.1.	Biossensor PyOx/PB/CNT.....	59
3.3.3.1.1.	Deposição de azul de Prússia.....	59
3.3.3.1.2.	Efeito de potencial aplicado.....	61
3.3.3.1.3.	Estudo do efeito do pH.....	62
3.3.3.2.	Biossensor PyOx/PB-QUIT-Np/CNT.....	63
Capítulo 4	Conclusões.....	67
	Perspectivas futuras	68

Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 - Exemplos de compostos monitorizados por biossensores.	1
Figura 1.2 - Estrutura dos três tipos de nanotubos de carbono.	8
Figura 1.3 - Estrutura química do ferroceno.	10
Figura 1.4 - Estrutura química do vermelho neutro.	12
Figura 1.5 - Estrutura quaternária da glucose oxidase.	15
Figura 1.6 - Estrutura quaternária da L-lactato oxidase.	16
Figura 1.7 - Estrutura quaternária da piruvato oxidase.	17
Figura 1.8 - Esquema dos métodos físicos de imobilização enzimática.	20
Figura 1.9 - Esquema dos métodos químicos de imobilização enzimática.	22
Figura 1.10 – Representação gráfica do potencial em função do tempo (A) e da corrente em função do potencial (B) para voltametria cíclica.	24
Figura 1.11 - Gráfico de variação do potencial com o tempo numa experiência de amperometria a potencial fixo.	25
Figura 1.12 - Exemplo de resposta numa experiência amperométrica.	25

Capítulo 2

Figura 2.1 - Instrumentos utilizados no trabalho laboratorial.	28
Figura 2.2 - Figura esquemática da célula electroquímica utilizada.	29

Capítulo 3

Figura 3.1 – Curva de calibração do biossensor GOx/GCE.	36
Figura 3.2 – Electropolimerização do vermelho neutro.	38
Figura 3.3 - Mecanismo de funcionamento do biossensor GOx/PNR/CNT/GCE.	39
Figura 3.4 - Curva de calibração do biossensor GOx/PNR/CNT/GCE.	40
Figura 3.5 - Curva de calibração do lactato para o biossensor Nafion/LOx/GCE.	44
Figura 3.6 - Gráfico de variação da corrente em função do potencial para os biossensores de lactato.	45
Figura 3.7 - Mecanismo de funcionamento do biossensor LOx/Fc/CNT/GCE.	46
Figura 3.8 - Curva de calibração do biossensor Nafion/LOx/Fc/CNT/GCE.	46
Figura 3.9 - Curva de calibração de piruvato do biossensor PyOx/GCE.	49

Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos CNT/GCE.....	50
Figura 3.11 – Curvas de calibração de piruvato dos biossensores PyOx/CNT/GCE.....	51
Figura 3.12 - Variação da corrente com o potencial aplicado no biossensor PyOx/CNT _{0,5} /GCE.	53
Figura 3.13 - Curvas de calibração de biossensores PyOx/CNT _{0,5} /GCE com FAD imobilizado e em solução.	54
Figura 3.14 - Curvas de calibração de biossensor PyOx/FAD/CNT _{0,5} /GCE com diferentes concentrações de Mg ²⁺ e TPP em tampão NaPBS.....	57
Figura 3.15 - Curvas de calibração de biossensor PyOx/FAD/CNT _{0,5} /GCE com diferentes concentrações de Mg ²⁺ e TPP em tampão Trizma-HCl.....	57
Figura 3.16 - Electrodeposição de filme de azul de Prússia.	60
Figura 3.17 - Gráfico de intensidade de corrente em função do potencial aplicado para o biossensor PyOx/FAD/PB/CNT _{0,5} /GCE.....	61
Figura 3.18 - Gráfico de intensidade de corrente em função do pH para o biossensor PyOx/FAD/PB/CNT _{0,5} /GCE.....	62
Figura 3.19 - Curva de calibração do biossensor PyOx/FAD/PB-QUIT-Np/CNT _{0,5} /GCE.....	64
Figura 3.20 - Esquema reacional do biossensor de PyOx/FAD/PB-QUIT-NPs/CNT _{0,5} /GCE. ...	64

Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1 - Classificação de transdutores de biossensores electroquímicos com os analítos correspondentes e o tipo de eléctrodos que são utilizados para a sua construção.	3
--	---

Capítulo 3

Tabela 3.1 - Parâmetros analíticos dos biossensores de glucose desenvolvidos neste trabalho e comparação com a literatura.	41
Tabela 3.2 - Parâmetros analíticos dos biossensores de lactato desenvolvidos neste trabalho e comparação com a literatura.	47
Tabela 3.3 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/CNT/GCE com diferentes concentrações de CNT.	52
Tabela 3.4 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/CNT _{0,5} /GCE com FAD imobilizado na camada enzimática ou em solução.	55

Tabela 3.5 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/FAD/CNT/GCE com duas concentrações diferentes de cofactores adicionadas em soluções tampão PBS e trizma-HCl	58
Tabela 3.6 - Parâmetros analíticos do biossensor de piruvato PyOx/FAD/PB-QUIT-Np/CNT/GCE e comparação com a literatura	65

Abreviaturas

- 6-ACA-Ácido 6-aminocaproico (*6-Aminocaproic acid*)
AuE- Eléctrodo de ouro (*Gold electrode*)
 β -CD- Ciclodextrina-Beta (β -*Cyclodextrin*)
BSA- Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
CNT- Nanotubos de carbono (*Carbon Nanotubes*)
CoHCF- Hexacianoferrato de Cobalto (*Cobalt hexacyanoferrate*)
CV- Voltametria cíclica (*Cyclic Voltametry*)
DNA- Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic Acid*)
FAD-Flavina adenina dinucleótido (*Flavin Adenine Dinucleotide*)
FIA- Análise por injeção em fluxo (*Flow Injection Analysis*)
Fc- Ferroceno (*Ferrocene*)
GA- glutaraldeído (*Glutaraldehyde*)
GCE-Eléctrodo de carbono vítreo (*Glassy Carbon Electrode*)
GOx-Glucose oxidase
HPLC-Cromatografia líquida de alta pressão (*High Pressure Liquid Chromatography*)
ISFET- Transístor de campo selectivo de iões (*Ion Selective Field Effect Transistor*)
IUBMB-União Internacional de Biofísica e Biologia Molecular (*International Union of Biophysics and Molecular Biology*)
IUPAC-União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
LOD- Limite de detecção (*Detection limit*)
LOx- Lactato oxidase (*Lactate oxidase*)
MB-azul de Meldola (*Meldola's Blue*)
3-MPA- Ácido 3-mercaptopropionico (*3-Mercaptopropionic acid*)
MPTS-Mercaptopropilmetoxisilano (*Mercaptopropil silane*)
MWCNT-Nanotubos de carbono com paredes múltiplas (*Multi Wall carbon nanotubes*)
Os(bipy)₂py-Cl-Osmium(2,2'-bipiridina)₂(4-{pirrol-1-hexil}piridina)Cl
(*Osmium(2,2' bipiridine)₂ (4-{pyrrol-1-hexil}piridine)Cl*)
NAD/NADH-Nicotinaamida dinucleotida (*nicotinamide dinucleotide*)
NR/PNR-Vermelho neutro/ Polivermelho neutro (*Neutral red/Polyneutral red*)
PANI- Polianilina (*Polyaniline*)
PBS-Tampão fosfato salino (*Sodium phosphate buffer*)
PBNP- Nanopartículas de azul de Prússia (*Prussian blue nanoparticles*)
PDDA- Poli Dialildimetilamonio (*Polydiallyldimethylammonium*)
ptGC- Carbono vítreo pirolítico (*Pyrolytic glassy carbon*)

PyOx-piruvato oxidase (*Pyruvate oxidase*)

RNA- Ácido ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

SAM- Camada auto-montada (*Self-assembled monolayer*)

SCE-Eléctrodo de calomelanos saturado (*Saturated calomel electrode*)

SPCE- Electrodo de carbono impreso (*Screen printed carbon electrode*)

tG- Tiol grafeno (*Thiol graphene*)

TPP-Tiamina pirofosfato (*Thiamine pyrophosphate*)

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos biossensores enzimáticos a partir da modificação de eléctrodos de carbono vítreo com materiais nanoestruturados, nomeadamente nanotubos de carbono e mediadores redox com imobilização de enzimas oxidase. Esta modificação dos eléctrodos convencionais visa melhorar o desempenho dos biossensores aprimorando os parâmetros analíticos.

O estudo está dividido em quatro capítulos.

O primeiro capítulo trata aspectos gerais sobre a definição, classificação, e componentes dos biossensores, transdutores electroquímicos e materiais de eléctrodo (nanotubos de carbono e nanopartículas), mediadores redox, enzimas e a sua imobilização, bem como os fundamentos de electroquímica e uma breve descrição das técnicas utilizadas.

O segundo capítulo inclui informações sobre os reagentes e instrumentação utilizada, estão descritas as condições experimentais em que foram efectuadas as medidas electroquímicas, e uma descrição detalhada da modificação efectuada para preparação de cada biossensor desenvolvido neste trabalho.

No terceiro capítulo descrevem-se e discutem-se os resultados obtidos. Este capítulo está dividido em três secções, uma para cada enzima utilizada: glucose oxidase (GOx), lactato oxidase (LOx) e piruvato oxidase (PyOx). A GOx e a LOx foram imobilizadas directamente no eléctrodo não modificado ou em cima do eléctrodo modificado com nanotubos de carbono e um mediador redox, poli(vermelho neutro) para GOx e ferroceno para LOx. A voltametria cíclica foi usado para caracterizar o comportamento electroquímico. Relativamente ao biossensor para piruvato com PyOx foi realizado um estudo mais pormenorizado. Primeiro, descreve-se o biossensor construído sem mediador, a semelhança dos outros dois anteriores; em segundo lugar um biossensor preparado com nanotubos de carbono (CNT). A seguir foi adicionado, junto com os CNT, um mediador redox, azul de Prússia, ou na forma de um filme depositado electroquimicamente ou na forma de nanopartículas depositadas quimicamente. Cada biossensor foi avaliado através de amperometria a potencial fixo, sendo os seus parâmetros analíticos retirados de curvas de calibração. No caso do biossensor com PyOx, foi feito um estudo para optimização de vários factores experimentais e foi efectuada uma comparação do desempenho obtido com o de outros biossensores da literatura.

O capítulo quatro inclui conclusões que podem ser tiradas do trabalho efectuado sobre cada um dos biossensores desenvolvidos, bem como perspectivas futuras.

Abstract

In this work, enzymatic biosensors have been developed using glassy carbon electrode modified with different nanostructured materials, namely carbon nanotubes and redox mediators with immobilized enzyme oxidases. This modification of conventional electrodes is meant to improve the biosensors performance taking into account their analytical parameters.

The study is divided in four chapters.

The first chapter is focused on general aspects about definition, classification and biosensors' components, electrochemical transducers and electrode materials (carbon nanotubes and nanoparticles), redox mediators, enzymes and their modification, as well as electrochemistry principles and a short description of the techniques used.

The second chapter includes information about reagents and instruments used, the experimental conditions for electrochemical experiments are described, and a detailed description for the preparation of each biosensor developed.

In the third chapter the results achieved are described and discussed. This chapter is divided in three sections, one for each enzyme used: glucose oxidase (GOx), lactate oxidase (LOx) and pyruvate oxidase (PyOx). GOx and LOx were directly immobilized on the unmodified electrode, or at the electrode modified with carbon nanotubes and a redox mediator, which was poly(neutral red) for GOx and ferrocene for LOx. Cyclic voltammetry was used in order to characterize the electrochemical behavior. As regarding the pyruvate biosensor with PyOx, a more detailed study was performed. First, the biosensor without mediator is described, similarly with the previous two; secondly a biosensor prepared with carbon nanotubes. Further, a redox mediator, Prussian blue was added together with CNT, or as a film, electrochemically deposited, either as nanoparticles, chemically deposited. Each biosensor was evaluated by fixed potential amperometry, their analytical parameters being calculated from calibration curves. For the PyOx biosensor an optimisation of the experimental conditions has been carried out, as well as a comparison of its performance with other biosensors from literature.

The fourth chapter includes conclusions, which can be withdrawn from the work about each of the developed biosensors, as well as future perspectives.

Capítulo 1 Introdução

1. Biossensores

O desenvolvimento de biossensores foi impulsionado pela crescente necessidade de tecnologia que permitisse a monitorização de compostos biologicamente activos em tempo real para diversos sectores como: análise clínica, controlo de qualidade ambiental e alimentar, análise de armas biológicas. Desde o primeiro biossensor desenvolvido por Clark e Lyons [1], a evolução tem sido constante e actualmente a indústria dos biossensores representa um negócio avaliado em biliões de euros por ano e permitiu uma melhoria contínua da qualidade de vida e da segurança da sociedade em geral.

Com o aumento da população mundial desenvolveram-se vários sectores da actividade humana como a agricultura, medicina, medicina veterinária e a pecuária; o crescente desenvolvimento destes e outros sectores criaram uma crescente necessidade de optimização de recursos. Após a revolução industrial a quantidade de resíduos produzidos pelo Homem aumentou continuamente durante os últimos dois séculos, mas mais recentemente foram estipulados limites máximos de emissões de gases e normas de tratamento de resíduos para garantir a sustentabilidade do nosso modo de vida. A exigência de cumprir com as metas ambientais induziu as indústrias a nível global a fazer uma auto-gestão dos seus desperdícios assim como uma auto-responsabilização ambiental.



Figura 1.1 - Exemplos de compostos monitorizados por biossensores.

Todos estes requisitos que têm vindo a ser impostos a nível industrial e a grande exigência do público em geral a nível dos cuidados de saúde e qualidade alimentar provocaram um crescente mercado de sensores e biossensores dos mais variados tipos. Na Figura 1.1 estão ilustrados alguns exemplos de biossensores que são utilizados em três áreas de especial relevância e com a maior necessidade de garantias de qualidade e capacidade de diagnóstico viáveis analiticamente.

Um sensor é um dispositivo que transforma informação do meio que contém a espécie química de interesse, num sinal analiticamente útil e selectivo. O sensor é constituído por três componentes, o elemento sensorial, o transdutor e o analisador do sinal-resposta. Um biossensor é um sensor cujo elemento sensorial é uma espécie biológica e que tem que ter elevada afinidade pelo analíto para conferir especificidade no reconhecimento do analíto. O transdutor converte o produto da reacção entre o analíto e o elemento sensorial num sinal eléctrico. Existem vários tipos de transdutores que são utilizados na construção de biossensores e os mais comuns são: electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos e térmicos, sendo apenas relevante para a discussão deste trabalho o foco em biossensores com transdutores electroquímicos [2-4].

1.1. Biossensores electroquímicos – Definição

A definição actual de biossensor electroquímico foi convencionada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), que postulou várias recomendações no que diz respeito a definição, classificação e nomenclatura de biossensores electroquímicos. O mais importante é que o elemento de reconhecimento é biológico (p.e. enzimas, anticorpos ou bactérias) e que o transdutor oxida ou reduz um produto da reacção no elemento sensorial. Um biossensor electroquímico é um dispositivo analítico integrado e autónomo e não deve ser confundido com outros sistemas analíticos como HPLC (*high pressure liquid chromatography*), GC (*gas chromatography*) e sistemas de FIA (*flow injection analysis*) que detectam analíto biológicos. Um biossensor deve ser autónomo e o seu funcionamento não deve ser dependente de outros reagentes e dos métodos de amostragem e operações necessárias ao tratamento da amostra, assim como os componentes eléctricos para amplificação do sinal eléctrico não são considerados como parte do biossensor.

Um biossensor deve ter a capacidade de ser utilizado repetidamente, sendo a regeneração da camada que contém o elemento sensorial, no caso de apenas ser possível de utilizar uma única vez deverá ser chamado de biosonda, bioindicador ou biossensor de utilização única. Os transdutores electroquímicos permitem que a detecção seja efectuada de várias formas como está classificada na Tabela 1.1 [4].

Tabela 1.1 - Classificação de transdutores de biossensores electroquímicos com os analítos correspondentes e o tipo de eléctrodos que são utilizados para a sua construção.

Método de transdução	Transdutor	Analíto
Amperométrico	Eléctrodos metálicos ou de carbono	Hidratos de carbono α -hidroxiácidos
	Eléctrodos quimicamente modificados	Álcoois, O ₂ , fosfato, fenóis, oligonucleotídeos, H ₂ O ₂ ,
Potenciométrico	Eléctrodos selectivos de iões	K ⁺ , Na ⁺ , F ⁻ , NH ₃ , CO ₂ , Cl ⁻
	Eléctrodos de vidro	
	Eléctrodos gasosos Eléctrodos metálicos	
ISFET	Transístor de campo selectivo de iões	K ⁺ , H ⁺
	Transístor de campo selectivo enzimático	
Condutimétrico	Eléctrodos interdigitados	Ureia, espécies electroactivas, oligonucleotídeos
	Eléctrodos metálicos	
	Eléctrodos quimicamente modificados	
Impedimétrico	Eléctrodos interdigitados	Ureia, espécies electroactivas, oligonucleotídeos
	Eléctrodos metálicos	
	Eléctrodos quimicamente modificados	

1.2. Biossensores electroquímicos – Classificação

A classificação de um biossensor geralmente está relacionada com a natureza do elemento de reconhecimento, do transdutor ou a combinação dos dois elementos. Existem dois tipos de mecanismos moleculares que são utilizados como elementos sensoriais em biossensores:

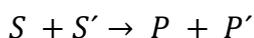
- *Biocatalíticos*

e

- *Bioafinidade ou biocomplexação*

Biossensores biocatalíticos utilizam como elemento sensorial um elemento biológico que catalisa uma reacção bioquímica, seja uma macromolécula como uma enzima ou uma célula por inteiro ou um bocado de tecido. O funcionamento dos elementos sensoriais que integram esta classe de biossensores é semelhante, visto que catalisam uma reacção em que ocorre uma variação na concentração de substrato, ou seja, encontra-se fora do equilíbrio.

Existem três tipos de biossensores biocatalíticos enzimáticos, sendo que uma reacção enzimática segue um esquema reaccional do tipo:



Em que S é o substrato, S' o co-substrato e P e P' são os produtos da reacção.

Pode-se tirar partido da actividade de mais do que uma enzima para efectuar a determinação de um analíto ou de um produto que não apresente actividade electroquímica. Portanto, foram desenvolvidos três tipos de construção de elementos de reconhecimento de biossensores enzimáticos:

Mono-enzimáticos: este tipo de biossensores faz uso de apenas uma enzima como elemento de reconhecimento, a determinação do analíto é feita pelo consumo do mesmo ou do co-substrato. Pode também ser efectuada a determinação pelo efeito inibitório de um dos componentes da reacção.

Bi-enzimáticos: Imobilização de duas enzimas em que uma delas converte o substrato inicial num substrato para segunda enzima. A segunda enzima, por sua vez, converte o substrato numa espécie electroactiva que é medida pelo transdutor. As reacções são estequiometricamente equivalentes, logo a relação de concentrações é directa e a corrente é proporcional à concentração do substrato inicial.

Multi-enzimáticos: o modo de funcionamento destes biossensores assenta nos mesmos princípios que os biossensores bi-enzimáticos, no entanto utilizam um maior número de enzimas que reagem em cascata para a determinação de um ou mais analíto.

Biossensores de biocomplexação ou bioafinidade funcionam de forma diferente de os biocatalíticos, pois não se mede o consumo/formação de substrato/produto, mas sim um equilíbrio de interacção do analíto com macromoléculas. A interacção entre o analíto e as macromoléculas é medida directamente pelo detector; ou em alguns casos, através de um elemento biocatalítico que monitoriza a biocomplexação entre o analíto e o seu receptor. Os complexos macromoleculares que são mais comuns neste tipo de biossensores são: mRNA, RNA, mDNA, DNA, aptâmeros de DNA e RNA e também anticorpos.

Apesar dos mais recentes desenvolvimentos na produção deste tipo de biossensor, existem algumas limitações. A necessidade de a camada do elemento de reconhecimento estar em contacto directo com a solução de analíto cria problemas em termos da estabilidade do biossensor, reduzindo assim o tempo de vida do biossensor e limitando o número de utilizações possíveis. Devido ao seu modo de funcionamento assentar num estado de equilíbrio, este tipo de biossensores tem geralmente uma gama linear pequena e não possibilita a monitorização contínua. No contexto do trabalho desenvolvido, a discussão deste tipo de biossensores neste capítulo é apenas informativa e o restante texto cingir-se-á apenas a biossensores biocatalíticos.

A transdução do sinal para biossensores biocatalíticos pode ser efectuada por três vias:

- **Amperométrica:** a detecção por amperometria consiste na medição de corrente gerada pelas reacções redox que ocorrem na camada do elemento sensorial, quando aplicado um potencial constante. São necessários 3 eléctrodos: trabalho, auxiliar e referência. O processo biocatalítico tem lugar na superfície do eléctrodo de trabalho, a corrente medida é proporcional à concentração de analíto e a resposta é linearmente dependente da concentração de analíto.

- **Potenciométrica:** a potenciometria consiste na determinação do potencial entre dois eléctrodos, um eléctrodo indicador e um de referência ou dois de referência separados por uma membrana com permeabilidade selectiva, quando não há fluxo de corrente eléctrica entre eles. Pode ser utilizado um eléctrodo de vidro, eléctrodo selectivo de iões (ISE) ou transístores de campo selectivo de iões (ISFET). A diferença entre os potenciais dos eléctrodos de referência e indicador é proporcional à actividade dos iões ou à concentração de gases (dissolvidos).

- **Impedimétrica:** a detecção consiste na medição da resposta a uma pequena perturbação sinusoidal do potencial ou corrente aplicada. A resposta a esta perturbação manifesta-se numa diferença de fase e de amplitude em relação à perturbação aplicada. A razão entre o potencial e a corrente é a impedância, Z , e reflecte as diferenças de fase e amplitude do potencial e corrente. A análise da impedância permite tirar conclusões sobre os processos interfaciais de eléctrodo, como separação (equivalente a condensadores), transferência de carga (equivalente a resistências) e difusão de espécies electroactivas. Mais recentemente este tipo de biossensores impedimétricos tem atraído atenção, e foi demonstrado que o conceito de um biossensor enzimático de detecção quantitativa por via impedimétrica é uma alternativa viável [5].

A detecção do analíto pode ser efectuada de duas formas:

- **Directa** - Medir continuamente o consumo de analíto ou a produção de produto no decorrer da reacção catalisada pelo biocatalisador.

- **Indirecta** - A detecção indirecta é efectuada através da inibição da actividade biológica do biocatalisador. Habitualmente este processo é irreversível, especialmente no caso de imunossensores; no entanto, existem casos em que a actividade pode ser regenerada por um simples tratamento químico [4]. Esta forma de detecção é bastante utilizada na monitorização de pesticidas e de iões de metais pesados.

1.3. Transdutores electroquímicos e materiais de eléctrodo

Como referido anteriormente, um biossensor é composto por um elemento sensorial e um transdutor de sinal. O transdutor é responsável por efectuar a conversão do sinal gerado pela reacção bioquímica, numa grandeza física, no caso dos transdutores electroquímicos o sinal é convertido em uma corrente eléctrica. Transdutores electroquímicos são compostos por materiais condutores ou semicondutores, pois a transdução de sinal é feita pela via electrónica e a mobilidade dos electrões deve ser eficaz e favorável. Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidos novos materiais para aplicações electroquímicas e electrónicas, não só em biossensores, mas em vários outros tipos de dispositivos que necessitem de integrar na sua constituição materiais com capacidade de conduzir correntes eléctricas de baixa intensidade.

