



**CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Maurícia Beddin Fritzen Garcia

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS:
ATIVIDADE, ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DA
PEROXIDASE IMOBILIZADA EM BICAMADAS LIPÍDICAS E
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Florianópolis
2010

Maurícia Beddin Fritzen Garcia

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS:
ATIVIDADE, ESTABILIDADE E APLICAÇÃO DA
PEROXIDASE IMOBILIZADA EM BICAMADAS LIPÍDICAS E
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Físico-Química

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Co-orientadores: Prof. Dr. Valdir Soldi
Prof^ª. Dr^ª. Inês R. W. Zwirtes de Oliveira

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

G216i Garcia, Maurícia Beddin Fritzen
Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados
[tese] : atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase
imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas
poliméricas / Maurícia Beddin Fritzen Garcia ; orientadora,
Tânia Beatriz Creszynski Pasa. - Florianópolis, SC, 2010.
122 p.: il., grafs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia

1. Química. 2. Peroxidase. 3. Nanopartículas. 4.
Eletroquímica. 5. Microscopia. 6. Bicamadas lipídicas. 7.
Biossensores. I. Pasa, Tania Beatriz Creszynski. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

Dedico este trabalho aos meus pais Artemio e Lourdes, e irmãs Lucélia e Carlise; pelo amor, apoio e carinho que sempre tiveram por mim.

Ao Alexandre pelo amor,
compreensão e por estar
sempre ao meu lado e me
fazer acreditar que valeu a
pena.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer todos aqueles que participaram direta ou indiretamente do processo de concepção deste trabalho, especialmente:

À Prof^a. Dr^a. Tânia Beatriz Creczynski Pasa pela orientação, competência e amizade, além da oportunidade dada de trabalhar em seu grupo de pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Inês R. W. Zwirtes de Oliveira pela amizade de longa data e pela valiosa ajuda e conhecimento que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valdir Soldi pela amizade e por ter co-orientado este trabalho.

Ao Prof. Dr. André A. Pasa pela amizade, pelas colaborações e pelas portas sempre abertas do seu laboratório.

À Dra. Betina G. Zanetti-Ramos pela amizade e pela “doação” das nanopartículas de PU-PEG sintetizadas em seu doutoramento e que foram utilizadas como um dos materiais nanoestruturados neste trabalho.

Aos amigos Cristian e Vinícius pela valiosa ajuda com o AFM.

Às amigas do laboratório do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas (Dep. de Ciências Farmacêuticas, UFSC) e aos amigos do Laboratório de Filmes Finos e Superfícies-LFFS (Dep. de Física, UFSC) pelo ótimo ambiente de trabalho e pelas boas conversas.

Ao Departamento de Química da UFSC por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos professores da banca examinadora, pela avaliação desta tese.

E a Deus, pela proteção, paz e saúde.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidas diferentes estratégias de imobilização da peroxidase, empregando como materiais nanoestruturados bicamadas lipídicas suportadas em Au (111) via SAMs de ditiotretitol (DTT) e nanopartículas de poliuretano peguiladas (PU-PEG). Os sistemas enzima-bicamadas lipídicas e enzima-nanopartículas poliméricas foram caracterizados através da técnica de microscopia de força atômica e otimizados pelas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e voltametria de onda-quadrada. Foi possível constatar que a HRP foi imobilizada com sucesso nas bicamadas de DMPC suportadas em SAMs de DTT em Au (111), tendo sido possível a detecção de dopamina. No entanto, não foi possível realizar estudos de estabilidade, repetibilidade e reprodutibilidade pois o sistema se mostrou instável para fins de aplicação do dispositivo. Os resultados obtidos no estudo de caracterização das nanopartículas de PU-PEG indicaram que a técnica de AFM permitiu observar a forma, a distribuição das nanopartículas, assim como a interação das mesmas em diferentes suportes sólidos. Além disso, as nanopartículas de PU-PEG foram suportes adequados para a imobilização da peroxidase extraída do pinhão e o eletrodo de pasta de carbono construído com este sistema foi de fácil preparação, apresentando baixo custo, rapidez nas análises, boa sensibilidade e estabilidade na determinação de dopamina. Para a obtenção de informações mais precisas a respeito do processo de adsorção da peroxidase nas nanopartículas, foi realizado um estudo sistemático da interação da HRP purificada em nanopartículas de PU-PEG. Foi investigada a influência da imobilização na atividade catalítica da enzima e a aplicação deste sistema na determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos. O eletrodo de pasta de carbono modificado com a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG apresentou resultados adequados para a determinação de dopamina, hesperidina e diosmina, obtendo-se amplas faixas de concentração e baixos limites de detecção.

Palavras-chave: peroxidase; bicamadas lipídicas; nanopartículas poliméricas; biossensores; eletroquímica; microscopia de força atômica.

ABSTRACT

In this work different strategies of peroxidase immobilization were developed using lipid bilayers supported in Au (111) by DTT self-assembled monolayers and pegylated polyurethane nanoparticles (PU-PEG) as nanostructured materials. The enzyme-lipid bilayers and enzyme-polymeric nanoparticles systems were characterized by atomic force microscopy and optimized by electrochemical techniques such as cyclic voltammetry and square wave voltammetry. It was possible to notice that the HRP was successfully immobilized in the DMPC bilayers supported on Au (111) by DTT self assembled monolayers. However, it was not possible to carry out stability, repeatability and reproducibility studies since this system was inappropriate and unstable as a biosensor. The results obtained in the PU-PEG nanoparticles characterization study showed that the technique of AFM allowed us to observe the size and distribution of the nanoparticles, as well as their interaction with different solid supports. Moreover, the PU-PEG nanoparticles were suitable materials for the immobilization of peroxidase extracted from pine kernel. The modified carbon paste electrode constructed from this system was easy to prepare, with low cost, high performance, good sensitivity and stability in dopamine determination. We also performed a systematic study of the peroxidase adsorption in the PU-PEG nanoparticles. For that, a commercial obtained purified enzyme (HRP) was used. It was investigated the influence of the immobilization on catalytic activity of the enzyme and the application of this system in the determination of phenolic compounds in pharmaceutical products. The carbon paste electrode modified with HRP immobilized on PU-PEG nanoparticles showed adequate results in the dopamine, hesperidin and diosmin determinations, resulting in wide ranges of concentrations and low detection limits.