Uma das limitações que surge na aplicação de alguns materiais para estes fins é a sua abundância e conseqüentemente o custo. Por isso, é vantajoso utilizar materiais de abundância elevada como carbono em vez de metais nobres como ouro, prata e platina. Surgiram os eléctrodos

compostos por carbono, grafite, carbono vítreo, carbono amorfo, pasta de carbono, polímeros e mais recentemente foram desenvolvidas e sintetizadas novas formas estruturais de carbono como nanotubos de carbono e grafeno. Estes materiais mais recentes são classificados como nanomateriais ou materiais nanoestruturados devido ao seu arranjo estrutural ter dimensões na ordem dos nanómetros ($\text{nm} = 10^{-9} \text{ m}$) [6].

1.3.1. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono foram sintetizados pela primeira vez em 1991 por S. Iijima [7]. Este material de carbono é composto por carbono sp^2 pirolítico; o seu diâmetro encontra-se entre 0,6 nm para nanotubos de parede única (SWCNT-*single wall carbon nanotubes*) e os 100 nm para nanotubos de parede múltipla (MWCNT-*multi wall carbon nanotubes*). O seu comprimento, da ordem de micrometros, é muito superior ao diâmetro; esta característica atribui-lhe um rácio de diâmetro/comprimento muito elevado. Desta forma pode ser considerado um material unidimensional, o que lhe confere propriedades mecânicas e electrónicas notáveis face aos materiais de carbono convencionais, como carbono vítreo. A estabilidade da estrutura dos nanotubos depende do arranjo pentagonal (defeitos) e hexagonal de carbono sp^2 e do ordenamento desses sectores. A propagação desse arranjo cria uma estrutura contínua e fechada, com elevada resistência mecânica e condutibilidade eléctrica.

Existem 3 arranjos distintos de carbono em nanotubos, *armchair*, *zig-zag*, e *chiral*, Figura 1.2. Cada uma destas classes de nanotubos apresenta diferenças morfológicas relativamente ao eixo quiral do cilindro, nomeadamente na forma das ligações entre os átomos de carbono. Estas diferenças advêm da distribuição dos pentágonos e hexágonos da folha de grafite que foi utilizada para a síntese dos nanotubos.

Existem 3 métodos para sintetizar nanotubos: deposição de vapor químico, arco eléctrico e ablação por laser. O método utilizado por S. Iijima foi descarga de arco eléctrico com 2 eléctrodos de grafite numa atmosfera de argón; no entanto, é necessário fazer uma purificação dos nanotubos devido ao grau de impurezas que resultam da síntese por este método. Ablação por laser é um método que consiste em incidir um laser contínuo ou pulsado, em uma folha de grafite de forma a aquece-la até 1200°C numa atmosfera gasosa de argón ou hélio, formando um vapor muito quente, que rapidamente arrefece e condensa sobre uma superfície que serve como catalisador, formando nanotubos. Na deposição de vapor químico, uma fonte de carbono, como metano, acetileno ou monóxido de carbono, é aquecido por uma fonte como uma resistência ou plasma. O aquecimento da fonte de carbono quebra as ligações da molécula gasosa para formar carbono atómico, que

difunde pelo substrato e entra em contacto com o catalisador, normalmente um metal de transição do primeiro período. Este método apresenta vantagens, uma delas é o facto de ser possível obter um alinhamento dos nanotubos e controlo de parâmetros dimensionais como diâmetro e comprimento à escala nanométrica [7-9].

Os nanotubos de carbono são moléculas pouco reactivas e muito hidrofóbicas, por isso é necessário funcionalizar estas estruturas. A funcionalização dos nanotubos é normalmente efectuada em meio ácido e em agitação onde se dá a inserção de grupos carboxílicos, -COOH, nas extremidades e defeitos de regiões não-hexagonais. Neste processo há uma destruição parcial dos nanotubos, mas que é necessário para que a interação entre analitos e os nanotubos seja favorável, assim como a sua dispersão e solubilização nas mais diversas matrizes, como soluções tampão, quitosana, dimetilformamida (DMF), Nafion, entre outros [10-12].

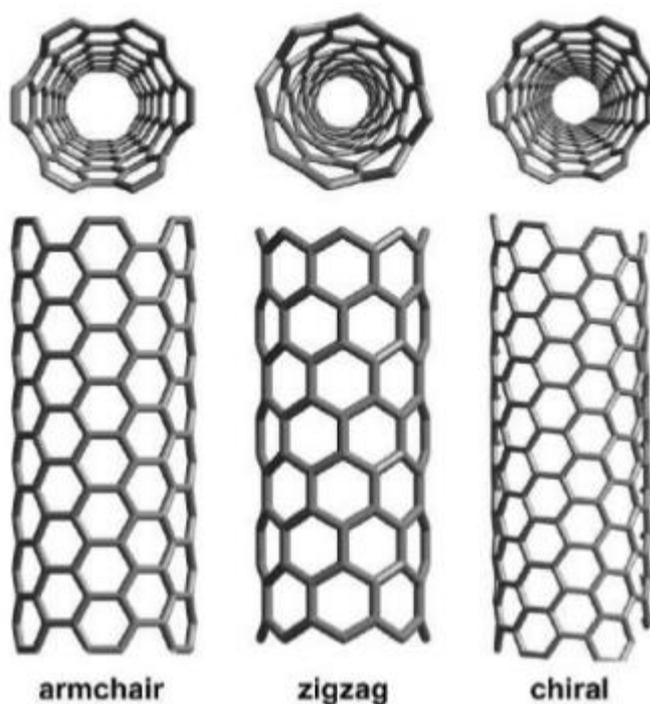


Figura 1.2 - Estrutura dos três tipos de nanotubos de carbono.

1.3.2. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas têm vindo a atrair imenso interesse devido às suas potenciais aplicações. As características físico-químicas desta classe de nanomateriais são dependentes da sua dimensão; com a diminuição do diâmetro médio das partículas dá-se um incremento significativo da sua razão massa/carga de superfície e da sua dispersibilidade em solução. O aumento da razão massa/carga e a dispersibilidade de partículas de menores dimensões criam uma

área electroactiva superior e geralmente com efeito electrocatalítico maior que um filme do mesmo metal.

Estas propriedades são exploradas na medicina, como agentes anti-tumorais, e como electrocatalisadores em sensores electroquímicos, sendo o metal mais promissor nestas áreas o ouro. Existem várias metodologias para sintetizar nanopartículas metálicas, o mais conhecido sendo o método de Turkevich, redução por citrato [13]. Mais recentemente outras metodologias mais “verdes” foram desenvolvidas para vários metais nobres para evitar o uso de compostos químicos de elevada toxicidade e ambientalmente nocivos com recurso a fontes vegetais como ginkgo biloba, a fungos e algas [14-17].

2. Mediadores Redox

Um mediador é uma espécie química que serve como dador/aceitador de electrões numa reacção enzimática. O seu papel é o de ajudar regenerar o estado de oxidação da enzima e do seu centro activo. Na natureza este papel é desempenhado por oxigénio ou dióxido de carbono, mas estes mediadores naturais apresentam os potenciais redox muito elevados. Para ultrapassar esta limitação utilizam-se mediadores artificiais que, tal como os mediadores naturais, regeneram o estado de oxidação da enzima. No entanto, a escolha do mediador deve ser cuidadosa e deve seguir alguns critérios, tais como [6]:

- Não pode ser tóxico
- Tem de ser estável em ambos os estados de oxidação
- Ter/apresentar uma cinética reversível e um potencial de regeneração baixo
- Reagir rapidamente com a enzima e deve ser capaz de difundir entre a enzima e o transdutor com facilidade
- Ter propriedades electroquímicas independentes do pH
- Não pode reagir com oxigénio

Neste trabalho foram utilizados alguns dos mediadores mais comuns, tais como: ferroceno, azul de Prússia, poli(vermelho neutro), que serão descritos nas secções seguintes.

2.1. Ferroceno

O ferroceno é um composto organometálico de ferro com dois anéis ciclopentadienil ($\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$), Figura 1.3. O ferroceno é um composto estável, não tóxico e extremamente insolúvel na sua forma neutra e por isso há alguns aspectos a considerar antes da sua utilização como mediador. Para melhorar a hidrofiliabilidade do composto, são preparados derivados de ferroceno por adições de grupos alcóxidos e outros grupos funcionais. A facilidade de modificação levou à utilização de derivados de ferroceno nas mais diversas aplicações desde aditivos para combustíveis diesel a tratamentos anticancerígenos e hemáticos.

O ferroceno é utilizado como mediador redox em biossensores enzimáticos devido às suas propriedades, é reversível, tem um potencial de oxidação de $\approx 0,4 \text{ V vs SCE}$, na sua forma reduzida é altamente solúvel, o que auxilia a difusão do ferroceno entre a enzima e o transdutor, o que pode levar à perda de mediador. No entanto, este problema pode ser resolvido utilizando uma matriz de quitosana quando se efectua a imobilização por reticulação, por glutaraldeído, ou por outros métodos como a utilização de uma membrana polimérica de Nafion [18].

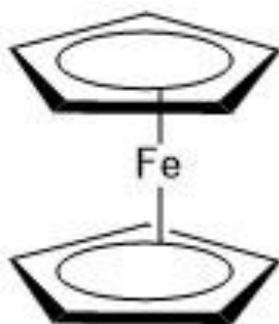


Figura 1.3 - Estrutura química do ferroceno.

2.2. Hexacianoferratos

Os hexacianoferratos são complexos de coordenação entre um ião bivalente e hexacianoferrato (III). Estes compostos formam uma estrutura octaédrica, em que o ferro está rodeado de átomos de carbono e o metal, M(II) por átomos de azoto. Alguns iões monopositivos/negativos e moléculas de água coordenam em certos locais da estrutura tridimensional do complexo compensando cargas localizadas, estabilizando a estrutura. As vantagens destes complexos metálicos são a resistência a condições extremas de pH e a diminuição da barreira cinética na oxidação/redução de peróxido de hidrogénio, que é um dos produtos mais comuns em reacções enzimáticas de oxidação/redução.

Estes mediadores podem ser preparados em várias formas, nomeadamente; filmes, pós, nanopartículas, com utilização de vários metais de transição como Cr, Mn, Co, Ni, Cu e Fe, sendo este último um hexacianoferrato com ferro (II) como o nome de azul de Prússia que foi utilizado neste trabalho. Estes complexos têm sido utilizados como mediadores inorgânicos em biossensores enzimáticos devido à facilidade que apresentam em detectar oxigénio e peróxido de hidrogénio das reacções catalisadas pelas enzimas oxidase pelo carácter reversível da sua actividade electrocatalítica e devido à formação de filmes bem definidos [19,20].

2.2.1. Azul de Prússia

O primeiro hexacianoferrato descoberto foi o azul de Prússia (PB-*Prussian blue*), hexacianoferrato de ferro II e ferro III, pelo produtor de tintas do século XVIII Diesbach. No entanto, apenas em 1978 Neff depositou o primeiro filme de PB numa folha de platina por voltametria cíclica [21] e alguns anos depois, iniciaram-se os estudos das propriedades electroquímicas deste composto. Foram depositados filmes de PB em diversos materiais de eléctrodo como carbono vítreo, ouro, platina, nanotubos de carbono (este trabalho) e as suas propriedades electroquímicas foram investigadas. Itaya et al. [22] demonstraram as propriedades electroquímicas mais relevantes deste composto como mediador redox, nomeadamente a facilidade na redução de oxigénio e do peróxido de hidrogénio, bem como a facilidade de oxidação do peróxido de hidrogénio. Estas características devem-se ao arranjo geométrico da rede cristalina do complexo que cria cavidades onde O_2 e H_2O_2 difundem livremente e são reduzidos/oxidados. Apesar de este facto ser bem aceite entre a comunidade científica, ainda existem grandes incertezas quanto à estrutura do complexo e consequentemente alguma incerteza em relação ao mecanismo da reacção de oxidação de peróxido de hidrogénio [23-28].

2.3. Azinas

Azinas são compostos aromáticos heterocíclicos utilizados como indicadores redox e marcadores biológicos. Existem muitos derivados de azinas dos quais se destacam as fenazinas, fenoxoazinas e as fenotioazinas. A utilização de filmes de polímeros electroactivos como mediadores é uma estratégia muito comum no desenho de biossensores enzimáticos, e as azinas são muito utilizadas com este fim devido às suas propriedades electroquímicas e à capacidade de mediar as reacções redox enzimáticas. Neste trabalho, a fenazina utilizada foi o vermelho neutro, na forma polimerizada.

2.3.1. Vermelho neutro

Vermelho neutro (NR-*Neutral Red*), Figura 1.4, é um composto pertencente à classe de compostos chamados de fenazinas. O NR é utilizado como indicador de pH em sistemas biológicos, marcador em estudos virais e na detecção óptica e electroquímica de DNA. O primeiro estudo de electropolimerização do NR foi publicado em 1970 por Nikolskii et al. e desde então a sua aplicação como mediador redox em biossensores electroquímicos foi investigada para a detecção de diversos analítos como glucose, lactato, piruvato, glutamato etc. A polimerização do NR ocorre por via radicalar e a estrutura da cadeia polimérica apresenta um maior número de ramificações com o aumento do número de radicais gerados pela aplicação do potencial. Controlando o potencial aplicado e o pH do meio, é possível controlar a estrutura do filme polimérico. Além de ramificações, há a formação de dímeros e tetrâmeros que processa através da formação de ligações covalentes C-N do carbono orto relativamente ao grupo N(R₂) e o grupo amina. O processo de polimerização do NR não afecta o sistema π conjugado do monómero e desta forma mantém o seu potencial redox e as suas propriedades ópticas após a formação do polímero. A condutividade do polímero em solução é influenciada pela dopagem do filme polimérico por aniões da solução a potenciais suficientemente positivos. Esta dopagem, do tipo-n, aumenta a condutividade do polímero por aumento da densidade de carga do polímero, provocando uma diminuição do hiato energético entre as bandas de condução e de valência. Para filmes de PNR utiliza-se NO₃⁻, por catalisar a electropolimerização e estabilizar a estrutura do filme polimérico [29-32].

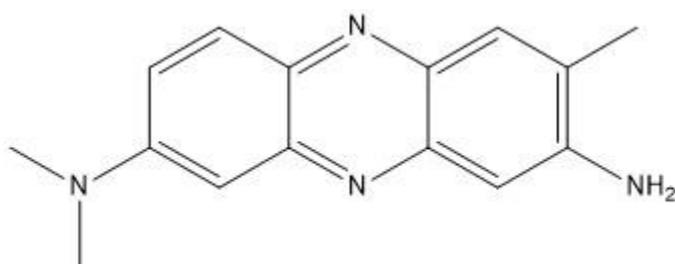


Figura 1.4 - Estrutura química do vermelho neutro.

3. Enzimas

Um organismo é um sistema complexo onde ocorrem milhares de reacções químicas; algumas destas reacções nunca ocorreriam nas condições que um sistema biológico necessita para ser sustentável. O controlo e regulação dos processos bioquímicos de um organismo é levado a cabo por enzimas. Enzimas são proteínas que actuam como catalisadores sobre essas reacções, assim como controlam e regulam a extensão dessas mesmas reacções. Estas características devem-se à especificidade da interacção entre a enzima e o seu substrato assim como uma complementaridade electrostática entre ambos. Existe um grande número de enzimas e substratos e por isso existe a necessidade de classificar as enzimas. O nome de uma enzima possui geralmente o sufixo *-ase* que é indexado ao nome do substrato ou a um conjunto de palavras que descreve a reacção catalisada. O tipo de reacção que é catalisada é muito menos numeroso que o número de reacções em si, logo a classificação de enzimas em função do tipo de reacção que é catalisada é feita em 6 classes que são subdivididas em subclasses e sub-subclasses de acordo com as recomendações da IUPAC e da IUBMB (International Union of Biophysics and Molecular Biology).

Oxirreductases: catalisam reacções de oxidação/redução

Transferases: catalisam reacções de transferência de grupos funcionais

Hidrólases: catalisam reacções de hidrólise

Liases: catalisam reacções de eliminação de ligações duplas

Isomerases: catalisam reacções de isomerização

Ligases: catalisam a formação de novas ligações acopladas com a hidrólise da ATP

As enzimas são catalisadores muito diferentes dos catalisadores químicos habituais em quatro aspectos: aumento das constantes de equilíbrio em ordens de grandeza de 10^6 - 10^{12} , elevada especificidade, condições de reacção brandas em temperatura e pH e capacidade regulatória da reacção. Estas características devem-se à estrutura da enzima, em que se distinguem 4 níveis: primária, secundária, terciária e quaternária.

A estrutura primária é composta pela sequencia dos aminoácidos da(s) cadeia(s) polipeptídica(s).

A estrutura secundária corresponde ao arranjo espacial da estrutura primária onde ocorre uma distorção dos ângulos C-O-N-C para minimizar o contacto entre as cadeias laterais dos aminoácidos da cadeia peptídica.

A estrutura terciária descreve o arranjo espacial dos elementos estruturais secundários onde se inserem especificamente todos os átomos das cadeias peptídicas e das cadeias laterais.

A estrutura quaternária é uma associação de subunidades terciárias por interacções de van der Waals; geralmente são proteínas de grande dimensão e massas moleculares elevadas (< 100 kD). A enzima é estabilizada por forças intermoleculares como pontes de hidrogénio, forças de van der Waals e por interacção com iões metálicos (pontes salinas) adquirindo um arranjo espacial mais favorável termodinamicamente.

A estrutura da enzima é composta por dois sectores, o centro activo e o suporte proteico. A reacção ocorre no centro activo da enzima, mas a ligação do substrato é assistida pelo suporte proteico que adequa a sua estrutura devido à interacção do substrato com os aminoácidos do invólucro proteico, este ajuste é chamado de *induced fit*. Muitas enzimas requerem grupos prostéticos, co-substratos, cujo papel é alterar a estrutura da enzima de forma a activa-la e para que a estrutura adquira uma conformação mais favorável para a ligação do substrato, e cofactores para activar o centro activo tornando-o mais reactivo, para que a catálise da reacção seja eficiente e possibilite a sua regeneração. Este modelo faz parte da teoria de ligação enzimática *chave-fechadura*, onde se associa a ligação não-covalente do substrato com a enzima formando o complexo enzima-substrato (ES) este processo segue um comportamento cooperativo [33].

3.1. Enzimas flavodependentes

As enzimas oxidases catalisam reacções de oxidação/redução que em condições normais necessitavam de condições muito agressivas para ocorrerem. As reacções redox enzimáticas ocorrem mediadas por cofactores; estas moléculas têm a capacidade de transferir mais facilmente electrões para um aceitador e desta forma promover a reacção.

Um dos cofactores mais comuns de enzimas oxidases é a flavina adenina dinucleotídeo ou FAD. A maioria das oxidases apresenta no seu centro activo uma ou mais moléculas deste co-factor, que reduz o oxigénio a peróxido de hidrogénio.

As oxidases são muito utilizadas na construção de biossensores enzimáticos e um dos métodos de detecção é precisamente através da regeneração do FAD ou FADH₂. Dependendo da enzima em questão, a regeneração do FAD pode ocorrer em potenciais muito diferentes. O FAD encontra-se no interior da enzima e algumas enzimas têm uma região chamada de bolso profundo,

onde se encontra ligado o FAD. Com o aumento da profundidade do bolso torna-se mais inacessível e por isso é necessário a aplicação de um potencial mais elevado para promover a regeneração do FAD ou FADH₂ [33].

Neste trabalho foram utilizadas três enzimas oxidases que utilizam o FAD ou FMN, flavina mononucleotídeo, que é um cofactor semelhante ao FAD, mas com apenas um nucleotídeo. Todas elas operam a potenciais diferentes, positivos e negativos, devido à diferença de acessibilidade do mediador para reagir com o FAD. As enzimas utilizadas neste trabalho são glucose oxidase, lactato oxidase e piruvato oxidase. Nas secções que se seguem estão apresentadas breves descrições destas enzimas.

3.1.1. Glucose oxidase

Glucose oxidase é uma enzima que pertence à classe de enzimas oxirreductases, a sua acção incide sobre um dos isómeros de glucose, β -D-glucose. É uma proteína com estrutura quaternária dimérica, composta por duas sub-unidades, cada uma com uma molécula de FAD no seu centro activo, Figura 1.5.

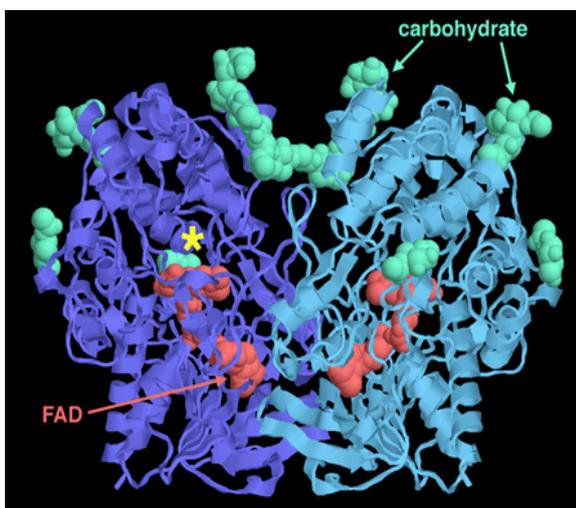


Figura 1.5 - - Estrutura quaternária da glucose oxidase, com o cofactor FAD e hidratos de carbono em evidência. Imagem retirada de [34].

A reacção catalisada é a oxidação de β -D-glucose a D-glucono-1,5-lactona que sofre hidrólise espontaneamente formando D-ácido glucónico; a oxidação ocorre na presença de oxigénio como co-substrato, sendo este reduzido a peróxido de hidrogénio. A região do centro activo das sub-unidades da enzima onde se encontra o FAD é composta por segmentos secundários não contínuos, nomeadamente, 6 folhas β antiparalelas, criando uma cavidade profunda, chamado

de bolso profundo (*deep pocket*) onde se encontra a flavina. Os aminoácidos que são responsáveis pela interacção com o substrato são triptofano, aspargina e fenilalanina, enquanto que os aminoácidos que integram a região do centro activo e catalisam a reacção são histidina, ácido aspártico e tirosina [35,36].

3.1.2. Lactato oxidase

Lactato oxidase pertence a uma sub-classe de enzimas, α -hidroxiácido oxidase e catalisa a oxidação do lactato a piruvato. A reacção ocorre com oxigénio como co-substrato formando peróxido de hidrogénio. O centro activo da enzima é composto por dois segmentos, um da interacção e outro onde se processa a reacção. A interacção do lactato com o centro activo é efectuada pelos aminoácidos histidina, tirosina, lisina e aspargina, enquanto que a reacção de oxidação ocorre mediada FMN. A sua estrutura quaternária é uma estrutura tetramérica e encontra-se apresentada na Figura 1.6 [36].

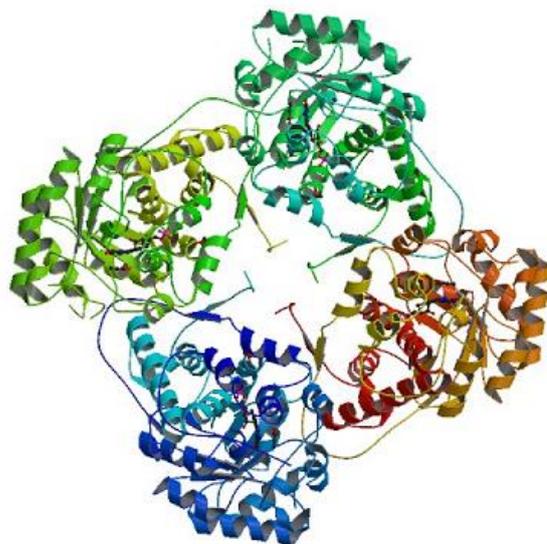


Figura 1.6 - Estrutura quaternária da L-lactato oxidase. Imagem retirada de [38].

3.1.3. Piruvato oxidase

Piruvato oxidase, Figura 1.7, catalisa a reacção de descarboxilação do ácido pirúvico juntamente com fosfato e oxigénio para formar acetilfosfato, dióxido de carbono e peróxido de hidrogénio. A sua estrutura é tetramérica mas as unidades básicas funcionais desta enzima são dímeros, cada um contendo FAD, TPP e um metal bivalente no centro activo. O arranjo estrutural da enzima, particularmente a localização dos cofactores que se encontram em domínios à

superfície sugere que o mecanismo de oxidação tem duas etapas distintas, onde ocorre a transferência de um electrão em cada uma delas [39-41].

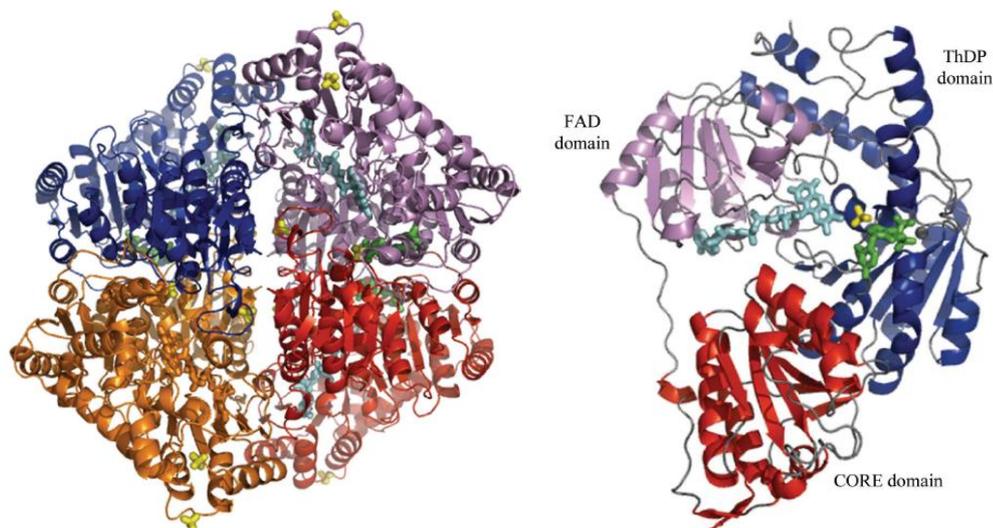


Figura 1.7 - Estrutura da enzima piruvato oxidase. À esquerda a estrutura quaternária da enzima, à direita um dos monómeros com as regiões do FAD, TPP e centro proteico em evidência, de [41].

3.2. Cinética enzimática

As enzimas catalisam um grande número de reacções. A maior parte das enzimas actua num só substrato, porém podem reagir com mais do que uma molécula de substrato porque possuem mais do que um centro activo e segue a lei de um processo cooperativo. A velocidade das reacções enzimáticas pode muitas vezes ser descrita por uma lei cinética de primeira ordem, denominada cinética de Michaelis-Menten, em honra aos cientistas que criaram o modelo cinético que melhor se adequa às observações experimentais.

3.2.1. Cinética de Michaelis-Menten

No modelo, a velocidade da reacção enzimática segue uma cinética de primeira ordem. Porém, é necessário contextualizar o esquema reaccional e o mecanismo pelo qual se processa a reacção [33]. O esquema é:



O mecanismo considera que E, a enzima, e S, o substrato reagem formando o complexo enzima-substrato, ES. Após a formação do complexo, o sistema evolui em dois sentidos, ou reverte e forma novamente E e S, ou evolui no sentido da libertação dos produtos P com regeneração da

enzima E. Por isso assumimos como aproximação que a variação de [ES] se encontra num estado estacionário

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (2)$$

Como a velocidade da reacção é pela variação da concentração dos produtos da reacção, i.e. [P], assumimos como condição de fronteira que a velocidade máxima é

$$\frac{d[P]}{dt} = V = k_2[ES] \quad (3)$$

Assim

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

Uma vez que no estado estacionário $\frac{d[ES]}{dt} = 0$, resulta que

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (4)$$

fazendo o balanço de massas para determinar a concentração total de enzima $[E]_T$

$$[E]_T = [E] + [ES] \Leftrightarrow [E] = [E]_T - [ES] \quad (5)$$

Substituindo na expressão (4) resulta,

$$k_1([E]_T - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6)$$

e re-arranjando a expressão

$$k_1[E]_T[S] = [ES](k_{-1} + k_2 + k_1[S]) \quad (7)$$

que pode ser escrita como

$$[E]_T[S] = [ES] \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S] \right) = [ES] (K_M + [S]) \quad (8)$$

Em (8) a constante de Michaelis-Menten K_M é dada por

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

e resolvendo em ordem a [ES] resulta

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (9)$$

Uma vez que a velocidade máxima é $V_{max} = k_2[ES]$ obtém-se

$$\frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} = k_2[ES]; \quad k_2[E]_T = V_{max} \quad (10)$$

Finalmente a expressão para a velocidade da reacção é

$$\frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} = V \quad (11)$$

3.3. Imobilização enzimática

O elemento sensorial do biossensor deve estar em contacto directo com o transdutor, por isso desenvolveram-se vários métodos de imobilização enzimática em que se retém a enzima em contacto directo com o transdutor mantendo a sua estrutura o mais próxima do seu estado nativo possível, para conservar o máximo da sua actividade. Naturalmente, sempre que se imobiliza uma enzima a sua actividade é diminuída. Devido à diversidade de estruturas, algumas enzimas podem não ser tão reactivas numa certa matriz ou a sua imobilização pode não ser fácil e ocorrer lixiviamento da enzima. Por isso, têm sido desenvolvidos métodos de imobilização que sejam eficientes em dar resposta a estas necessidades. Podemos distinguir duas vertentes destes métodos, métodos de imobilização de ligação química e de retenção física [42,43].

3.3.1. Métodos de retenção física

Os métodos de retenção física são os mais antigos que foram aplicados na construção dos primeiros biossensores. Apresentam a vantagem de não alterar a estrutura da enzima devido à ausência da formação de novas ligações mas têm a desvantagem de ter um tempo de vida mais curto e de ser necessário uma maior quantidade de enzima em relação a outros métodos [42,43].

3.3.1.1. Retenção com membranas

Este método de imobilização foi o primeiro método desenvolvido para imobilizar uma camada enzimática sobre a superfície de um eléctrodo. Este método consiste na retenção da camada enzimática por uma membrana de diálise presa por um anel de borracha. A sensibilidade do biossensor depende da camada enzimática, por isso é conveniente que tenha uma espessura significativa, a membrana deve ser permeável aos substratos e aos produtos da reacção enzimática e reter eficazmente a enzima.

3.3.1.2. Oclusão

O método de oclusão consiste na retenção da enzima em cavidades de uma matriz polimérica porosa, a oclusão da enzima sendo feita durante a polimerização dos monómeros que se encontram em suspensão juntamente com a enzima e um iniciador. A matriz pode ser constituída por um gel ou fibras, mantendo a estrutura da enzima intacta uma vez que não se formam ligações entre os

grupos amina da superfície enzimática. Para que a imobilização por oclusão seja eficaz, é necessário um controlo rigoroso das condições de polimerização, o que torna o processo pouco reprodutível. Uma das desvantagens é a perda de enzima por degradação da estrutura porosa da matriz e dos poros que servem de suporte para a enzima, levando a uma perda de sensibilidade.

3.3.1.3. Encapsulamento

O método de encapsulamento de biomoléculas é muito utilizado em várias aplicações desde farmacêuticas a alimentares. Os últimos desenvolvimentos nas áreas dos géis permitem explorar outras alternativas de imobilização de enzimas por encapsulamento para aplicação em biossensores. Os princípios fundamentais desta técnica são um pouco semelhantes à oclusão mas no encapsulamento a membrana semipermeável envolve mais do que uma molécula de enzima. O encapsulamento é feito por membranas que envolvem a enzima, permitindo a circulação de reagentes e produtos através de poros. As membranas podem ser poliméricas, vesículas lipídicas, polielectrólitos e em fase sol-gel. As principais desvantagens deste método são a grande quantidade de enzima que é necessária para que o encapsulamento seja eficiente e a dificuldade de adsorção da mesma à superfície do eléctrodo.

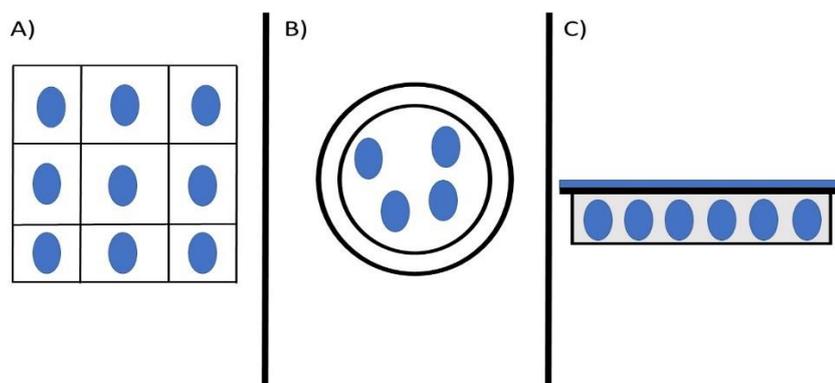


Figura 1.8 - Esquema dos métodos físicos de imobilização enzimática: (A) oclusão, (B) encapsulamento, (C) retenção com membranas.

3.3.2. Métodos de ligação química

A imobilização por ligações químicas é feita com a formação de ligações covalentes com os grupos reactivos da superfície proteica da enzima, de modo que a enzima pode ser desactivada devido à formação de um excesso de ligações. Os métodos mais convencionais são: reticulação, adsorção física, ligação ao suporte, ligação covalente e bioafinidade [42,43].

3.3.2.1. Reticulação

No método de reticulação, são formadas ligações covalentes entre os grupos amina dos aminoácidos que se encontram na superfície externa da enzima como, por exemplo, lisina e histidina. Para efectuar a reticulação é utilizado um agente reticulante, que deve ser um composto bi-funcional para ter a capacidade de estabelecer ligações covalentes nas suas extremidades; dessa forma é criada uma rede em que a enzima se encontra imobilizada sobre o transdutor. Um dos compostos mais utilizados para efectuar a imobilização enzimática por este método é o glutaraldeído (GA). Um dos problemas que surge na utilização deste método, é a falta de controlo na orientação da enzima e até no local onde se estabelece a ligação covalente, o que pode afectar a actividade da enzima, podendo impedir ou dificultar a difusão do substrato até ao centro activo, ou criar uma ligação covalente num local que pode levar à sua desactivação. Para melhorar a eficácia da imobilização da enzima, utiliza-se um espaçador (“spacer”) que geralmente é uma proteína com uma superfície com abundância de grupos amina, como por exemplo a albumina sérica bovina (*BSA-bovine serum albumin*). Geralmente é utilizado um excesso de BSA, para que a enzima seja melhor distribuída por toda a superfície do eléctrodo, em um ambiente químico favorável, melhorando a sua orientação e criando locais com boa disponibilidade física para a difusão do substrato/produzidos, assim como aumentar a robustez da enzima a variações das condições do meio como pH, temperatura e força iónica.

3.3.2.2. Adsorção física

A imobilização enzimática por adsorção física é feita através de interações intermoleculares entre a enzima e o suporte, que podem ser: pontes de hidrogénio, iónicas, electrostática e van der Waals. É um método simples e barato; a ligação ao suporte é feita por evaporação do solvente da solução enzimática, após a evaporação a enzima é mantida em contacto com o transdutor por influência das forças intermoleculares. Devido a isto, a imobilização é dependente de condições como pH e força iónica, por isso é sempre necessário fazer uma optimização das condições da imobilização para que a estabilidade da enzima não seja afectada assim como a sua especificidade. No entanto, existem algumas limitações: a imobilização é fraca e pode se perder uma grande quantidade de enzima, a distribuição da enzima na superfície do eléctrodo não é totalmente uniforme e a orientação das enzimas não é controlável. Por isso, pode se perder actividade enzimática e conseqüentemente há uma diminuição do sinal da resposta do biossensor.

3.3.2.3. *Ligação covalente*

Este método de imobilização é mais sofisticado e tem a vantagem de poder ser utilizado numa variedade de suportes. Inicialmente é necessário funcionalizar a superfície com compostos bi-funcionais, em que uma das extremidades reage com a superfície e forma ligações covalentes com ela, formando uma camada auto-montada (*SAM-self-assembled monolayer*), enquanto que a segunda extremidade forma ligações covalentes com os aminoácidos polares expostos na superfície, principalmente histidina, cisteína, lisina e tirosina. Este método é simples e conserva a integridade da estrutura terciária da enzima além de poder ser utilizado em várias superfícies com boa eficiência e com boa reprodutibilidade. No entanto, algumas enzimas são demasiado sensíveis, e susceptíveis de serem inactivadas.

3.3.2.4. *Bioafinidade*

O método de bioafinidade tira partido da especificidade de interacção entre pares de biomoléculas como anticorpos/antígeno, DNA, aptâmeros, um dos pares mais utilizados neste método sendo o par avidina/biotina. A afinidade entre estas moléculas é elevada, no caso da biotina/estreptavidina a constante de dissociação é 10^{-14} mol/L. Inicialmente é necessário ligar a biotina à enzima e activar a superfície do suporte com a estreptavidina. Apesar de não se formar uma ligação entre a biotina e a estreptavidina, a interacção entre elas é suficientemente forte para que a imobilização seja eficaz e espontânea quando entram em contacto, além de que é possível inverter o processo e libertar a enzima do suporte alterando o pH ou a temperatura. As principais vantagens deste método de imobilização são a baixa taxa de desnaturação e lixiviamento da enzima, assim como é possível um bom controlo da orientação e da dispersão da enzima sobre o suporte. No entanto, este método é muito dispendioso devido aos reagentes que são necessários além da própria enzima.

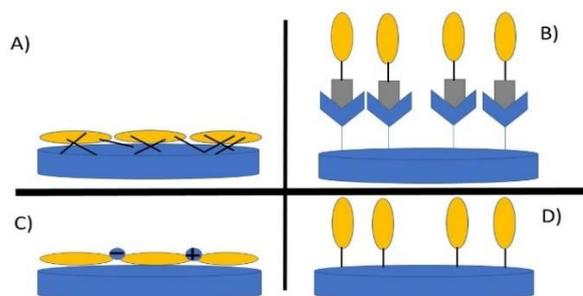
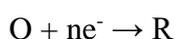


Figura 1.9 - Esquema dos métodos químicos de imobilização enzimática: (A) reticulação, (B) bioafinidade, (C) adsorção física, (D) ligação covalente.

4. Fundamentos de electroquímica

A electroquímica é o ramo da química que estuda os processos químicos associados à separação e transferência de carga. Os processos de eléctrodo são processos de transferência de carga heterogéneos, pois a transferência de electrão é feita na região interfacial entre a superfície do eléctrodo e a solução que contém a espécie electroactiva. No caso mais simples, a separação de carga entre a face do eléctrodo e a solução é traduzida pela capacitância da região interfacial e a dificuldade da transferência da carga é traduzida pela resistência à transferência de carga.



Para o electrão ser transferido, terá de haver uma diminuição da sua energia. O potencial aplicado serve este propósito: para promover a oxidação deve-se aplicar um potencial positivo o que baixa a energia de Fermi no eléctrodo e facilita receber os electrões de espécies electroactivas em solução. Para promover a redução a aplicação de um potencial negativo aumenta o nível de Fermi a conseqüentemente a facilidade em fornecer electrões a espécies electroactivas em solução [44].

4.1. Técnicas electroquímicas

4.1.1. Voltametria cíclica (CV)

Voltametria cíclica é uma técnica de varrimento de potencial, que consiste na aplicação de uma variação linear de potencial com o tempo entre um valor inicial, e um potencial final. Ao fazer o varrimento de potencial dentro da janela definida, E_{min} a E_{max} , promove-se a ocorrência de reacções de oxidação ou redução na superfície do eléctrodo de trabalho, adsorção de espécies e uma corrente capacitiva derivada da carga da dupla camada.

O potencial varia linearmente com o tempo até ao valor de potencial máximo E_{max} e inverte o sentido do varrimento até um potencial mínimo E_{min} (Figura 1.10A). Os resultados são apresentados graficamente, numa representação da corrente em função do potencial, chamado de voltamograma. A Figura 1.10B é um exemplo de um voltamograma para um sistema reversível.

A reversibilidade de um sistema electroquímico estudado por voltametria cíclica apresenta as seguintes características:

- $I \sim v^{1/2}$;
- E_p independente de v ;
- $\Delta E_p = |E_{pa} - E_{pc}| = 57/n$ (mV);

- $|E_p - E_{p/2}| = 56.6/n$ (mV);
- $|I_{pa}/I_{pc}| = 1$

demonstrando assim a dependência da corrente com raiz quadrada da velocidade de varrimento.

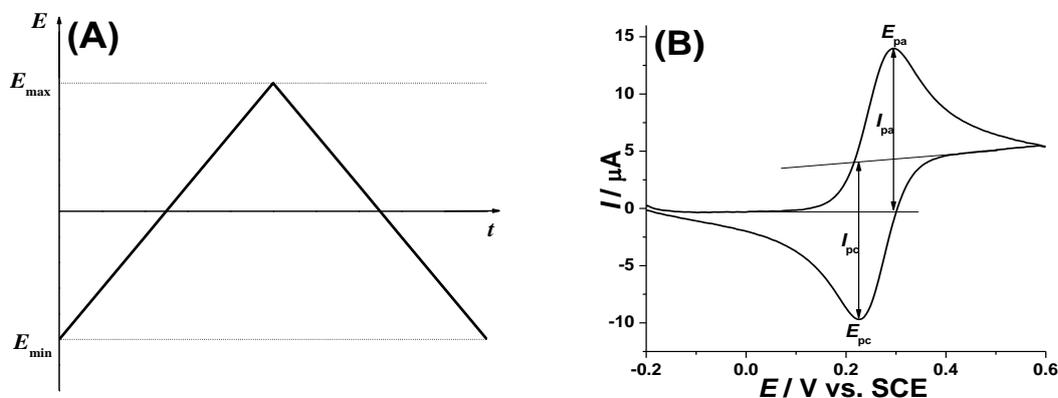


Figura 1.10 - A) Variação do potencial aplicado com o tempo em voltametria cíclica entre o potencial máximo E_{max} , e mínimo E_{min} , o sentido do varrimento pode ser positivo ou negativo. B) Voltamograma cíclico para um sistema reversível: 1 mM $K_4Fe(CN)_6$ em KCl 0,1M; destacam-se os potenciais de pico anódico E_{pa} e catódico E_{pc} e as correntes de pico anódico I_{pa} e catódico I_{pc} .

Uma das grandes aplicabilidades da voltametria cíclica é o estudo de constantes cinéticas de reacções de transferência de carga e a determinação de áreas electroactivas. Fazendo um estudo com várias velocidades de varrimento, podemos calcular a constante de velocidade de uma reacção de eléctrodo ou a área electroactiva de em eléctrodo.

Para efectuar a determinação d a área electroactiva normalmente utiliza-se a equação:

$$I = 2,69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A [R] \infty D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}}$$

onde I é a corrente (A), n – número de electrões transferidos na reacção redox, A – área do eléctrodo (cm^2), F – constante de Faraday ($C mol^{-1}$), D é o coeficiente de difusão ($cm^2 s^{-1}$), C – concentração de analíto ($mol cm^{-3}$), ν – velocidade de varrimento ($V s^{-1}$), R – constante dos gases ($J K^{-1} mol^{-1}$) e T – a temperatura (K) [44].

4.1.2. Amperometria a potencial fixo

Amperometria a potencial fixo que foi utilizada neste trabalho, deve ser distinguido de cronoamperometria uma vez que em amperometria de potencial fixo, não se considera a variação da corrente com o tempo. A amperometria de potencial fixo é uma técnica de degrau de potencial em que se varia o de valor de potencial inicial para outro, fixando-o e mantendo constante durante a experiencia. Deste modo, fazemos uma relação entre variação da corrente com a concentração do

analito devido à baixa influencia da componente capacitiva na corrente total uma vez que o potencial é invariável.

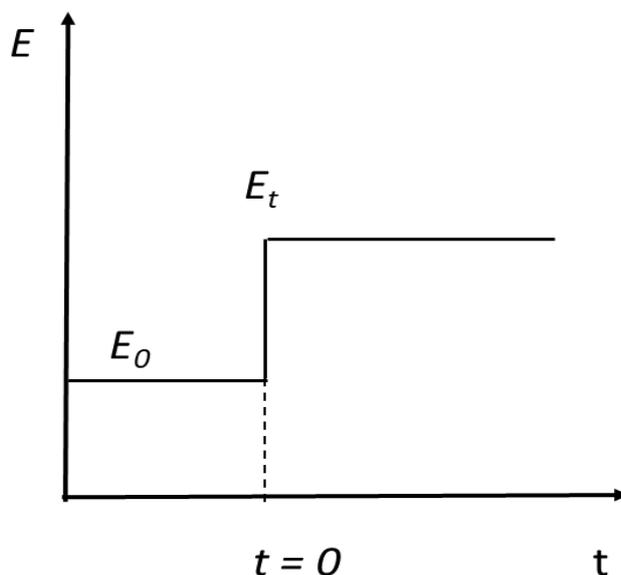


Figura 1.11 - Gráfico de variação do potencial com o tempo numa experiência de amperometria a potencial fixo.

Em amperometria a potencial fixo para fins analíticos, é adicionado um volume conhecido da espécie electroactiva à solução e a alteração da corrente é registada. Em condições de convecção imposta, normalmente por agitação mecânica da solução, um novo valor da corrente constante é observado passados alguns segundos, sendo a diferença de corrente proporcional à concentração adicionada do analito, Figura 1.12.

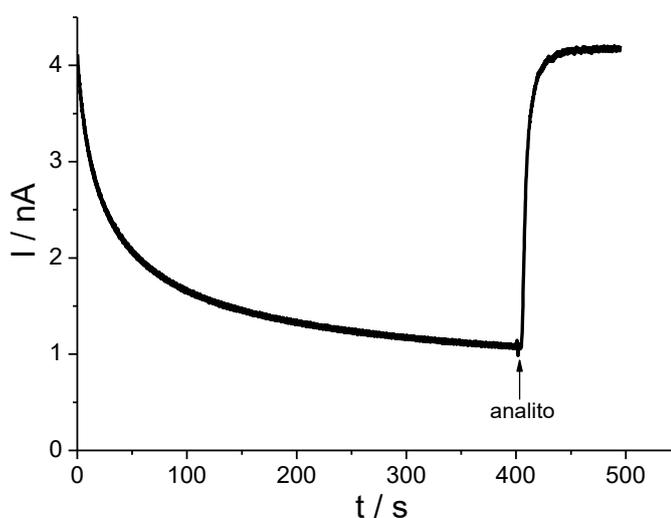


Figura 1.12 - Exemplo de resposta numa experiência amperométrica: estabilização da corrente de base até 400 s, seguida pela injeção de um analito e novamente a estabilização da corrente.

Capítulo 2 Experimental

Neste capítulo encontra-se uma descrição detalhada dos materiais, reagentes, instrumentos e célula electroquímica utilizados na execução deste trabalho, assim como de todas as metodologias aplicadas para a construção dos biossensores e das condições experimentais utilizadas em todas as experiências. Todas as medidas foram efectuadas a 25 °C e a pressão atmosférica.

2.1. Soluções e reagentes

As enzimas utilizadas foram as seguintes: glucose oxidase (GOx); lactato oxidase (LOx); piruvato oxidase (PyOx) da Sigma, Chemical Co. St. Louis, EUA.

Para a imobilização enzimática utilizou-se glutaraldeído (GA 25 % em água), albumina sérica bovina (BSA) da Sigma, Chemical Co. St. Louis, EUA.

Para a modificação do eléctrodo de carbono vítreo foram utilizados MWCNT da NanoLab, quitosana da Sigma-Aldrich, quitosana deacetilada min. 85 %, ferroceno da Merck, FeCl₃ da Riedel de Haene, DL-Lactic acid e vermelho neutro da Sigma-Aldrich.

Todos os reagentes foram utilizados como foram recebidos e sem purificação ou tratamento adicional.

As soluções-tampão preparadas foram as seguintes:

- K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,025 M (KPB) pH 5,5 + KNO₃ 0,1 M para a electrodeposição de filmes poli(vermelho neutro) (PNR)
- K₂HPO₄/KH₂PO₄ 0,025 M (KPB) pH 7,0 + KCl 0,1 M para os ensaios efectuados com azul de Prússia (PB) como mediador
- Trizma-HCl 0,01 M + K₂HPO₄ 0,015 M pH 7,0 + KCl 0,05 M com a enzima piruvato oxidase
- Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0,1 M pH 6,0-8,0 + NaCl 0,05 M, designado por NaPBS para as restantes experiências que foram realizadas

Para as experiências realizadas com a enzima piruvato oxidase foram adicionados às soluções-tampão os cofactores correspondentes a esta enzima.

A solução de ferroceno 10 mM foi guardada a 4 °C. As soluções de DL-glucose foram deixadas a equilibrar por um período sempre superior a 12 horas para que o equilíbrio entre as formas α e β se estabelecesse, pois apenas a forma β é a mais reactiva com a glucose oxidase. As soluções de DL-ácido láctico e DL-ácido pirúvico preparadas tinham a concentração de 10 mM e foram acondicionadas a 4 °C.

2.2. Instrumentação

Os instrumentos utilizados para efectuar as medições electroquímicas de amperometria e de voltametria cíclica foram: Ivium Compact Stat (Ivium Technologies B.V., Eindhoven, Netherlands) e μ Autolab de tipo II da EcoChemie Utrecht, Holanda, com controlador GPES 4.0, Figura 2.1a e 2.1b.

A medição de pH foi efectuada com um medidor de pH da Crison, Barcelona, Espanha, modelo micropH 2001, Figura 2.1c.

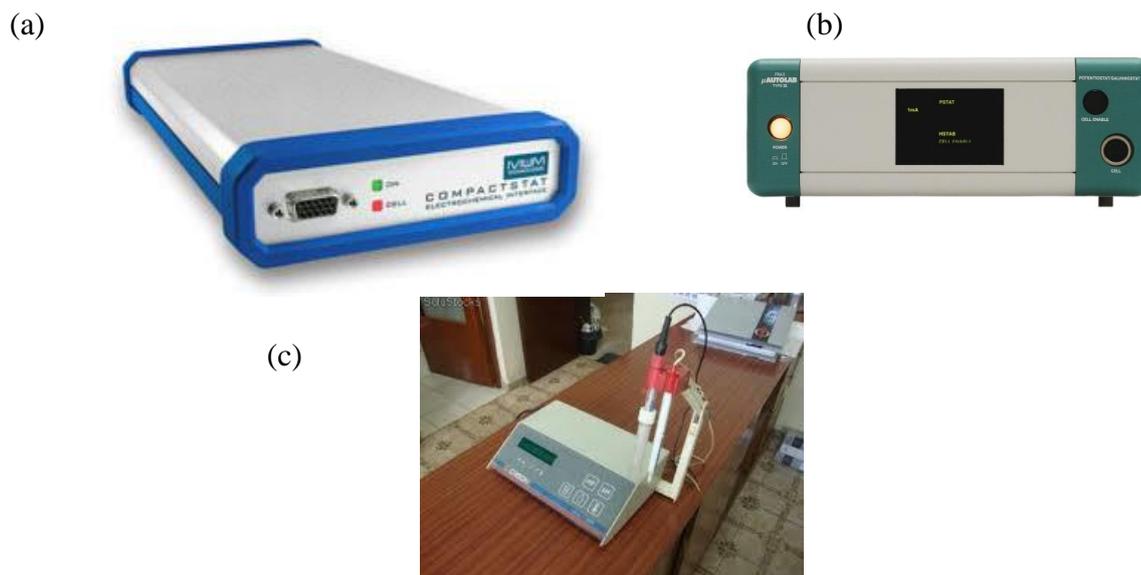


Figura 2.1 – Instrumentos utilizados no trabalho laboratorial. (a) Potenciostato Ivium Compact Stat; (b) Potenciostato μ Autolab de tipo II; (c) medidor de pH Crison modelo micropH 2001.

Todas as experiências foram executadas numa célula electroquímica de 15 ml de volume. Os eléctrodos utilizados foram: eléctrodo de calomelanos saturado (*SCE-saturated calomel electrode*) como referência (B), fio de platina como auxiliar (C) e como eléctrodo de trabalho utilizou-se um de carbono vítreo (*GCE-glassy carbon electrode*) com o diâmetro de 3,0 mm (A) Fig.2.2.

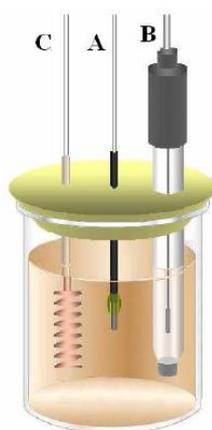


Figura 2.2 - Figura esquemática da célula electroquímica utilizada.

2.3. Modificação dos eléctrodos de carbono vítreo

Os eléctrodos de carbono são muito utilizados na preparação de biossensores, apesar de a transferência de electrões seguir uma cinética mais irreversível do que em eléctrodos metálicos, a sua elevada abundância, facilidade de preparação e manuseamento torna-os materiais de elevado interesse. Os novos materiais nanoestruturados de carbono como os nanotubos de carbono (CNT) e grafeno, foram usados num grande número de estudos, pois as características físicas destas novas estruturas de carbono oferecem grandes vantagens, ver Capítulo 1.

2.3.1. Preparação e imobilização dos CNT

Os nanotubos de carbono são funcionalizados com o objectivo de aumentar a sua capacidade electrocatalítica. A inserção de grupos carboxílicos na sua estrutura aumenta o número de locais onde há formação de radicais e por isso são mais reactivos.

Para funcionalizar os nanotubos de carbono seguiu-se o procedimento de [29]. Pesaram-se 120 mg de CNT e dissolveu-se em uma solução de ácido nítrico 5 M durante 20 horas. Ocorre uma destruição parcial da estrutura dos nanotubos com aumento do número de defeitos e implicitamente a capacidade electrocatalítica dos nanotubos. Após este período, a solução foi filtrada e lavada com água ultrapura (pH = 7) várias vezes. O filtrado foi colocado numa estufa a 80 °C, durante 24 horas.

A seguir, foi preparada uma solução 1% (m/v) de quitosana em ácido acético de seguinte maneira: pesaram-se 100 mg de quitosana e dissolveram-se em 10 ml ácido acético 1% (v/v) e

deixada em agitação durante 3 horas. Foram preparadas 3 suspensões de nanotubos de carbono, com as concentrações de 0,2; 0,5 e 1,0 % (m/v), em que foram pesadas 1; 2,5 e 5 mg de nanotubos funcionalizados e suspensos em 500 μ l de quitosana em ácido acético. As suspensões foram colocadas durante 2 horas num banho de ultrassons, para a sua dispersão ser mais eficaz e posteriormente guardados a 4 °C.

A deposição dos nanotubos no eléctrodo de carbono vítreo foi efectuada com a deposição de uma gota de 6 μ l de nanotubos e deixado a secar à temperatura ambiente. Este procedimento foi efectuado para todas as concentrações. Resultaram desta forma os seguintes eléctrodos modificados CNT_{0,2}/GCE, CNT_{0,5}/GCE, CNT_{1,0}/GCE, designados genericamente CNT/GCE.

2.3.2. Preparação e imobilização dos mediadores redox

2.3.2.1. Electrodeposição de filmes de PNR em CNT

A electrodeposição de poli(vermelho neutro) foi efectuada por voltametria cíclica, inserindo o eléctrodo CNT/GCE numa solução de 1,0 mM NR + 0,025 M KPB + 0,1 M KNO₃ (pH 5,5) e varrendo o potencial entre -1,0 e + 1,0 V vs. SCE com uma velocidade de varrimento de 50 mV s⁻¹, durante 20 ciclos [31].

Após a electrodeposição, o eléctrodo PNR/CNT/GCE foi seco à temperatura ambiente e guardado à mesma temperatura.

2.3.2.2. Electrodeposição de PB em CNT

A electrodeposição de azul de Prússia foi efectuada por voltametria cíclica, inserindo o eléctrodo CNT/GCE numa solução de 1,0 mM FeCl₃ + 1,0 mM K₃Fe(CN)₆ + 0,025 M KPB + 0,1 M HCl (pH 1,5) numa janela de potencial entre 0,0 e + 1,0 V vs. SCE com uma velocidade de varrimento de 50 mV s⁻¹, durante 25 ciclos [45].

Após a electrodeposição o eléctrodo PB/CNT/GCE foi seco à temperatura ambiente e guardado à mesma temperatura.

2.3.2.3. Síntese de nanopartículas de PB protegidas por quitosana

Como foi descrito no ponto anterior, verificou-se a necessidade de utilizar outras metodologias de síntese de azul de Prússia e decidiu-se testar um método com um biopolímero, que oferece maior garantia de não afectar a actividade enzimática. Inicialmente foram preparados 50 ml de uma solução de quitosana 85 % deacetilado em ácido clorídrico 0,5 M, à qual chamaremos solução I. Filtrou-se por gravidade a solução I para retirar as partículas solidas que se encontravam em suspensão. Prepararam-se duas soluções de ferro (III), uma de $K_3Fe(CN)_6$ (10 ml) e outra de $FeCl_3$ (10 ml) ambas com concentração 1 mM, que serão designadas solução II e III, respectivamente. Colocou-se a solução I em agitação, e lentamente adicionou-se a solução II. Posteriormente, à solução que continha as soluções I e II, adicionou-se a solução III muito lentamente. Para precipitar as nanopartículas, adicionou-se um grande excesso de acetona, cerca de 3 vezes o volume das soluções I, II e III e deixou-se repousar por umas horas. O precipitado foi centrifugado e lavado com acetona várias vezes. O sólido resultante, PB-QUIT-NP foi suspenso em água desionizada e guardado a 4 °C [46].

2.3.3. Imobilização de enzimas

O método utilizado para a imobilização enzimática em todos os biossensores que foram desenvolvidos no âmbito deste trabalho, foi o método de reticulação com glutaraldeído como agente reticulante e BSA como espaçador [29,31]. A preparação dos biossensores será descrita a seguir.

2.3.3.1. Biossensor de glucose sem mediador

Este biossensor foi preparado depositando uma gota de 6 µl de uma solução de 10 mg de GOx + 40 mg de BSA em tampão fosfato sobre o eléctrodo de carbono vítreo; de seguida depositou-se uma gota de 6 µl de GA sobre o eléctrodo com solução de enzima. Deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. Resultou o biossensor GOx/GCE.

2.3.3.2. Biossensor de glucose com PNR/CNT

O biossensor de GOx com filmes de PNR sobre uma camada de nanotubos foi desenvolvido em três fases distintas: uma primeira fase em que se modificou a superfície com CNT, segunda que foi a deposição do filme de PNR e uma terceira fase em que se imobilizou a enzima sobre a superfície de PNR/CNT.

A modificação da superfície de carbono vítreo foi efectuada como descrito no ponto 2.3.1 para a deposição dos nanotubos. A electrodeposição de PNR foi efectuada conforme o ponto 2.3.2.1. Após a modificação do eléctrodo procedeu-se à imobilização da enzima como no ponto 2.3.3.1. Deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. O eléctrodo resultado designou-se por GOx/PNR/CNT/GCE.

2.3.3.3. Biossensor de lactato sem mediador

Este biossensor foi preparado depositando uma gota de 6 µl de uma solução de 10 mg de LOx + 40 mg de BSA em tampão fosfato sobre o eléctrodo de carbono vítreo; de seguida depositou-se uma gota de 6 µl de glutaraldeído 2,5 % (v/v) sobre o eléctrodo com a solução de enzima. Deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. Resultou o biossensor LOx/GCE.

2.3.3.4. Biossensor de lactato com Fc/CNT

Este biossensor foi construído em quatro fases, à semelhança do biossensor do ponto 2.3.3.2. No entanto, o mediador foi depositado como uma gota de solução 10 mM de ferroceno sobre a camada de nanotubos, que foi previamente depositada como no ponto 2.3.1. Depositou-se depois a enzima como no ponto 2.3.3.3. Finalmente, depositou-se uma gota de 6 µl de Nafion 5% por cima de tudo e deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. O biossensor resultante designa-se por Nafion/LOx/Fc/CNT/GCE.

2.3.3.5. Biossensor de piruvato sem mediador

Este biossensor foi preparado depositando uma gota de 6 µl de uma solução de 10 mg de PyOx + 40 mg de BSA em tampão fosfato sobre o eléctrodo de carbono vítreo; de seguida depositou-se uma gota de 6 µl de glutaraldeído 2,5 % (v/v) sobre o eléctrodo com a solução de enzima. Deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. Resultou o biossensor PyOx/GCE.

2.3.3.6. Biossensor de piruvato com CNT

Este biossensor foi construído imobilizando a enzima PyOx como no ponto 2.3.3.5 sobre uma camada de CNT depositada como no ponto 2.3.1. e designa-se por PyOx/CNT/GCE. Construiu-se um biossensor semelhante a este, adicionalmente contendo uma gota de 6 µl FAD 200 µM depois da enzima, este biossensor designa-se por PyOx/FAD/CNT/GCE.

2.3.3.7. Biossensor de piruvato com PB/CNT

O biossensor de PyOx com filmes de PB sobre uma camada de nanotubos foi desenvolvido em três fases distintas: uma primeira fase em que se modificou a superfície com CNT, segunda que foi a deposição do filme de PB e uma terceira fase em que se imobilizou a enzima sobre a superfície de PB/CNT, como no ponto 2.3.3.5. O biossensor designa-se por PyOx/PB/CNT/GCE.

2.3.3.8. Biossensor de piruvato com PB-QUIT-NP/CNT

Este biossensor foi construído em quatro fases à semelhança do biossensor do ponto 2.3.3.4. Foi depositado uma gota de solução de PB-QUIT-NP sobre a camada de nanotubos, que foi previamente depositada como no ponto 2.3.1. Depositou-se depois uma gota de 6 µl de uma solução de 10 mg de PyOx + 40 mg de BSA em tampão fosfato sobre o eléctrodo de carbono vítreo modificado. De seguida depositou-se uma gota de 6 µl FAD 200 µM e a seguir depositou-se uma gota de 6 µl de glutaraldeído 2,5 % (v/v). Deixou-se secar à temperatura ambiente e guardou-se a 4 °C. O biossensor resultado designa-se por PyOx/FAD/PB-QUIT-NP/CNT/GCE.

Capítulo 3 Resultados e Discussão

3.1. Biossensores de glucose

Os hidratos de carbono desempenham um papel fundamental no metabolismo de seres vivos eucariotas e procariotas e cumprem várias funções biológicas desde o fornecimento de energia a funções estruturais como a de polímero de que è exemplo a celulose. Esta polivalência está relacionada com a grande variedade de estruturas que os diferentes monossacarídeos apresentam. O monossacarídeo mais conhecido é a D-glucose (β -D-glucopiranosose), uma aldose que cicliza num anel de 6 membros por uma ligação éster. A estrutura da β -D-glucopiranosose é a mais estável dos monossacarídeos, todos os grupos hidroxilos encontram-se na posição trans relativamente aos seus vizinhos e o grupo CH-OH é estabilizado por interacção orbital com o oxigénio do hemiacetal. Portanto, a glucose é utilizada pela grande maioria dos seres vivos como fonte de energia, sendo a cascata da glicólise a mais primitiva de todas as vias metabólicas que são conhecidas até aos dias de hoje.

A monitorização e determinação da glucose pode ser empregue e explorada em diversas áreas como medicina (diabetes), controlo de qualidade alimentar e para a determinação do teor em glucose de amostras de matrizes biológicas dos mais diversos fluidos e tecidos. Recentemente uma equipa de investigadores relacionou o aumento da dinâmica metabólica da glicólise, de vários tipos de células com a actividade cancerígena. Daí o interesse no desenvolvimento de biossensores enzimáticos, mais do que desenvolver um dispositivo para a simples determinação directa de um composto, podemos atribuir-lhe uma aplicação de forma indirecta, mas com enorme importância.

Os biossensores e sensores electroquímicos apesar de serem dispositivos que são desenvolvidos para a determinação e quantificação de compostos químicos ou bioquímicos, o seu modo de funcionamento pode variar conforme o contexto, e por isso devem ser considerados alguns aspectos técnicos na avaliação do desempenho de um biossensor.

Inicialmente foram testadas algumas metodologias “modelo” com uma enzima considerada “padrão”, com o objectivo de familiarização com os procedimentos laboratoriais, com o tratamento dos resultados obtidos, e com a interpretação e racionalização dos aspectos físico-químicos que determinam a actividade do biossensor. Para atingir esse objectivo foi desenvolvido numa primeira

fase um biossensor de glucose, sendo a sua arquitectura baseada em estudos anteriores do grupo [29]. A reacção catalisada pela GOx é a seguinte:



3.1.1 Biossensor de glucose sem mediador

Foi desenvolvido um biossensor de glucose immobilizando a enzima glucose oxidase num eléctrodo de carbono vítreo, o método de imobilização utilizado sendo a reticulação com glutaraldeído com a adição da albumina sérica bovina (BSA). A resposta do biossensor para a determinação de glucose foi avaliada através de amperometria a potencial fixo, a -0,4 V vs. SCE. Utilizou-se este potencial tendo em conta os resultados do trabalho anterior [29]. Outras condições foram: solução de electrólito NaPBS pH 7,4 com agitação constante.

Todas as adições de glucose na célula foram de 80 μM e foram feitas a um intervalo de cerca 100 segundos para garantir que cada alíquota de solução de glucose era completamente oxidada pela enzima.

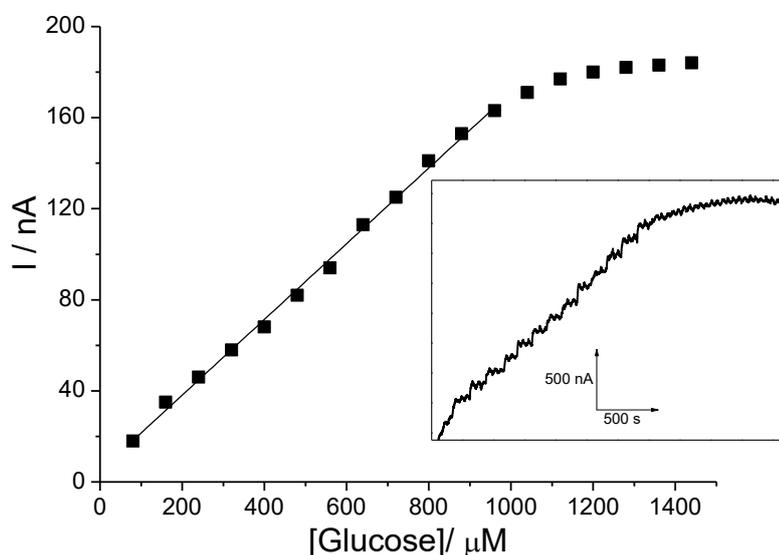


Figura 3.1 - Curva de calibração do biossensor GOx/GCE obtida a -0,4 V em NaPBS 0,1 M, pH 7,4 com adições regulares de 80 μM . Inserida no gráfico a resposta típica amperométrica.

A resposta típica obtida por amperometria, bem como a curva de calibração resultante dos dados da mesma resposta estão ilustrados na Figura 3.1. Observou-se um aumento da corrente em direcção anódica, sendo este relacionado com uma oxidação. Assim e como proposto anteriormente [29] o mecanismo de funcionamento deste biossensor tem na base dois processos competitivos: i) a regeneração do cofactor da enzima, o FAD que é reduzido a FADH₂ concomitante com a oxidação da glucose a ácido glucónico e ii) a redução do peróxido de hidrogénio resultante da redução do oxigénio.

Nas condições acima mencionadas, o biossensor apresenta uma gama linear entre 80 µM e 960 µM seguida de uma série de pontos que sugerem a saturação da enzima. O declive da recta dá-nos um valor da sensibilidade do biossensor 2,34 nA µM⁻¹cm⁻², e obteve-se um limite de detecção (LOD) de 46 µM, calculado através da equação:

$$LOD = \frac{3x SD}{sensibilidade}$$

sendo SD o desvio padrão dos pontos da recta.

3.1.2. Biossensor de glucose com PNR/CNT

Com vista em aumentar a resposta para a detecção de glucose, construiu-se um outro biossensor, desta vez imobilizando a enzima GOx num eléctrodo modificado com nanotubos de carbono 0,5 % (m/v) em quitosana, em cima do qual se polimerizou um filme de vermelho neutro.

A polimerização foi efectuada num electrólito com pH de 5,5 para melhorar a estabilidade do filme formado. A estrutura do filme depende do pH devido à protonação dos grupos amina do vermelho neutro; o aumento de número de ramificações cria uma estrutura irregular e consequentemente afecta a estabilidade do filme. Outro aspecto importante no controlo de pH é o facto de os nanotubos de carbono possuírem grupos carboxílicos nos seus defeitos e nas suas margens, que são responsáveis por criarem ligações amida com os grupos amina do vermelho neutro [29]. Porém, os nanotubos de carbono criam uma superfície porosa e muito irregular, o que dificulta a polimerização sobre a sua superfície e a adsorção de filmes. A formação de ligações entre grupos amina e carboxílicos ajuda a fixar o filme de poli(vermelho neutro) criando um filme mais compacto e estruturalmente coeso.

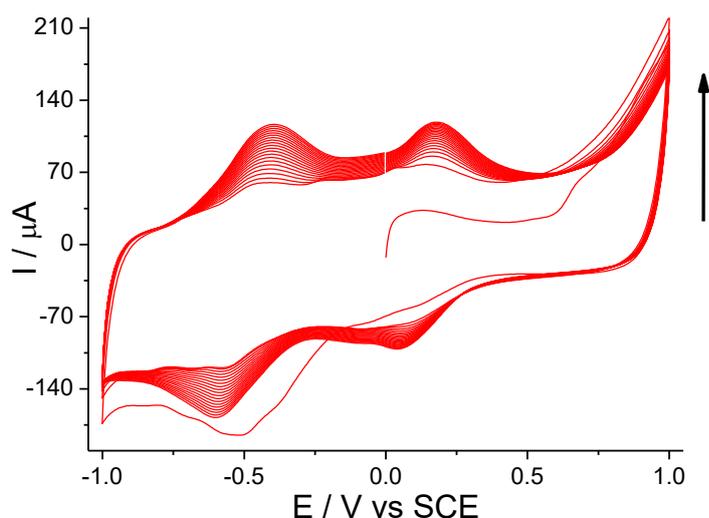


Figura 3.2 - Electropolimerização do vermelho neutro. Voltamograma cíclico mostrando a polimerização de NR em CNT_{0,5}/GCE, polimerização efectuada a uma velocidade de varrimento 50 mV s⁻¹, com [NR] = 1,0 mM em 0,025 M KPB + 0,1 KNO₃, pH 5,5.

Na Figura 3.2 encontra-se o voltamograma da polimerização do vermelho neutro sobre nanotubos de carbono. Existem dois pares redox neste voltamograma com os potenciais formais -0,50 V e +0,12 V, o primeiro a potenciais negativos, devido à oxidação/redução do monómero que se sobrepõe com a do polímero, o segundo, a potenciais positivos, atribuído à dopagem do filme com os iões na solução [29]. A um potencial muito positivo, +1,0 V, ocorre a oxidação do monómero que gere radicais catiões instáveis que depois vão-se juntando, formando o polímero. A corrente dos dois pares redox aumenta com cada varrimento, indicando o crescimento do filme polimérico.

Com a superfície do eléctrodo já modificado com CNT e PNR que serve de suporte para a enzima, procedeu-se à imobilização enzimática. O biossensor resultante, GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE foi testado para a medição da glucose por amperometria aplicando um potencial de -0,30 V, conforme [29] e numa solução de electrólito suporte NaPBS, pH 7,4.

O mecanismo de reacção está apresentado na Figura 3.3, sendo o de competição entre a regeneração do FAD e a redução do H₂O₂, assim como proposto anteriormente [29]. A regeneração do FAD no eléctrodo PNR/CNT_{0,5}/GCE ocorre a um potencial menos negativo que no eléctrodo de GCE. Isto deve-se a uma ligeira abertura da enzima quando é depositada sobre o eléctrodo PNR/CNT_{0,5}/GCE, que tem uma superfície mais rugosa e irregular, diminuindo a

influência que a barreira proteica tem na transferência de carga, sendo mais fácil a transferência de electrões entre o eléctrodo e a enzima [29].

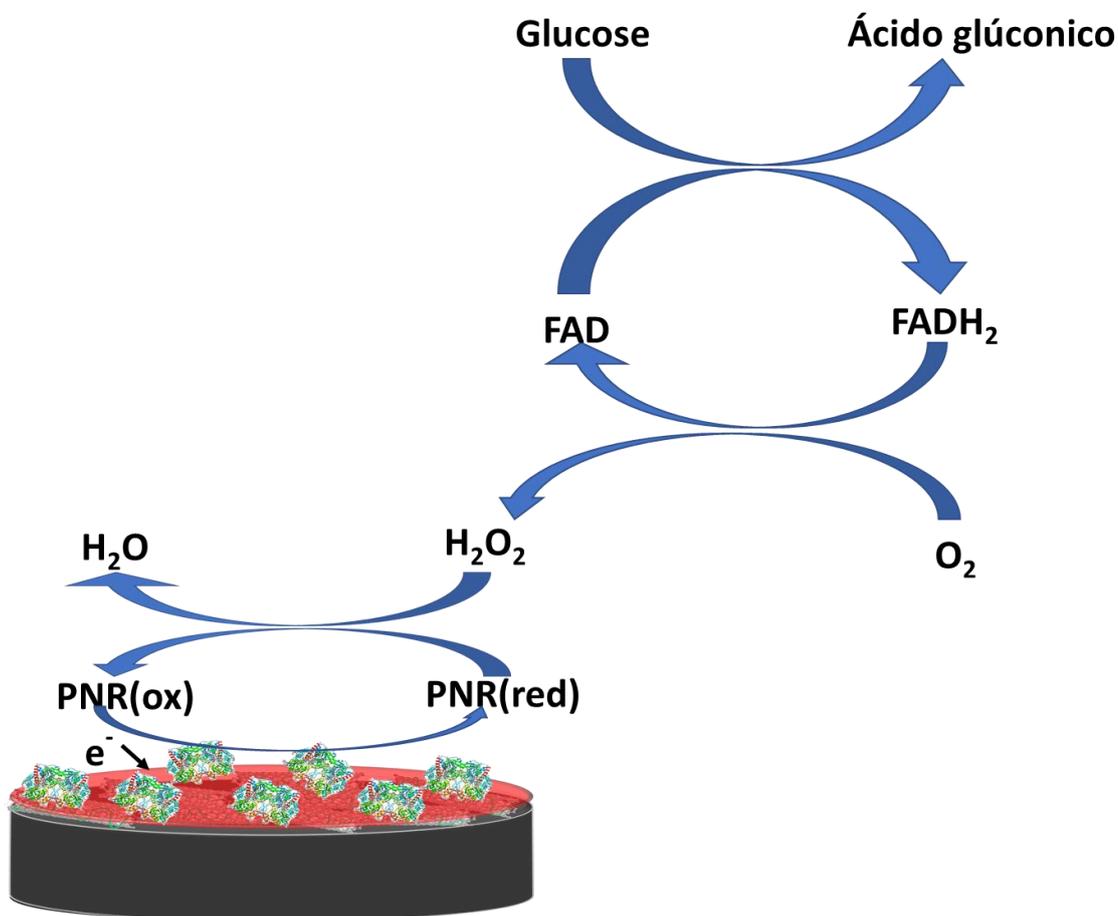


Figura 3.3 - Mecanismo de funcionamento do biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE.

Na Figura 3.4 encontra-se a curva de calibração obtida por amperometria a potencial fixo com o biossensor desenvolvido. Uma observação geral é que a corrente de base apresenta valores superiores aos observados para o biossensor GOx/GCE, assim como se verifica um grande aumento do ruído eléctrico. Estas alterações devem-se à camada dos nanotubos em conjunto com o PNR, que leva a uma superfície rugosa, porosa e espessa. Deste modo, é provocado um aumento da componente capacitiva da corrente gerada pelo polímero em contacto com os nanotubos e maiores oscilações de corrente com agitação.

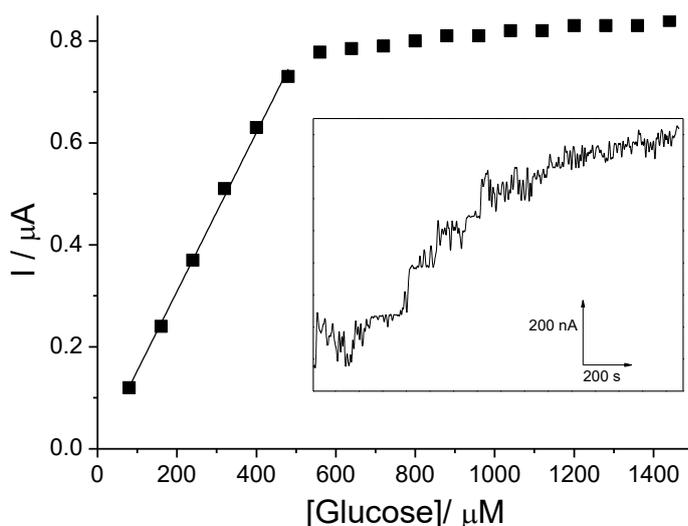


Figura 3.4 - Curva de calibração do biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE obtida a -0,3 V experiencia efectuada em NaPBS 0,1 M, pH 7,4 com adições regulares de 80 μM. Inserida no gráfico a resposta típica amperométrica.

O biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE, apresenta uma gama linear de 80 a 480 μM, observando-se efeitos da saturação da enzima para concentrações mais elevadas. O limite de detecção é de 22 μM e a sensibilidade é 22,3 nA μM⁻¹ cm². O desempenho deste biossensor é melhor, comparado com o biossensor de glucose sem mediador.

Na Tabela 3.1 são apresentados os valores dos parâmetros analíticos que caracterizam os biossensores desenvolvidos. Comparando os biossensores podemos observar que o biossensor sem mediador apresenta um limite de detecção superior ao do biossensor de GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE por um factor de ≈ 2 e uma gama linear superior em 400 μM. No entanto, o biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE apresenta uma sensibilidade superior à do biossensor de GOx/GCE por um factor de 10. Comparando os resultados, verificamos que a modificação do eléctrodo GCE com PNR/CNT induz um aumento de sensibilidade e uma diminuição do limite de detecção. Este efeito é devido ao aumento da área electroactiva e do efeito electrocatalítico que a superfície de PNR/CNT cria, acrescentando o facto de que o PNR melhora a transferência discreta entre a superfície do eléctrodo e a enzima para a regeneração do FAD.

A diminuição da gama linear no caso do GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE pode ser explicada da seguinte forma. A polimerização sobre os nanotubos resulta numa diminuição da resistência e aumento da constante de velocidade de transferência de carga comparado com eléctrodo de

carbono. Do estudo de impedância em [29], verifica-se que a polimerização sobre os nanotubos cria uma superfície mais porosa, com um aumento da capacitância por formação de 2 camadas distintas, que desta forma provoca um aumento da sensibilidade e diminuição do limite de detecção. A morfologia da superfície pode induzir uma gama linear mais pequena, pois a imobilização da enzima sobre uma superfície irregular e porosa deste género pode levar a um certo grau de desactivação da enzima.

Tabela 3.1 - Parâmetros analíticos dos biossensores de glucose desenvolvidos neste trabalho e comparação com a literatura.

Biossensor	Potencial Volts (V)	Gama linear (mM)	LOD (μM)	Sensibilidade $\text{nA } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$	Ref.
GOx/GCE	-0,40 (SCE)	0,08-0,96	46	2,34	Este trabalho
GOx/PNR/MWCNT/GCE	-0,30 (SCE)	0,08-0,48	22	22,3	Este trabalho
GOx/CoHCF/CFE	0,00 (SCE)	0,010-0,030	1,9	6,4	[19]
GOx/PNR/MWCNT/GCE	-0,30 (SCE)	até 1,6	17	30,4	[29]
GOx/Fc/GCE	+0,25 (SCE)	até 2,7	66	0,25	[47]
GOx/MWCNT/GCE	-0,44 (Ag/AgCl)	6,3-20,09	-	2,47	[48]
GOx/Nafion-SWCNH/GCE (+FcMCA em tampão)	+0,30 (Ag/AgCl)	0,0-6,0	6,0	15,1	[49]
GOx/Nafion/ERGO- MWCNT/GCE (+FcMCA em tampão)	+0,35 (Ag/AgCl)	0,01-6,5	4,7	27,2	[50]
GOx/Nafion-MWCNT/GCE	+0,70 (SCE)	0,05-1,10	9,3	9,43	[51]

GOx-glucose oxidase; PNR-poli(vermelho neutro); Fc-ferroceno; CoHCF-hexacianoferrato de cobalto; FcMCA-ácido carboxílico de ferroceno; MWCNT-nanotubos de carbono de paredes múltiplas; SWCNH-nanocornos de carbono de parede única; ERGO-óxido de grafeno reduzido electroquimicamente; GCE -eléctrodo de carbono vítreo; CFE-eléctrodo de filme de carbono

Comparando os biossensores da literatura apresentados na Tabela 3.1 verificamos que estes operam a potenciais diferentes em função do mediador redox utilizado e alguns não utilizam mediador. A potenciais muito baixos, próximo de 0,0 V, os hexacianoferratos [19] actuam principalmente na redução do peróxido de hidrogénio que resulta da reacção enzimática. No caso do ferroceno [47,49,50] ocorre a difusão do ião ferroceno entre o transdutor e a enzima e a oxidação do peróxido a potencial positivo. Quando não se utiliza mediador [51] há a oxidação de H₂O₂ a potencial altamente positivo. Há ainda os biossensores que operam a potenciais negativos [29,48], referentes a um mecanismo semelhante aos biossensores desenvolvidos aqui, com um ciclo reacional como o que esta apresentado na figura 3.3.

Existe somente dois biossensores [29,50] com sensibilidade superior ao biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE desenvolvido neste trabalho, sendo que em [50] utiliza-se um compósito incluindo óxido de grafeno reduzido junto com os nanotubos de carbono, o que leva ao aumento da transferência de carga. Este biossensor apresenta ainda um limite de detecção inferior e uma gama linear mais larga de que o biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE. Relativamente ao biossensor GOx/PNR/CNT_{0,5}/GCE construído em [29], este é semelhante ao biossensor desenvolvido aqui, no entanto a solução de enzima não foi a mesma, o que leva a um desempenho ligeiramente diferente.

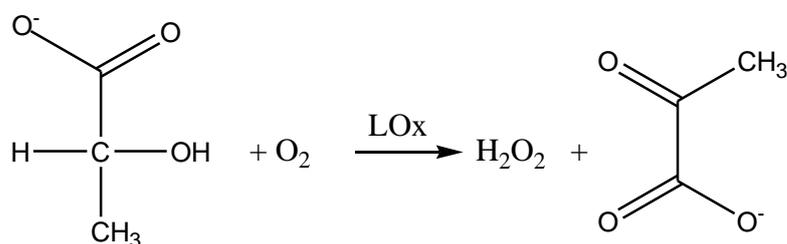
Os outros biossensores apresentam todos sensibilidades muito mais baixas, no entanto os seus limites de detecção são sempre inferiores aos obtidos neste estudo, excepto o biossensor GOx/Fc/GCE [47] porque existe um lixiviamento do mediador na sua forma oxidada devido à sua elevada solubilidade. No caso do biossensor com CoHCF [19], o limite de detecção é o mais baixo de todos, e a gama linear é a mais curta de todas devido provavelmente à redução do peróxido no interior da cavidade do CoHCF que provoca uma diminuição da estabilidade da estrutura cristalina do composto.

3.2. Biossensores de lactato

O lactato é um metabolito de grande relevância em amostras biológicas. A monitorização e determinação deste composto é utilizada como forma de diagnóstico e controlo clínico e como indicador de qualidade alimentar. Por isso existe um grande interesse no desenvolvimento de instrumentos analíticos que facilitem esta tarefa e que permitam executá-la de forma económica, rápida e fiável como um biossensor.

O lactato é formado na oxidação anaeróbica da glucose nestas condições de baixa concentração de oxigénio há um aumento da produção de lactato, elevando o pH do meio podendo ocorrer a acidose láctica. Na presença de oxigénio, a enzima lactato oxidase oxida o lactato a piruvato, preservando a homeostase desta via metabólica. Esta enzima é uma flavoproteína globular com um FMN no seu centro activo, o papel deste cofactor sendo mediar a oxidação do lactato, através da redução do oxigénio a peróxido de hidrogénio.

No seguimento do que foi feito com o biossensor de glucose, foi desenvolvido um biossensor de lactato com a enzima lactato oxidase como elemento de reconhecimento, sendo a reacção catalisada pela LOx a seguinte:



3.2.1. Biossensor de lactato sem mediador

O biossensor de lactato foi construído imobilizando a enzima lactato oxidase sobre um eléctrodo de carbono vítreo por reticulação com glutaraldeído. A resposta amperométrica foi testada numa solução de electrólito NaPBS pH 7,4 com agitação constante, aplicando um potencial de -0.4 V vs. SCE. A curva de calibração está apresentada na Figura 3.5.

O biossensor apresenta uma resposta linear com o aumento da concentração de lactato de 80 até 560 μM , a partir de que a variação da corrente diminui, um indício da saturação da enzima. O

ajuste linear aos pontos da recta permitiu calcular os parâmetros analíticos do desempenho do biossensor. O limite de detecção obtido foi de 14,4 μM , com uma sensibilidade de 1,12 $\text{nA } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Os parâmetros referentes a este biossensor encontram-se apresentados na Tabela 3.2.

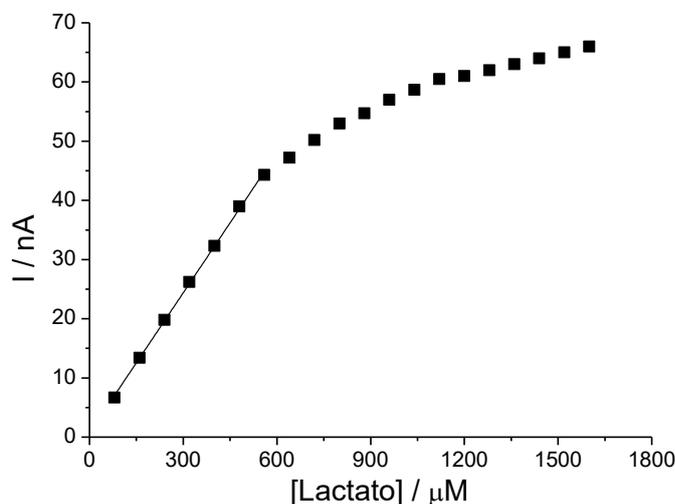


Figura 3.5 - Curva de calibração do lactato para o biossensor Nafion/LOx/GCE experiência efectuada em NaPBS 0,1 M, pH 7,4 a -0,4 V vs SCE com adições regulares de 80 μM

3.2.2. Biossensor de lactato com Fc/CNT

À semelhança da metodologia que foi utilizada no desenvolvimento do biossensor de glucose, foi testado o efeito dos nanotubos e de um mediador na resposta do biossensor. O mediador escolhido para este sistema foi o ferroceno.

Foram modificados dois eléctrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono 0,5 %. Num deles foi depois depositada uma gota de solução de ferroceno. Em seguida, nos dois eléctrodos imobilizou-se a enzima e após essa uma camada de Nafion para minimizar a perda de ferroceno que é muito instável no eléctrodo.

Os biossensores resultantes Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE e Nafion/LOx/ CNT_{0,5}/GCE foram submetidos a um estudo de variação de potencial para averiguar qual o melhor valor para ser aplicado na amperometria a potencial fixo. Este estudo consistiu na adição de 480 μM de lactato, variando o potencial aplicado numa janela de -0,4 a +0,4 V. A corrente de resposta foi registada e construiu-se um gráfico da corrente em função do valor do potencial, este gráfico encontra-se apresentado na Figura 3.6.

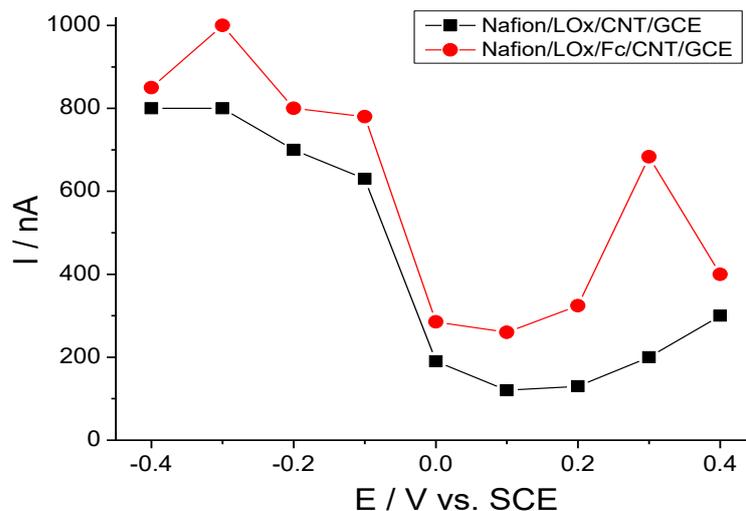


Figura 3.6 - Gráfico de variação da corrente em função do potencial aplicado para uma adição de 480 μM lactato para os biossensores Nafion/LOx/CNT_{0,5}/GCE e Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE, experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M, pH 7,4.

O eléctrodo com ferroceno apresenta correntes mais altas em todos os potenciais estudados o que sugere que o ferroceno aumenta a capacidade electrocatalítica do sistema. Este comportamento pode ser explicado também com o efeito sinérgico entre os nanotubos e o ferroceno que leva a um aumento da área electroactiva do eléctrodo modificado. A grande diferença ao potencial de +0,3 V deve-se ao facto de que neste potencial ocorre a oxidação do ferroceno a ferrocíneo. A resposta é mais elevada para potenciais negativos, onde se pressupõe existir uma reacção competitiva entre a regeneração do FMN e a redução do peróxido de hidrogénio, semelhante ao que acontece no biossensor com glucose oxidase. O esquema de funcionamento do biossensor está apresentado na Figura 3.7. O potencial escolhido para o estudo de amperometria foi de -0,1 V. A escolha foi devido a sua proximidade de 0,0 V; a vantagem de utilizar este potencial é a diminuição da possibilidade de ocorrer reacção de espécies interferentes.

Em seguida, o biossensor que apresentou melhor resposta para o lactato, Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE foi testado por amperometria a um potencial de -0,1 V numa solução de NaPBS pH 7,4, com agitação constante para avaliar os parâmetros analíticos.

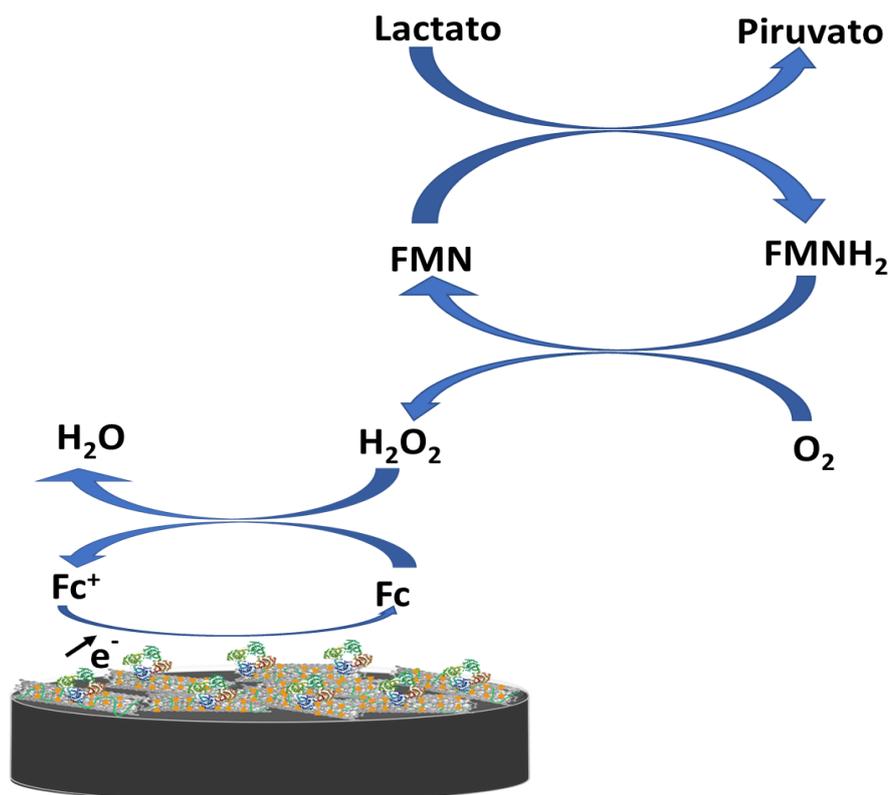


Figura 3.7 - Mecanismo de funcionamento do biossensor LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE.

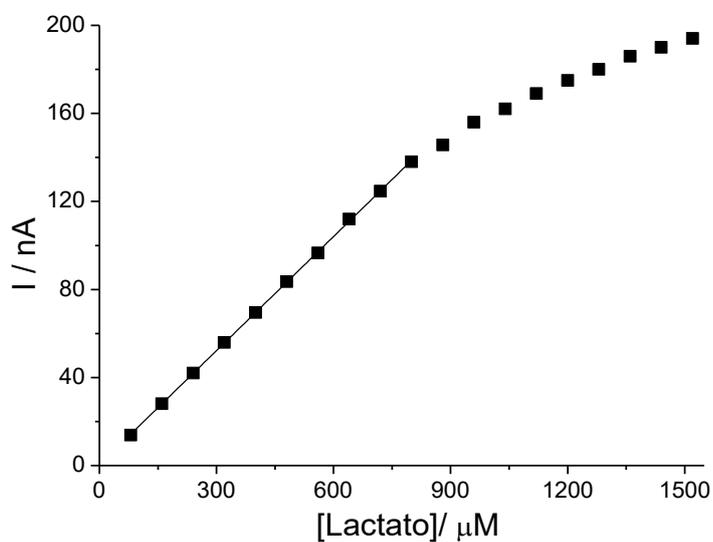


Figura 3.8 - Curva de calibração do biossensor Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE experiência efectuada em NaPBS 0,1 M pH 7,4 a -0,1 V vs. SCE com adições regulares de 80 μM.

Na figura 3.8 está representada a curva de calibração para o biossensor Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE a um potencial de -0,1 V. O desempenho do biossensor foi avaliado pelos parâmetros analíticos que foram calculados do ajuste e estão apresentados na Tabela 3.2.

Observamos que o biossensor Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE teve melhor desempenho de que Nafion/LOx/GCE, apresentando uma sensibilidade superior por um factor de aproximadamente 2. A utilização do ferroceno permitiu que o biossensor fosse utilizado a um potencial menos negativo, -0,1 V, comparado com -0,4 V que se utilizou no biossensor sem mediador. A introdução dos nanotubos e do ferroceno levou a uma extensão da gama linear que juntamente com o efeito do Nafion causam uma extensão da linearidade de resposta pelo efeito membranar que o polímero exerce no biossensor, assim como a diminuição do limite de detecção [48].

Tabela 3.2 - Parâmetros analíticos dos biossensores de lactato desenvolvidos neste trabalho e comparação com a literatura.

Biossensor	Potencial Volts (V)	Gama linear (mM)	LOD (μ M)	Sensibilidade nA μ M ⁻¹ cm ⁻²	Ref.
Nafion/LOx/GCE	-0,40 (SCE)	0,08- 0,56	14,4	1,12	Este trabalho
Nafion/LOx/Fc/MWCNT _{0,5} /GCE	-0,10 (SCE)	0,08- 0,80	8,8	2,45	Este trabalho
LOx/tG/PB/AuE	-0,05 (Ag/AgCl)	0,01- 0,09	-	70,0	[52]
LOx/CNT/PVI-Os/AuE	+0,30 (Ag/AgCl)	até 1,0	5,0	19,7	[53]
LOx/MWCNT/CuNP/PANI/PGE	+0,28 (Ag/AgCl)	0,001- 2,5	0,25	-	[54]
Nafion/LOx/PB/GCE	-0,05 (Ag/AgCl)	até 0,80	0,7	35,7	[55]
LOx/N-CNT/GCE	+0,23 (Hg/Hg ₂ SO ₄)	0,014- 0,325	4,1	0,04	[56]

LOx-lactate oxidase; Fc-ferroceno; tG-tiol grafen; PB-azul de Prússia; PVI-poli(vinil imidazol); CuNP-nanopartículas de cobre; PANI-poli(anilina); GCE-eléctrodo de carbono vítreo; AuE-eléctrodo de ouro; PGE-eléctrodo de lápis de grafite

Comparando o biossensor desenvolvido Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE com os exemplos retirados da literatura, observa-se que a sensibilidade deste biossensor é inferior à dos exemplos retirados da literatura, exceptuando um dos exemplos, LOx/N-CNT/GCE, cuja sensibilidade é mais baixa factor de 6 [56]. Em relação a gama linear existe semelhanças, contudo há dois biossensores com limites superiores [53,54], ambos operando a potenciais positivos. De realçar que o biossensor LOx/tG/PB/AuE exibiu uma resposta linear até um limite superior 9 vezes mais baixo que o desenvolvido aqui o que pode justificar a elevada sensibilidade. Os limites de detecção são comparáveis ou mais baixos de que os conseguidos neste trabalho. A vantagem que o biossensor Nafion/LOx/Fc/CNT_{0,5}/GCE apresenta sobre a maioria destes biossensores é o baixo potencial aplicado, o que faz reduzir consideravelmente a resposta de possíveis interferentes; no entanto tem consequências na diminuição da resposta.

3.3. Biossensores de piruvato

O piruvato é a base conjugada do ácido pirúvico que é formado no ciclo de glicólise e pode ser metabolizado por três vias metabólicas distintas, nomeadamente, o ciclo do ácido cítrico a fermentação homoláctica e a fermentação alcoólica. Para iniciar o ciclo do ácido cítrico, ocorre a oxidação do piruvato a Acetil-CoA, CO₂ e NADH pela enzima piruvato desidrogenase; a Acetil-CoA entra então no ciclo originando várias moléculas de NADH e FADH₂ que serão necessárias para a fosforilação oxidativa. Todas estas reacções ocorrem na mitocôndria em seres eucariotas ou no citoplasma dos procariotas.

Devido ao seu papel metabólico, o piruvato é um composto que tem interesse analítico. A sua determinação de forma eficiente e barata pode conduzir a novas formas de controlo e análise de foro clínico e na segurança alimentar. Para o desenvolvimento e construção dos biossensores de piruvato neste trabalho utilizou-se a enzima piruvato oxidase (PyOx) que catalisa a reacção de oxidação do piruvato a acetilfosfato. Para ocorrer a reacção, o meio deve estar saturado de oxigénio e fosfato. Esta enzima também é utilizada para biossensores para a determinação de fosfato quando meio se encontra saturado de piruvato.

Nesta secção será apresentado um estudo detalhado dos biossensores de piruvato, onde será avaliado o efeito do pH, da percentagem da dispersão dos nanotubos, o efeito da composição da solução tampão, o efeito da concentração de cofactores enzimáticos, o efeito do mediador e do

potencial aplicado. Todos os procedimentos laboratoriais foram executados em conformidade com as descrições feitas no capítulo experimental deste trabalho.

3.3.1. Biossensor de piruvato sem mediador

À semelhança do que foi feito nos biossensores de glucose e lactato, desenvolveu-se um biossensor para piruvato que consiste na simples imobilização da enzima piruvato oxidase sobre a superfície de um eléctrodo de carbono vítreo e realizou-se um ensaio amperométrico a +0,65 V para promover a oxidação do peróxido de hidrogénio resultante da reacção de oxidação do piruvato. A curva de calibração correspondente esta representada na Figura 3.9.

Esta curva apresenta um comportamento típico da cinética do tipo Michaelis-Menten, onde se observa a saturação da enzima por volta dos 560 μM . A gama linear do biossensor é de 80-560 μM , com uma sensibilidade de 0,462 $\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$ e um limite de detecção de 7,9 μM .

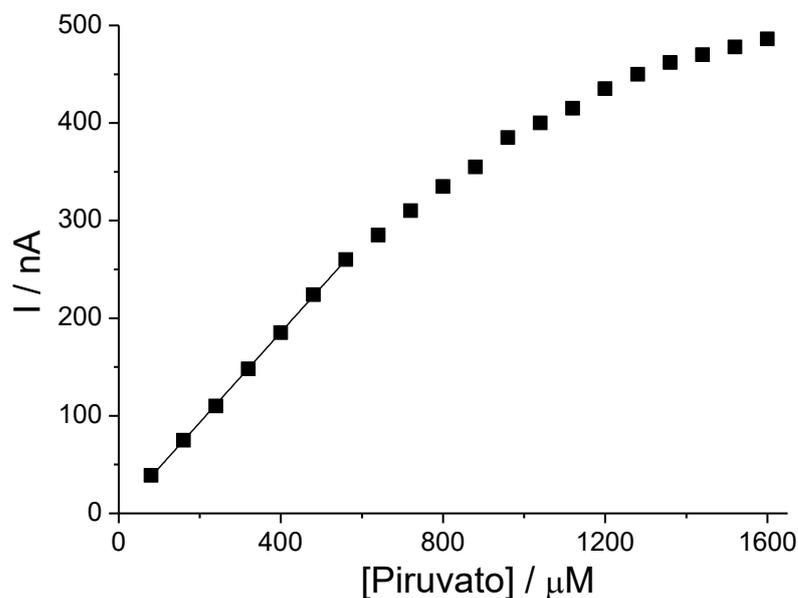


Figura 3.9 - Curva de calibração de piruvato do biossensor PyOx/GCE experiência efectuada em NaPBS 0,1 M, pH 7,0 com $[\text{Mg}^{2+}] = [\text{TPP}] = 1\text{mM}$, a potencial +0,65 V vs. SCE, com adições regulares de 80 μM .

3.3.2. Biossensor de piruvato com CNT

Para melhorar os resultados obtidos anteriormente investigou-se o efeito da imobilização da enzima sobre uma camada de nanotubos, tendo sido efectuado um estudo de optimização de vários parâmetros que será apresentado a seguir.

3.3.2.1. Efeito da concentração da dispersão de CNT

Os nanotubos de carbono são muito utilizados como material de eléctrodo em biossensores electroquímicos devido às suas propriedades eléctricas e mecânicas que trazem muitas vantagens como descrito no Capítulo 1. Para verificar o efeito dos CNT foram registados uns voltamogramas cíclicos num eléctrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono com 3 concentrações diferentes 0,2 0,5 e 1,0 % (m/v). O electrólito de suporte utilizado foi tampão fosfato 0,1 M. Os voltamogramas encontram-se apresentados na Figura 3.10 e foram executados com uma velocidade de varrimento de 50 mV s^{-1} numa janela de potencial entre $-0,5$ e $0,5 \text{ V vs. SCE}$.

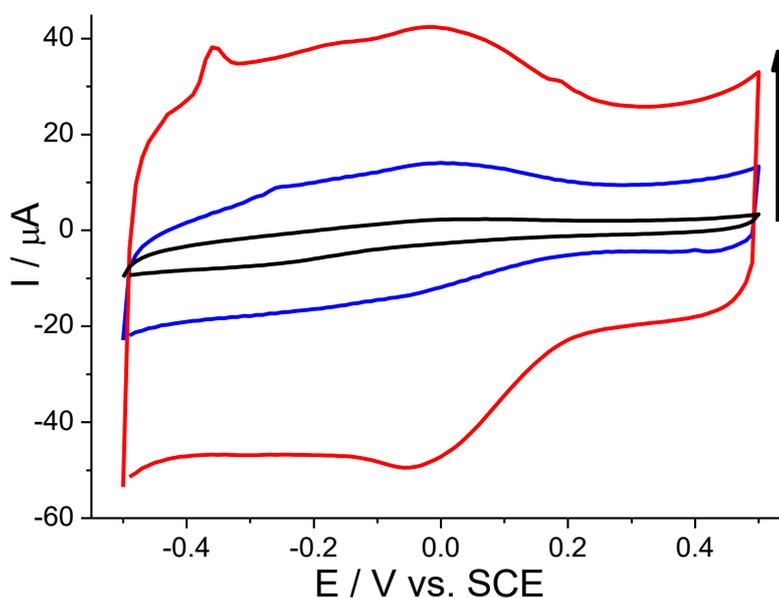


Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos dos eléctrodos CNT/GCE com diferentes concentrações de dispersão de CNT: 0,2 (preto), 0,5 (azul) e 1,0 % (vermelho), velocidade de varrimento de 50 mVs^{-1} , experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M pH 7,0.

A Figura 3.10 mostra que com o aumento da quantidade de nanotubos, aumenta o valor da corrente capacitiva no sentido indicado pela seta. Este aumento dos valores das correntes deve-se ao aumento da área da superfície devido aos nanotubos. A superfície dos nanotubos permite que sejam adsorvidos um maior número de espécies iónicas e moléculas de solvente criando uma região interfacial de maior capacitância e uma corrente capacitiva superior de que o eléctrodo suporte de carbono vítreo [45].

Prepararam-se três biossensores para piruvato, imobilizando a PyOx por cima dos CNT com várias concentrações de dis: PyOx/CNT_{0,2}/GCE, PyOx/CNT_{0,5}/GCE e PyOx/CNT_{1,0}/GCE. Estes biossensores foram avaliados para a determinação de piruvato por amperometria a potencial fixo com o objectivo de avaliar o seu impacto na sensibilidade da resposta e no limite de detecção do biossensor. As curvas de calibração foram construídas com adições sucessivas de 25 μM de piruvato, aplicando um potencial de +0,5 V.

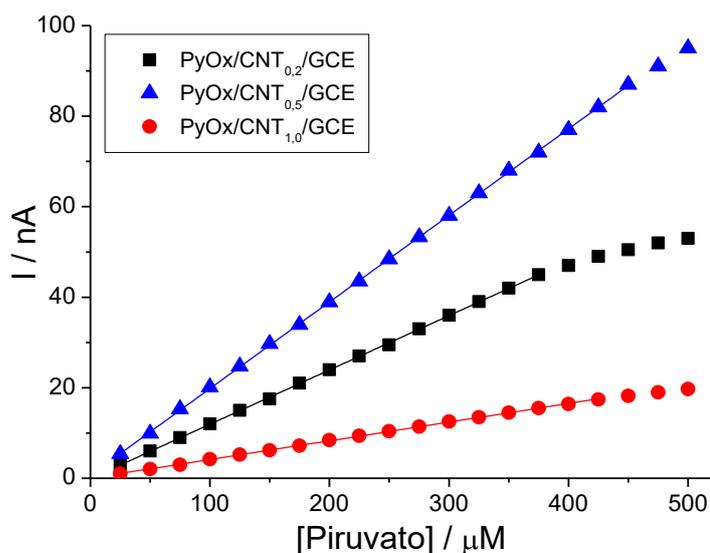


Figura 3.11 - Curvas de calibração para piruvato nos biossensores com diferentes concentrações de dispersão CNT: 0,2 % (preto), 0,5 % (azul) e 1,0 % (vermelho), +0,5 V vs. SCE, experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M pH 7,0 com $[\text{Mg}^{2+}] = [\text{TPP}] = 1\text{mM}$.

Na Figura 3.11 estão representadas as curvas de calibração dos três biossensores de piruvato com eléctrodos modificados com nanotubos de carbono e na Tabela 3.3 estão os valores dos

parâmetros analíticos obtidos das curvas. Observamos que as gamas lineares dos biossensores são muito semelhantes, mas a curva com maior declive é do biossensor com concentração de dispersão nanotubos de 0,5 %, indicando que com esta concentração de nanotubos o biossensor apresenta uma sensibilidade ao piruvato superior às concentrações de 0,2 e 1,0 % por um factor de aproximadamente 2 e 5, respectivamente. Ao mesmo tempo, o biossensor PyOx/CNT_{0,5}/GCE exibiu o limite de detecção mais baixo, o que leva a concluir que esta configuração é a mais adequada para a determinação de piruvato.

Tabela 3.3 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/CNT/GCE com diferentes concentrações de dispersão de CNT.

Biossensor	Gama linear / μM	LOD / μM	Sensibilidade / $\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$
PyOx/CNT _{0,2} /GCE	25-375	4,6	0,12
PyOx/CNT _{0,5} /GCE	25-450	3,8	0,20
PyOx/CNT _{1,0} /GCE	25-425	5,5	0,04

3.3.2.2. Efeito do potencial aplicado

Com os resultados obtidos do estudo do efeito da concentração de nanotubos, escolheu-se a concentração de 0,5 % para prosseguir com o desenvolvimento do biossensor. Até então todos os ensaios com CNT foram efectuados a um potencial de +0,5 V. Para investigar a possível utilização de um potencial mais próximo de 0,0 V para minimizar a influência de interferentes na corrente observada, procedeu-se a um estudo de potencial aplicado utilizando o biossensor PyOx/CNT_{0,5}/GCE.

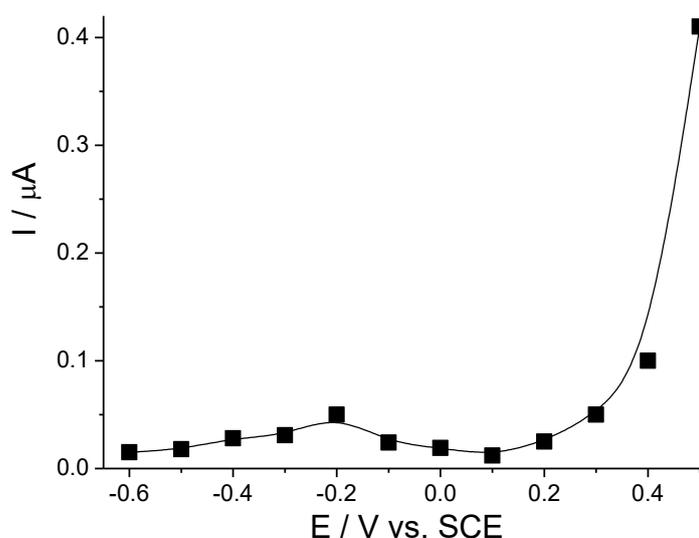


Figura 3.12 - Variação da corrente com o potencial aplicado no biossensor PyOx/CNT_{0,5}/GCE, a corrente registada diz respeito a uma única adição de 500 μM, experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M pH 7,0 com [Mg²⁺] = [TPP]= 1mM.

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 3.12. Observa-se que a corrente mais elevada corresponde ao potencial de +0,5 V. Para os pontos que se encontram entre 0,5 e 0,1 V, verifica-se que com a diminuição do potencial aplicado, a corrente também diminui. Nos potenciais entre 0,1 e -0,2 V verifica-se um novo pequeno aumento da corrente, de -0,2 a -0,6 V a corrente volta a decrescer. Nos potenciais positivos ocorre a oxidação do peróxido de hidrogénio e com a diminuição do potencial este processo torna-se menos eficiente, a potenciais negativos ocorre a regeneração do FAD e redução do peróxido de hidrogénio. A soma das correntes catódicas e anódica em potenciais negativos provoca um decréscimo na intensidade de corrente devido à ocorrência das reacções em regime competitivo.

3.3.2.3. Efeito da imobilização do FAD

A enzima piruvato oxidase é uma enzima tetramérica e necessita de três cofactores para manter a sua actividade, nomeadamente tiamina pirofosfato (TPP-thiamine pyrophosphate), Mg²⁺ e FAD. Os cofactores TPP e Mg²⁺ são necessários para a estabilidade da estrutura terciária e para a reactividade do centro activo da enzima. O cofactor FAD é essencial para a actividade da enzima,

servindo como dador/aceitador de hidrogénio nas reacções de oxidação/redução. Devido a esta exigência e tendo em conta o trabalho efectuado em [5], decidiu-se avaliar o efeito da imobilização do cofactor FAD na camada enzimática.

O principal objectivo da investigação deste factor é o de avaliar a diferença na resposta do biossensor quando o cofactor se encontra imobilizado na camada enzimática ou está presente na solução de electrólito suporte. Para efectuar esse estudo, utilizaram-se dois biossensores com CNT e PyOx que diferiam entre eles pelo facto de um ter o FAD junto com a enzima, PyOx/CNT_{0,5}/GCE e PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE. Realizaram-se ensaios amperométricos nas mesmas condições de potencial aplicado e solução tampão utilizada. No entanto, num dos casos, PyOx/CNT_{0,5}/GCE, o FAD foi adicionado à solução de electrólito suporte.

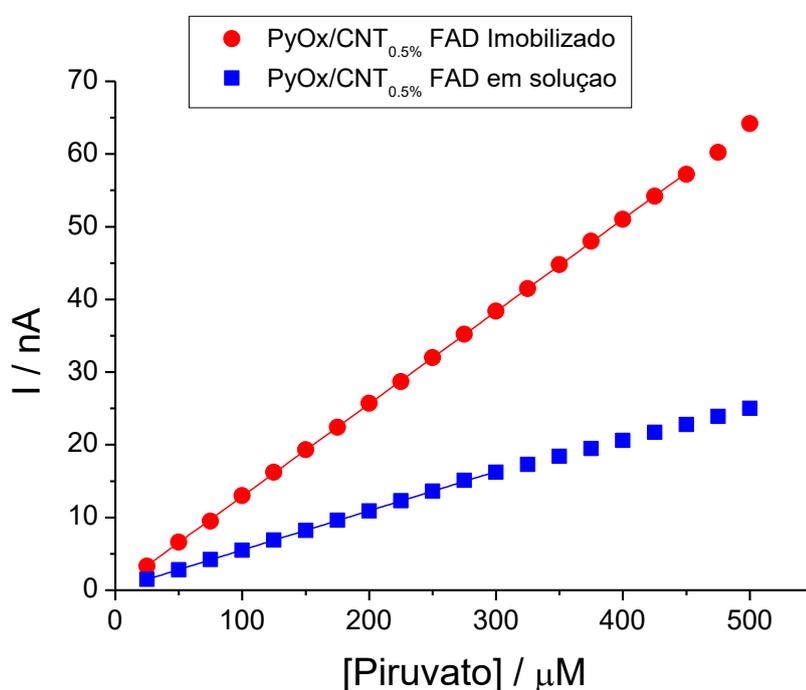


Figura 3.13 - Curvas de calibração de biossensores PyOx/CNT_{0,5}/GCE com FAD imobilizado e em solução. Experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M pH 7,0. $[\text{Mg}^{2+}] = [\text{TPP}] = 1\text{mM}$ a potencial + 0,4 V, com adições sucessivas de 25 μM de piruvato.

Na figura 3.13 estão representadas as curvas de calibração para os dois biossensores e os valores dos parâmetros obtidos destas curvas estão indicados na Tabela 3.4.

Verificou-se que a imobilização do FAD provoca um aumento da sensibilidade do biossensor assim como uma diminuição do limite de detecção. Esta melhoria deve-se à limitação do gasto do cofactor, uma vez que a utilização contínua do biossensor consome uma parte do FAD

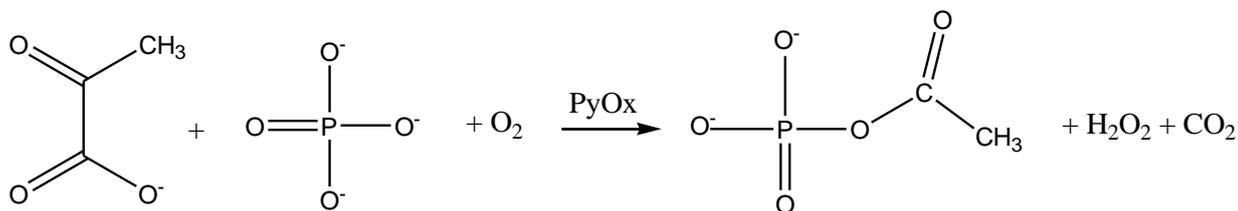
que a enzima possui no seu centro activo perdendo alguma da sua actividade. Com a imobilização do FAD, este efeito está a ser reduzido. Com estes resultados fica demonstrada que a imobilização do FAD é uma metodologia útil para melhorar a capacidade de resposta dos biossensores de piruvato.

Tabela 3.4 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/CNT_{0,5}/GCE com FAD imobilizado na camada enzimática ou em solução.

Biossensor	Gama linear / μM	LOD / μM	Sensibilidade / $\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$
PyOx/FAD/CNT _{0,5} /GCE	25-450	2,5	0,127
PyOx/FAD/CNT _{0,5} /GCE (FAD na solução)	25-300	3,4	0,054

3.3.2.4. Efeito da solução tampão e dos cofactores

A reacção que a enzima piruvato oxidase promove é a oxidação de piruvato a acetilfosfato, no decorrer da reacção o consumo de piruvato é estequiometricamente equivalente ao consumo de fosfato como está abaixo ilustrado:



Devido ao papel do ião fosfato na reacção decidiu-se testar a viabilidade do biossensor de piruvato em condições em que a concentração de fosfato do meio seja baixa, para verificar a capacidade de resposta do biossensor em matrizes que estejam fora do domínio bioquímico na tentativa de poder utilizar o biossensor num maior número de aplicações. Para essa verificação, efectuou-se um estudo com duas soluções tampão, uma de tampão fosfato e outra de tampão trizma-HCl. Como a enzima necessita de dois cofactores no meio reaccional, foram alteradas as concentrações dos cofactores Mg^{2+} e TPP para ambas as soluções tampão, com o objectivo de verificar a dependência dos cofactores em cada solução tampão.

Para avaliar o efeito da concentração dos cofactores enzimáticos Mg^{2+} e TPP no desempenho do biossensor de piruvato PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE, realizou-se um estudo inicial em tampão

fosfato, utilizando duas concentrações de Mg^{2+} e TPP, nomeadamente 0,5 e 1,0 mM para ambos. A experiência consistiu em dois ensaios amperométricos mantendo todas as condições experimentais constantes e variando as concentrações dos cofactores. As curvas de calibração foram efectuadas a +0,4 V vs. SCE com agitação contínua, as adições de piruvato foram efectuadas com um intervalo de tempo constante de 100 segundos para garantir o consumo de todo o analito.

Analisando as curvas de calibração, Figura 3.14, observa-se que a diminuição da concentração de TPP e Mg^{2+} provoca uma diminuição da sensibilidade do biossensor por um factor 0,66. Em relação aos limites de detecção, observou-se que com a diminuição da concentração dos cofactores há um aumento do limite de detecção por um factor de 1,4.

A diminuição da concentração dos cofactores afecta a actividade da enzima porque o centro activo necessita de Mg^{2+} e de TPP para a transferência do fosfato, o metal coordena com TPP e mantem-se ligado a estrutura da enzima desta forma. Junto do TPP encontra-se o FAD posicionado para que a reacção ocorra em duas etapas distintas [40]. Por isso, a falta destes cofactores restringe a actividade enzimática e limita a extensão da reacção, algo que se verifica quando comparamos os resultados das duas curvas de calibração da Figura 3.14, onde a curva referente à concentração de 0,5 mM de cofactores tem um declive inferior à curva utilizando concentrações de 1,0 mM, sendo esta constatação um indício do decréscimo da taxa de conversão dos produtos da reacção enzimática por falta dos cofactores que suportam o mecanismo de descarboxilação do piruvato.

Como foi referido no início desta secção, a enzima piruvato oxidase converte o piruvato e fosfato em acetilfosfato; o fosfato é um co-substrato da enzima e pode ser determinado alterando o meio de reacção. Assim, surge a necessidade de verificar o desempenho do biossensor na detecção de piruvato numa solução com uma quantidade limitada de fosfato para verificar o limite de resposta com essa restrição. Por isso efectuou-se um estudo amperométrico do biossensor de PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE em tampão trizma-HCl com a mesma variação da concentração dos cofactores Mg^{2+} e TPP utilizada em tampão fosfato.

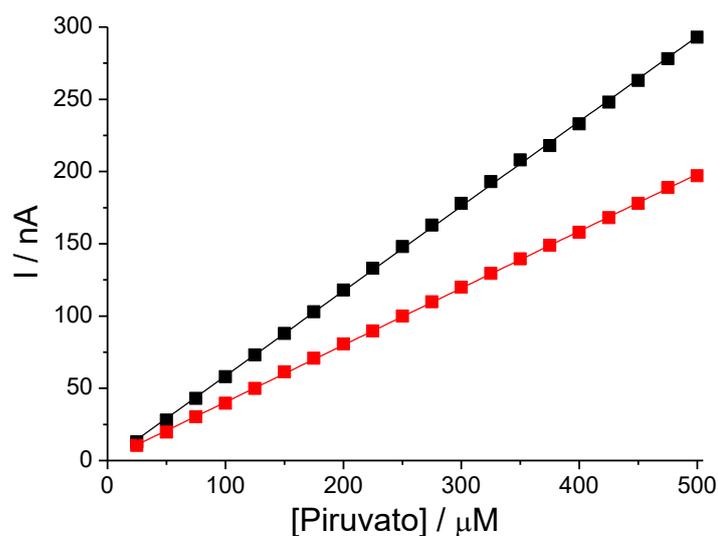


Figura 3.14 - Curvas de calibração de biossensor PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE em tampão NaPBS 0,1 M pH=7,0 com 0,5 mM (vermelho) e 1,0 mM (preto) de Mg^{2+} e TPP, experiências efectuadas a +0,4 V, com adições regulares de 25 μM .

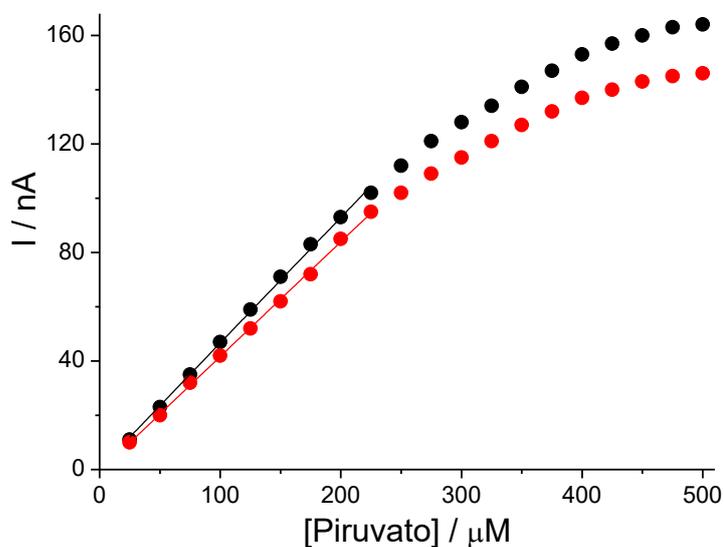


Figura 3.15 - Curvas de calibração de biossensor PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE em tampão Trizma-HCL 0,1 M pH=7,0 com 0,5 mM (vermelho) e 1,0 mM (preto) de Mg^{2+} e TPP, experiências efectuadas a +0,4 V, com adições regulares de 25 μM .

Analisando os dados da Figura 3.15 observamos que as curvas têm uma tendência semelhante, as gamas lineares são equivalentes. Contudo, a curva referente ao tampão trizma-HCl

com a concentração de 0,5 mM de cofactores apresenta um declive ligeiramente inferior e um limite de detecção superior. Comparativamente ao tampão fosfato, o efeito da diminuição da concentração dos cofactores no tampão trizma-HCl é menos pronunciado excepto quando avaliamos o limite da gama linear, que decresce para metade no tampão trizma-HCl.

Tabela 3.5 - Valores dos parâmetros analíticos dos biossensores PyOx/FAD/CNT/GCE com duas concentrações diferentes de cofactores adicionadas em soluções tampão PBS e trizma-HCl.

Biossensor	Tampão	[Mg ²⁺], [TPP] (mM)	Gama linear (μM)	LOD (μM)	Sensibilidade nA μM ⁻¹
PyOx/CNT _{0,5} /GCE	PBS	0,5	25-500	7,5	0,39
		1,0	25-500	5,2	0,59
	trizma-	0,5	25-225	8,6	0,42
	HCl	1,0	25-225	6,1	0,46

O tampão trizma-HCl tem uma quantidade limitada de iões fosfato, sendo um anião do tampão. A corrente de resposta ao piruvato atinge um limite de saturação por volta dos 225 μM; a menor influência da adição de cofactores deve-se ao facto de a limitação de fosfato na solução não permitir que a enzima reaja com o piruvato por falta do seu co-substrato, diminuindo a sua actividade e atingindo o ponto de saturação mais rapidamente de que em NaPBS.

A diferença entre as concentrações de cofactores no tampão Trizma-HCl não altera significativamente o desempenho do biossensor, como está demonstrado na tabela 3.5, sendo ambos os limites de detecção muito próximos e as suas gamas lineares iguais. A resposta linear indica que até esse ponto existem iões fosfato disponíveis para completar a reacção estequiométrica com o piruvato, desse ponto em diante, a quebra da linearidade da resposta indica que essa quantidade decresce com cada adição que é efectuada, mas não varia significativamente com a diminuição da concentração de TPP e Mg²⁺ entre 0,5 mM e 1,0 mM.. Na eventualidade de se inserir o biossensor numa matriz não-biológica com o intuito de determinar a concentração de fosfato (p.ex. tratamentos de águas e efluentes) este valor de concentração de 500 μM de piruvato é uma boa referência para ser utilizado no tratamento da amostra, em que para além dos cofactores, a adição de uma quantidade de piruvato igual ou semelhante à que foi utilizada neste estudo, é uma condição necessária para proceder à determinação de fosfato.

3.3.3. Biossensor de piruvato com PB e CNT

O biossensor de PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE demonstrou ter um bom desempenho em todas as experiências que foram realizadas mas o potencial aplicado continuou a ser uma fonte de preocupação, visto que +0,4 V é um potencial muito elevado e onde várias espécies electroactivas presentes em matrizes biológicas, tais como ácido ascórbico e ácido úrico, podem interferir.

Para ultrapassar esta limitação, decidiu-se inserir um mediador sobre a camada de nanotubos que permitisse diminuir o potencial operacional do biossensor e ao mesmo tempo permitisse uma maior selectividade na detecção do peróxido de hidrogénio que resulta da reacção enzimática da enzima piruvato oxidase.

O mediador escolhido foi o azul de Prússia que possui algumas características que podem ser exploradas para executar o papel de mediador com a enzima piruvato oxidase. O azul de Prússia é um complexo hexacianoferrato de ferro com uma estrutura tridimensional cúbica com cavidades, composto por ferro (II) e ferro (III) intercalados com outros metais alcalinos coordenados em locais chave da rede tridimensional que estabilizam a estrutura do complexo.

Ultimamente têm vindo a ser desenvolvidos novos métodos de deposição de azul de Prússia, assim como novos métodos de síntese em diversas formas como compósitos com nanotubos, nanopartículas entre outros [26-28].

3.3.3.1. Biossensor PyOx/PB/CNT

3.3.3.1.1. Deposição de azul de Prússia

Para realizar o estudo de aplicação do azul de Prússia no biossensor de PyOx/FAD/CNT_{0,5}/GCE depositou-se um filme de azul de Prússia sobre o eléctrodo modificado com nanotubos de carbono por voltametria cíclica.

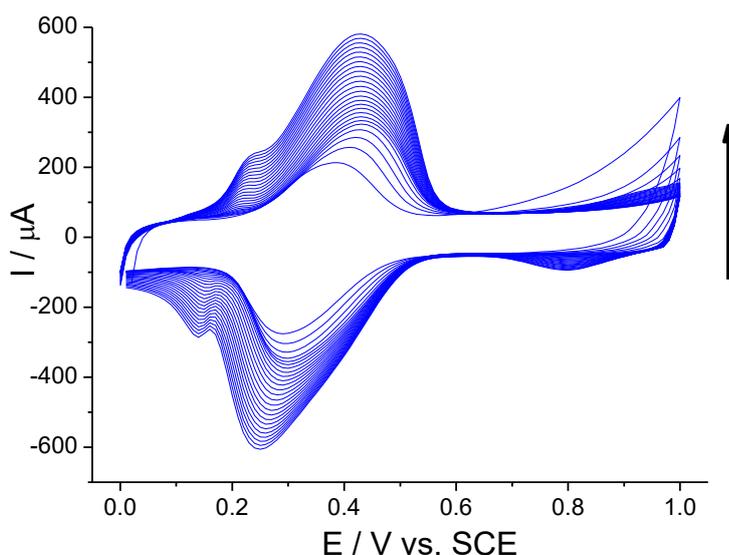


Figura 3.16 – Electrodeposição de filme de azul de Prússia. Voltamograma cíclico de deposição de azul de Prússia sobre CNT_{0,5}/GCE, velocidade de varrimento 50 mV s⁻¹, K₄[Fe(CN)₆]³⁻ e Fe(Cl)₃ 1,0 mM em 10 mM de HCl pH 1,5.

Na Figura 3.16 está representado o voltamograma cíclico de electrodeposição de azul de Prússia, efectuada sobre um eléctrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono 0,5 %, mergulhado numa solução equimolar de K₄[Fe(CN)₆]³⁻ e Fe(Cl)₃ com concentração de 1,0 mM para ferro (II) e ferro (III) com 10 mM de HCl. O pH da solução é extremamente ácido, apresentando um valor de cerca de 1,5. A janela de potencial definida está compreendida entre 0,0 e 1,0 V, a velocidade de varrimento escolhida foi de 50 mV s⁻¹ [45].

Analisando o voltamograma da Figura 3.16, observa-se o crescimento continuado da corrente com o aumento do número de varrimentos, indicando que a formação do filme é eficiente, mas que o número de varrimentos poderia ser maior.

No entanto, devido ao pH da solução, os nanotubos sofrem degradação provavelmente pela protonação dos nanotubos mesmo em zonas em que não existe carga localizada, como nos seus grupos carboxílicos, causando um colapso da estrutura agregada da camada de nanotubos. Este efeito do pH extremo da solução de azul de Prússia sobre os nanotubos levou a que se optimizasse o processo de electrodeposição e daí a escolha do número de ciclos ser 25, para minimizar o tempo de contacto do eléctrodo na solução de PB, mas permitir a formação de um filme coeso e com espessura suficiente para promover a troca de electrões.

O potencial de separação dos picos anódico e catódico aumentou de 70 mV no primeiro ciclo para 115 mV no 25º, indicando um afastamento da zona de reversibilidade devido à formação de um filme espesso de PB [45]

3.3.3.1.2. Efeito de potencial aplicado

Após a deposição do mediador azul de Prússia sobre a camada dos nanotubos, imobilizou enzima, PyOx e com o biossensor resultado, PyOx/FAD/PB/CNT_{0,5}/GCE procedeu-se a um estudo de potencial aplicado. A vantagem de reduzir o potencial aplicado está relacionada com diminuição da probabilidade de ocorrência de interferências por parte de outras espécies electroactivas que possam ser oxidadas ou reduzidas em simultâneo com o analito que se pretende determinar, falseando o valor de corrente registado e afectando a validade das medidas do biossensor.

Existe várias fontes bibliográficas [23-28] que se referem a biossensores com PB como mediador, aplicados na determinação de peróxido de hidrogénio. Decidiu-se escolher uma gama de potenciais entre -0,2 e +0,3 V para efectuar a investigação sobre o efeito do potencial aplicado.

Para efectuar a avaliação da resposta ao piruvato em função do potencial, foram efectuadas adições de 100 µM para cada valor de potencial e registado o valor da corrente observada, representando o valor de corrente em função do potencial aplicado, Figura 3.17.

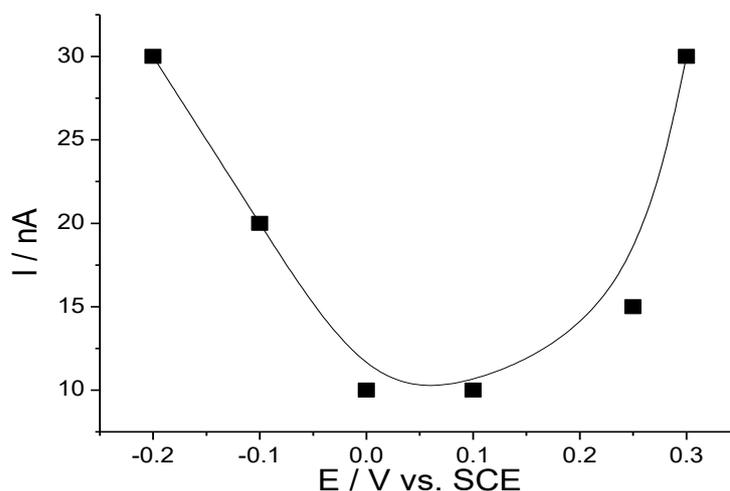


Figura 3.17 –Variação da corrente correspondente a adições de 100 µM de piruvato em função do potencial aplicado no biossensor PyOx/FAD/PB/CNT_{0,5}/GCE. Experiências efectuadas em NaPBS 0,1 M pH 7,0. [Mg²⁺] = [TPP]= 1mM.

Analisando o gráfico apresentado na Figura 3.17 observa-se que a corrente diminui com a diminuição do potencial aplicado para potenciais negativos e volta a aumentar com o aumento do potencial para potenciais positivos. Para potenciais negativos, a corrente observada diz respeito à redução do peróxido de hidrogénio pelo azul de Prússia, os valores elevados da intensidade de corrente devem-se à diminuição do efeito de barreira que auxiliam o mediador transferir os electrões para reduzir o peróxido de hidrogénio no interior da cavidade da estrutura cristalina do azul de Prússia. A potenciais positivos, ocorre a oxidação do peróxido de hidrogénio.

3.3.3.1.3. Estudo do efeito do pH

O efeito do pH na resposta de um biossensor é um parâmetro que deve ser aferido para testar a viabilidade do dispositivo para a sua aplicabilidade no âmbito de análise clínica, ambiental ou de controlo de qualidade alimentar. As exigências em termos das condições de pH são muito diferentes e por isso efectuou-se um estudo de pH para o biossensor PyOx/FAD/PB/CNT_{0,5}/GCE. Devido à instabilidade da estrutura do mediador em valores de pH elevados e devido a gama de pH ácido da enzima livre decidiu-se testar um intervalo de pH restringido entre 6,0 e 7,4.

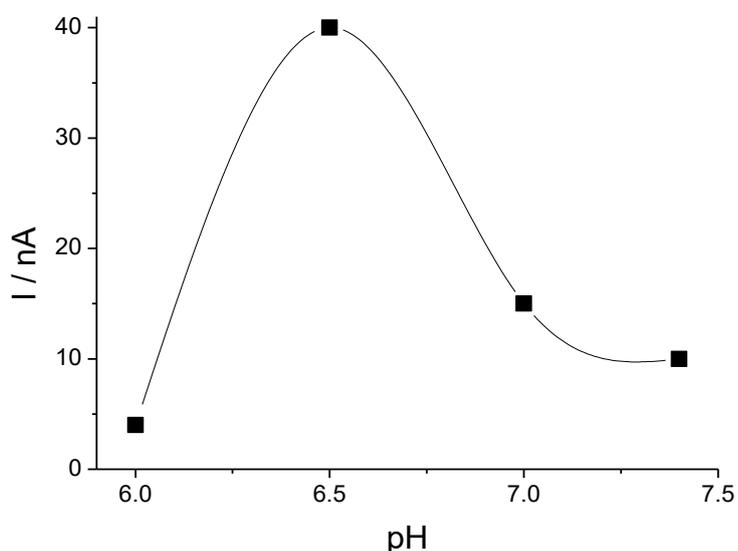


Figura 3.18 - Dependência de intensidade de corrente em função do pH no biossensor PyOx/FAD/PB/CNT_{0,5}/GCE. A corrente registada é referente a uma adição 100 μ M de piruvato, experiências efectuadas em NaPBS [Mg^{2+}] = [TPP] = 1mM a potencial + 0,3 V vs SCE.

Os resultados apresentados na Figura 3.18 referem a ensaios amperométricos efectuados com aplicação de um potencial de +0,3 V com agitação contínua, os valores de intensidade de corrente sendo registados após a adição de 100 μM de piruvato. A pH 6,0 a intensidade de corrente é baixa, considerando-se uma condição que limita a operacionalidade do biossensor, com o aumento do valor do pH até 6,5, atinge-se um máximo de intensidade de corrente. Para pH 7,0 a intensidade de corrente decresce significativamente e diminui mais para pH 7,4 embora esta diminuição seja menos acentuada.

O pH óptimo do piruvato oxidase livre encontra-se entre 6-6,5, uma vez que esta enzima actua num ambiente ácido. Pelos resultados observados verifica-se que a enzima mantém as propriedades nativas, ou seja, que o processo de imobilização com glutaraldeído não altera a estrutura nativa da enzima [57].

3.3.3.2. Biossensor PyOx/PB-QUIT-Np/CNT

Como observado anteriormente, os nanotubos de carbono sofrem uma grande degradação durante o processo de electrodeposição. Para contornar esta dificuldade sintetizaram-se umas nanopartículas de azul de Prússia com quitosana. O método de síntese utilizado foi retirado de [46]. Esta metodologia foi escolhida devido à biocompatibilidade do quitosana, que aparenta ser uma melhor escolha comparada aos polímeros tradicionais, como por exemplo o PDDA. Em seguida imobilizou-se a enzima PyOx, como anteriormente.

Na figura 3.19 está representada a curva de calibração do biossensor PyOx/FAD/PB-QUIT-Np/CNT_{0,5}/GCE efectuada numa solução electrolito de tampão fosfato pH 7,0 com adições sucessivas de 25 μM de piruvato a um potencial de +0,25 V. A experiência foi realizada com agitação constante e todas as adições foram espaçadas com um período de tempo suficientemente grande para garantir que todo o piruvato era oxidado pela enzima. Não foram adicionados Mg^{2+} e TPP a solução tampão. O esquema de funcionamento do biossensor está ilustrado na Figura 3.20.

Os resultados obtidos para este biossensor revelam uma resposta de maior sensibilidade comparado com o biossensor com PB depositado por voltametria cíclica. Os parâmetros analíticos calculados a partir do ajuste dos pontos da curva de calibração são um limite de detecção de 5,2 μM , uma sensibilidade 0,07053 nA μM^{-1} e uma gama linear até 500 μM .

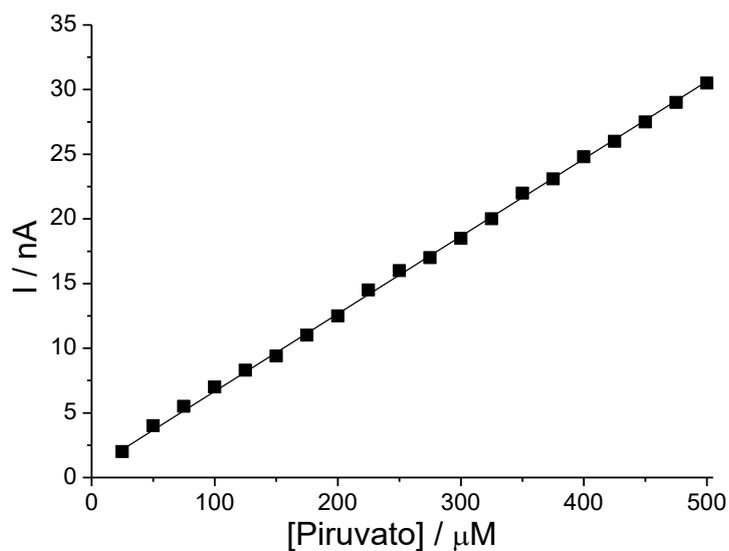


Figura 3.19 - Curva de calibração do biossensor PyOx/FAD/PB-QUIT-Np/CNT_{0,5}/GCE. Experiência efectuada em NaPBS 0,1 M pH 7,0 a +0,25 V, com adições sucessivas de 25 μM .

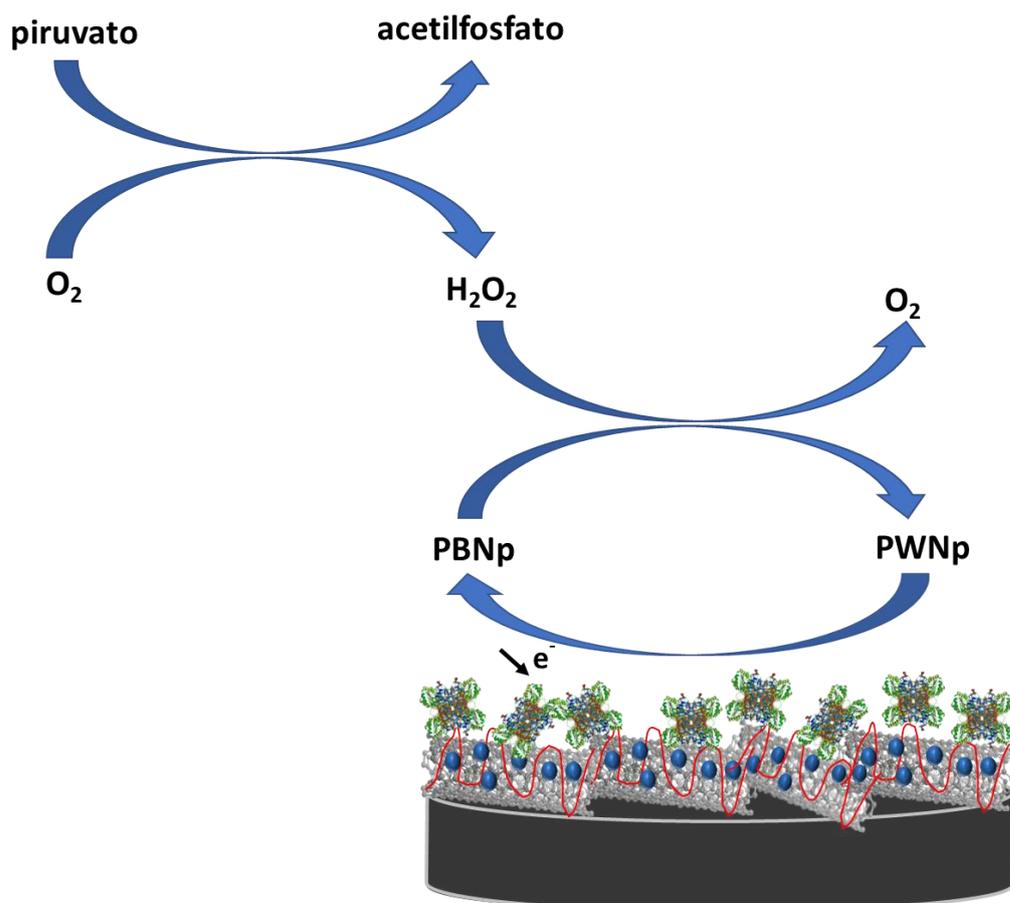


Figura 3.20 - Esquema reacional do biossensor de PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE.

Tabela 3.6 - Parâmetros analíticos do biossensor de piruvato PyOx/FAD/PB-QUIT-Np/CNT_{0,5}/GCE e comparação com a literatura.

Biossensor	Potencial Volts (V)	Gama linear (μM)	LOD (μM)	Sensibilidade ($\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$ cm^{-2})	Ref.
PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT _{0,5} /GCE	+0,25 (SCE)	25-500	5,2	1,00	Este trabalho
PyOx/FAD/Fc/ β -CD/AuE	+0,6 (SCE)	2,67-66,7	0,57	7,5 $\text{nA } \mu\text{M}^{-1}$ (área não especificada)	[58]
PyOx/Os(bipy) ₂ py-Cl/GCE	+0,4 (Ag/AgCl)	20-300	20	76	[59]
PyOx/6-ACA/3-MPA/AuE (+5,0 mM K ₃ Fe(CN) ₆ em tampão)	+0,03 (Ag/AgCl)	1,6-10,7	0,56	12,4	[60]

PyOx-piruvato oxidase; FAD-flavina adenina dinucleotídeo; PB-Azul de Prússia; Quit-quitosana; Fc-ferroceno; β -CD- ciclodextrina β ; Os(bipy)₂py-Cl- [Osmium(2,2'-bipiridina)₂ (4-{pirrol-1-hexil}piridina)Cl]; ACA-ácido aminocaproico; MPA-ácido mercaptopropionico; GCE-eléctrodo de carbono vítreo; AuE-eléctrodo de ouro

Para efeitos de comparação com o biossensor desenvolvido neste trabalho, PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE não foram encontrados muitos biossensores, sendo que existe relatos sobre biossensores utilizando a enzima PyOx para determinação de fosfato e ainda alguns para determinação de piruvato, mas que usam outras técnicas além da amperometria. Os biossensores apresentados na Tabela 3.6 funcionam todos a potenciais positivos, referentes à oxidação do peróxido de hidrogénio que resulta da reacção enzimática. O biossensor PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE utiliza o potencial mais baixo de todos, excepto o [60], no entanto durante o estudo de potencial comprovou-se que o biossensor desenvolvido com nanopartículas de azul de Prússia exibia resposta também a 0,0 V. Outra vantagem do biossensor PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE é que tem a gama linear a mais larga de todos. No entanto a sua sensibilidade não é muito elevada e o seu limite de detecção não é dos mais baixos; mas de realçar que é um factor de 4 mais baixo de que o do biossensor desenvolvido também num eléctrodo de carbono vítreo utilizando osmio como mediador redox; os outros dois biossensores com limites de detecção inferiores e semelhantes foram os dois preparados em superfícies de eléctrodos de ouro.

Uma das metas em desenvolvimento de biossensores enzimáticos electroquímicos é de serem capazes de funcionar sem adição de reagentes, os exemplos citados na Tabela 3.6 operam

sem adição de pelo menos dois cofactores enzimáticos, Mg^{2+} e TPP, a excepção de que o PyOx/Os(bipy)₂py-Cl/GCE [59] admite utilizar estes cofactores para estabilizar a enzima, aquando não estiver a ser utilizada.

O biossensor PyOx/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE desenvolvido neste trabalho actua na ausência de TPP e Mg^{2+} num meio oxigenado, as nanopartículas PB-Quit-NPs apresentam uma superfície protegida por quitosana que, além de ser biocompatível, previne que ocorra agregação das nanopartículas e por isso se dispersam sobre os nanotubos. A razão pela qual o biossensor PyOx/FAD/PB-Quit-NPs/CNT_{0,5}/GCE apresenta actividade nestas condições deve-se à presença do FAD e ao efeito do polímero, quitosana, que devido à sua biocompatibilidade previne a perda de TPP por formar uma superfície altamente biocompatível e mantendo a estrutura nativa da enzima, os grupos acetilo da quitosana podem ainda formar ligações com o fosfato, dando acetilfosfato que poderá ser transferido para o centro activo da enzima uma vez que este se encontra numa região menos profunda do seu envólucro proteico. Existe ainda o efeito do azul de Prússia que é um composto com grande apetência para oxidação de peróxido de hidrogénio, quando se dá a reacção enzimática liberta-se peróxido de hidrogénio da enzima para a solução. As cavidades do azul de Prússia mantêm-se nas nanopartículas, assim como referido em [46], estão livres de peróxido nesse instante, devido ao gradiente de concentração no interior das cavidades, o peróxido difunde na direcção das nanopartículas e é oxidado na sua superfície [46].

Capítulo 4 Conclusões

Dos resultados obtidos nas experiências efectuadas neste trabalho de investigação existem conclusões para todos os biossensores que foram desenvolvidos, através de modificação química com nanotubos de carbono como base de suporte em todos os biossensores. A utilização destes eléctrodos com CNT no desenvolvimento de biossensores enzimáticos demonstrou ser vantajosa comparativamente aos eléctrodos de carbono vítreo não modificados por se verificar uma melhoria substancial de todos os parâmetros analíticos avaliados com excepção das gamas lineares, que diminuem devido a uma ligeira distorção da estrutura da enzima com o aumento da rugosidade da superfície. A utilização dos nanotubos permitiu que as deteções amperométricas fossem efectuadas a potenciais mais baixos do que os biossensores com eléctrodos de carbono vítreo sem CNT e diminuir os limites de detecção. O método de imobilização por reticulação com glutaraldeído foi uma escolha de sucesso devido ao impacto reduzido na estrutura da enzima como foi verificado pelo estudo de pH e pelo desempenho global dos biossensores. A estrutura do mediador utilizado no biossensor tem influência no seu desempenho devido à aplicação de um potencial inferior.

No caso do biossensor de glucose com poli(vermelho neutro), a camada polimérica sobre a camada de nanotubos diminui a gama linear por aumentar a rugosidade da superfície, levando a uma desactivação parcial da enzima, no entanto verificou-se um aumento da sensibilidade e uma diminuição do limite de detecção.

Para o biossensor de lactato com ferroceno e nanotubos a gama linear aumenta e verifica-se uma diminuição do potencial e do limite de detecção, comparado com o biossensor sem mediador, enquanto que o Nafion faz com que não hajam perdas do mediador para a solução.

O biossensor de piruvato com nanotubos e nanopartículas de azul de Prússia protegido com quitosana não sofre o efeito desactivador da superfície dos nanotubos, devido à presença das nanopartículas entre os nanotubos com a camada polimérica de quitosana por este polímero ser biocompatível. A imobilização do FAD na camada enzimática permite que este biossensor funcione sem adição dos restantes cofactores à solução. As nanopartículas de azul de Prússia foram uma boa escolha de mediador pela capacidade de oxidação do peróxido de hidrogénio provocando uma diminuição do limite de detecção.

Perspectivas futuras

Futuramente deve ser avaliado com cuidado o efeito de espécies interferentes na resposta de todos os biossensores, espécies como ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina estão presentes em abundância em meios biológicos. Embora os biossensores enzimáticos estejam específicos, podem existir alguns efeitos destes compostos que possam influenciar a resposta. A reprodutibilidade é um dos parâmetros mais importantes dos biossensores e deve ser testado em diferentes meios. A aplicação na determinação dos respectivos analitos com cada um dos biossensores seria de igual modo necessária.

Um estudo de impedância electroquímica para cada biossensor após cada etapa da sua construção daria informação importante sobre as características do conjunto e iria ajudar na optimização da arquitectura do biossensor. Seria possível avaliar melhor o efeito que os mediadores exercem no processo desencadeado pela reacção do biossensor e desta forma tirar conclusões mais aprofundadas sobre os processos em questão.

Para os biossensores de LOx e GOx, deve ser realizado um estudo extenso das condições de reacção como pH, potencial e solução tampão. Podem ser efectuados estudos da imobilização enzimática sobre os eléctrodos de GCE/CNT com o intuito de optimizar a imobilização e avaliar se existe algum método mais indicado para a imobilização.

Relativamente ao biossensor de PyOx, é necessário proceder à análise das nanopartículas PB-QUIT-Np com objectivo de determinar com exactidão o seu diâmetro, composição elementar e morfologia com a utilização de técnicas como microscopia electrónica de transmissão. Isto será muito importante para a optimização da arquitectura do biossensor.

Bibliografia

- [1] Clark Jr., L.; Lyons, C.; Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery; *Annals of the New York Academy of Sciences* 102 (1962) 29-45
- [2] Bahadir, E.B.; Sezginturk, M.K.; Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, bioterror/biowarfare analyses; *Analytical Biochemistry* 478 (2015) 107-120
- [3] Nakamura, H.; Recent organic pollution and biosensing methods; *Analytical Methods* 2 (2010) 430-444
- [4] Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S.; Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification; *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 121-131
- [5] Chan, D.; Barsan, M.M.; Korpan, Y.; Brett, C.M.A.; L-lactate selective impedimetric bienzimatic biosensor based on lactate dehydrogenase and pyruvate oxidase; *Electrochimica Acta* 231 (2017) 209-215
- [6] Blum, L.J.; Coulet P.R.; Biosensor principles and applications; *New York: M. Dekker*, 1991
- [7] Ijima, S; Helical microtubules of graphitic carbon; *Nature* 354 (1991) 56-58
- [8] Ozin, G.A.; Arsenault, A.C.; Nanochemistry a chemical approach to nanomaterials; *Cambridge RSC Pub* 2009
- [9] Allcock, H.R.; Introduction to materials chemistry; *Hoboken, N, J; Wiley* 2008
- [10] Ghica, M.E.; Pauliukaite, R.; Fatibello-Filho, O.; Brett, C.M.A.; Application of functionalised carbon nanotubes immobilised in chitosan films in amperometric enzyme biosensors; *Sensors and Actuators B-Chemical* 142 (2009) 308-315
- [11] Barsan, M.M.; Ghica, M.E; Brett, C.M.A.; Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: A review; *Analytica Chimica Acta* 881 (2015) 1-23
- [12] Yang, N; Xianping, C; Tianling, R; Zhang, P; Yang, D; Carbon nanotube based biosensors; *Sensors and Actuators B:Chemical* 207 (2015) 690-715
- [13] Turkevich, J.; Stevenson, P.C.; Hillier, J.; A study of the nucleation growth processes in the synthesis of colloidal gold; *Discussion of the Faraday Society* 11 (1951) 55-75
- [14] Khan, Z.U.H.; et al; Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles; *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology* 173 (2017) 150-164
- [15] Vágó, A.; Szakacs, G.; Sáfrán, G.; Horvath, R.; Pécz, B.; Lagzi, I.; One-step green synthesis of gold nanoparticles by mesophilic filamentous fungi; *Chemical Physics Letters* 645 (2016) 1-4
- [16] Zha, J.; Chunfa, D.; Xiangjie, W.; Xianglin, Z.; Xinhua, X.; Xiuzhi, Y.; Green synthesis and characterization monodisperse gold nanoparticles using Ginkgo Biloba leaf extract; *Optik – International Journal of Light and Electron Optics*; 144 (2017) 511-521
- [17] González-Ballesteros, N.; Prado-López, S.; Rodríguez-González, J.B.; Lastra, M.; Rodríguez-Arguelles, M.C.; Green synthesis of gold nanoparticles using Brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 153 (2017) 190-198

- [18] Saleem, M.; Yu, H.; Wang, L.; Abdin, Z., Khalid, H.; Akram, M.; Abbasi, N.M.; Huang, J.; Review on synthesis of ferrocene-based redox polymers and derivatives and their application in glucose sensing; *Analytica Chimica Acta* 876 (2015) 9-25
- [19] Florescu, M.; Brett, C.M.A.; Development and characterization of cobalt hexacyanoferrate modified carbon electrodes for electrochemical enzyme biosensors; *Analytical Letters* 37 (2004) 871-886
- [20] Paulinkaite, R.; Florescu, M.; Brett, C.M.A.; Characterization of cobalt and copper hexacyanoferrate-modified carbon film electrodes for redox-mediated biosensors; *Journal of Solid State Electrochemistry* 9 (2005) 354-362
- [21] Neff, V.D.; Electrochemical oxidation and reduction of thin films of Prussian blue; *Journal of the Electrochemical Society* 125 (1978) 886-887
- [22] Itaya, K.; Akahoshi, H.; Toshima, S.; Electrochemistry of Prussian blue modified electrodes: an electrochemical preparation method; *Journal of the Electrochemical Society* 129 (1982) 1498-1500
- [23] Karyakin, A.A.; Prussian blue and its analogues: Electrochemistry and analytical applications; *Electroanalysis* 13 (2001) 813-819
- [24] Pandey, P.C.; Pandey, A.K.; Novel synthesis of Prussian blue nanoparticles and nanocomposite sol: Electro-analytical application in hydrogen peroxide sensing; *Electrochimica Acta* 87 (2013) 1-8
- [25] Ricci, F.; Palleschi, G.; Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian blue modified electrodes; *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 389-407
- [26] Hornok, V.; Dékány, I.; Synthesis and stabilization of Prussian blue nanoparticles and application for sensors; *Journal of Colloid and Interface Science* 309 (2007) 176-182
- [27] Jia, Z.; Sun, G.; Preparation of Prussian blue nanoparticles with single precursor; *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 302 (2007) 326-329
- [28] Yang, P.; Peng, J.; Chu, Z.; Jiang, D.; Jin, W.; Facile synthesis of Prussian blue nanocubes/silver nanowires network as a water-based ink for the direct screen-printed flexible biosensor chips; *Biosensors and Bioelectronics* 92 (2017) 709-717
- [29] Ghica, M.E.; Brett, C.M.A.; The influence of carbon nanotubes and polyazine redox mediators on the performance of amperometric enzyme biosensors; *Microchimica Acta* 170 (2010) 257-265
- [30] Pauliukaite, R.; Brett, C.M.A.; Poly (neutral red): Electrosynthesis, characterization, and application as a redox mediator; *Electroanalysis* 20 (2008) 1275-1285
- [31] Ghica, M.E.; Brett, C.M.A.; Development of novel glucose and pyruvate biosensors at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. Application to natural samples; *Electroanalysis* 18 (2006) 748-756
- [32] Yogeswaran, U.; Chen, S.; Separation and concentration effect of *f*-MWCNT's on electrocatalytic responses of ascorbic acid, dopamine and uric acid at *f*-MWCNT's incorporated with poly(neutral red) composite films; *Electrochimica Acta* 52 (2007) 5985-5996
- [33] Dijkman, W.P.; Gonzalo, G.; Mattevi, A.; Fraaije, M.W.; Flavin oxidases: classification and applications; *Applied Microbiology and Biotechnology* 97 (2013) 5177-5188
- [34] <https://pdb101.rcsb.org/motm/77>

- [35] Hetch, H.; Kaliz, J.; Hendle, R.D.; Schmid, D.; Shomburg, D.; Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2-3 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 229 (1993) 153-172
- [36] O'Malley, J.J.; Weaver, J.L.; Subunit structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger*; *Biochemistry* 11 (1972) 3527-3532
- [37] Umena, Y.; Yorit, K.; Matsuoki, T.; Kita, A.; Fukui, K.; Morimot, Y.; The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus Viridans* at 2,1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition, *Biochemical and Biophysical research communications*; 350 (2006) 249-256
- [38] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4RJE>
- [39] Blake, R.; O'Brien, T.A.; Gennis, R.B.; Hager, L.P.; Role of divalent metal cation in the pyruvate oxidase reaction; *The Journal of Biological Chemistry* 257 (1982) 9605-9611
- [40] Muller, Y.A.; Schulz, G.E.; Structure of the thiamine and flavin dependent enzyme pyruvate oxidase; *Science* 259 (1993) 965-967
- [41] Juan, E.C.M.; Hoque, M.M.; Hossai, M.T.; Yamamoto, T.; Yamamura, S.; Suzuki, K.; Sekiguchi, T.; Takénaka, A.; The structures of pyruvate oxidase from *Aerococcus Viridans* with cofactors and a reaction intermediate reveals the flexibility of the active site tunnel for catalysis; *Acta Crystallographica* F63 (2007) 900-907
- [42] Kim, D.; Herr, A.E.; Protein immobilization techniques for microfluidics assays; *Biomicrofluidics* 7 (2013) 041501
- [43] Mross, S.; Pirrat, S.; Zimmermann, P.; Kraft, M.; Microfluidic enzymatic biosensing systems: A review; *Biosensors and Bioelectronics* 70 (2015) 376-391
- [44] Electroquímica, principios, métodos e aplicações; Ana Maria Oliveira Brett; Christopher Michel Ashton Brett; *Almedina*, 1996.
- [45] Zhenfeng, L.; Chen, J.; Li, W.; Chen, K.; Nie, L.; Shouzhuo, Y.; Improved electrochemical properties of Prussian blue by multi-walled carbon nanotubes; *Journal of Electroanalytical Chemistry* 603 (2007) 59-66
- [46] Zhang, Q.; Zhang, L., Li, J.; - Fabrication and electrochemical study of monodisperse and size controlled Prussian blue nanoparticles protected by biocompatible polymer *Electrochimica Acta* 53 (2008) 3050-3055
- [47] Ghica, M.E.; Brett, C.M.A.; Development of carbon film electrode ferrocene-mediated glucose biosensor; *Analytical Letters* 38 (2005) 907-920,
- [48] Prakash, A.P.; Chang, Y.; Chen, S.; Amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized on gelatin-multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode; *Bioelectrochemistry* 80 (2011) 114-120
- [49] Liu, X.; Shi, L.; Niu, W.; Li, H.; Xu, G.; Amperometric glucose biosensor based on single-walled carbon nanohorns; *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 1887-1890
- [50] Mani, V.; Devadas, B.; Chen, S.-M.; Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor; *Biosensors and Bioelectronics* 41 (2013) 309-315

- [51] Gouveia-Caridade, C.; Pauliukaite, R.; Brett, C.M.A.; Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol; *Electrochimica Acta* 53 (2008) 6732-6739
- [52] Li, L.; Peng, J.; Chu, Z.; Jiang, D.; Jin, W.; Single layer of graphene/Prussian blue nano-grid as the low-potential biosensors with high electrocatalysis; *Electrochimica Acta* 217 (2016) 210-217
- [53] Cui, X.; Li, C.M.; Zang, J.; Yu, S.; Highly sensitive lactate biosensor by engineering chitosan/PVI-Os/CNT/LOD network nanocomposite; *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 3288-3292
- [54] Dagar, K.; Pundir, C.S.; An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode; *Enzyme and Microbial Technology* 96 (2017) 177-186
- [55] Garjonyte, R.; Yigzaw, Y.; Meskys, R.; Malinauskas, A.; Gorton, L.; Prussian blue-and lactate oxidase-based amperometric biosensor for lactic acid; *Sensors and Actuators B:Chemical* 79 (2001) 33-38
- [56] Goran, J.M.; Lyon, J.L.; Stevenson, K.J.; Amperometric detection of L-lactate using nitrogen-doped carbon nanotubes modified with lactate oxidase; *Analytical Chemistry* 83 (2011) 8123-8129
- [57] Akyilmaz, E.; Yorganci, E.; Construction of an amperometric pyruvate oxidase enzyme electrode for determination of pyruvate and phosphate; *Electrochimica Acta* 52 (2007) 7972-7977
- [58] Yumei, L.; Zhiqiang, F.; Kejun, D.; Yifeng, T.; Study on a pyruvate oxidase biosensor based on β -cyclodextrin with ferrocene as electron-transfer mediator; *Analytical Letters* 42 (2009) 312-322
- [59] Gajovic, N.; Habermuller, K.; Warsinke, A.; Schuhmann, W.; Scheller, F.W.; A pyruvate oxidase electrode based on an electrochemically deposited redox polymer; *Electroanalysis* 11 (1999) 1377-1383
- [60] Bayram, E.; Akyilmaz E.; A new pyruvate oxidase biosensor based on 3-mercaptopropionic acid/6-aminocaproic acid modified gold electrode, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2013; 42; 418-423.