Keywords: peroxidase; lipid bilayers; polymeric nanoparticles; biosensors; eletrochemistry; atomic force microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de métodos que podem ser utilizados para a imobilização de bicamadas lipídicas: monocamadas auto-organizadas de tiois ou silanos em suportes de ouro ou óxido de silício, respectivamente (A); moléculas espaçadoras (B); suporte sólido com um filme fino de água separando-os (C); matriz polimérica contendo cadeias hidrofóbicas (D).....	7
Figura 2 - Representação esquemática de uma monocamada auto-organizada (SAM).....	8
Figura 3 - Estrutura química do ditioneitol (DTT).....	9
Figura 4 - Representação esquemática da formação de SAMs em suporte sólido, com posterior fusão de vesículas formando bicamadas lipídicas e imobilização de enzimas.....	11
Figura 5 - Esquema dos componentes básicos e do funcionamento de um biossensor.....	17
Figura 6 - Sequência de aminoácidos da peroxidase da raiz forte. Carb indica a cadeia de carboidratos ligada aos resíduos de aminoácidos.....	20
Figura 7 - Representação tridimensional da estrutura da HRP C determinada por cristalografia de raio-x (Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb , pdbID: 1H58).	21
Figura 8 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP C na presença de H ₂ O ₂ (agente oxidante). AH representa o substrato redutor e A [•] o radical formado.....	22
Figura 9 - Estrutura química da dopamina (3,4-dihidroxi-fenilamina).26	
Figura 10 - Estrutura química da hesperidina [3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-(6- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosídeo].....	28
Figura 11 - Estrutura química da diosmina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona 7-rutinosídeo).....	29

Figura 12 - Estrutura química do fosfolipídio dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (A) e modelo de um lipossoma de fosfolipídios (B).....	35
Figura 13 - Representação esquemática da reação de oxidação catalítica do guaiacol e H_2O_2 na presença da peroxidase.....	38
Figura 14 - Representação esquemática do potencial zeta.....	43
Figura 15 - Voltamograma cíclico onde i_p^a = corrente de pico anódica, i_p^c = corrente de pico catódica, E_p^a = potencial de pico anódico e E_p^c = potencial de pico catódico.	44
Figura 16 - Variação linear do potencial (ΔE) em função do tempo.....	45
Figura 17 - Forma de aplicação do potencial no SWV (A) e voltamograma esquemático de onda quadrada de um processo redox reversível (B).....	46
Figura 18 - Representação esquemática do sistema de microscopia de força atômica.....	47
Figura 19 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: modo contato (A), modo não-contato (B), e modo intermitente (C).....	48
Figura 20 - Imagens topográficas do AFM no modo contato da superfície de Au antes (A) e após o processo do “flame annealing” com os terraços monoatômicos formados (B).....	50
Figura 21 - Curvas de polarização catódica do Au (111) limpo (A) e do Au (111) imerso em uma solução de $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DTT por 30 minutos a 60°C (B).....	52
Figura 22 - Imagem topográfica do AFM no modo contato das bicamadas lipídicas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT (A) e perfil da linha de varredura (B) mostra a altura das camadas formadas em (A). Tamanho da imagem: $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$	53
Figura 23 - Imagem topográfica do AFM no modo contato da HRP imobilizada nas bicamadas lipídicas suportadas em ouro via SAMs de	

DTT (A) e perfil da linha de varredura (B) mostra a altura das camadas formadas em (A). Tamanho da imagem: 2,5 μm x 2,5 μm	54
Figura 24 - Efeito da quantidade de HRP na resposta voltamétrica do sistema HRP-bicamadas DMPC em solução tampão fosfato.....	55
Figura 25 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando como eletrodos de trabalho: (a) suporte de ouro puro; (b) bicamadas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT; (c) HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT.....	56
Figura 26 - Dependência do pH sobre a resposta analítica do sistema HRP-bicamadas de DMPC em peróxido de hidrogênio.....	57
Figura 27 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando como eletrodo de trabalho a HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT.....	58
Figura 28 - Curva analítica do eletrodo de trabalho contendo HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT para a determinação de dopamina.....	59
Figura 29 - Imagens topográficas do AFM no modo contato dos suportes sólidos utilizados: mica (A), silício hidrofílico (B), e silício hidrofóbico (C).....	61
Figura 30 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG depositadas em mica em uma faixa de varredura de 5 μm (A), 1,5 μm (B), e perfil da linha de varredura (C) da nanopartícula indicada em (B).....	62
Figura 31 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG depositadas em silício hidrofílico em uma faixa de varredura de 5 μm (A), 1,5 μm (B), e perfis da linha de varredura (C) e (D) das nanopartículas indicadas em (B).....	64
Figura 32 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG depositadas em silício hidrofóbico em uma faixa de varredura de 5 μm (A), 1,5 μm (B), e perfil da linha de varredura (C) da nanopartícula indicada em (B).....	66

Figura 33 - Estudo da influência de aditivos na atividade da peroxidase extraída do pinhão.....	70
Figura 34 - Representação esquemática da imobilização da peroxidase extraída do pinhão (per) nas nanopartículas de PU-PEG (A), e do processo enzimático com a dopamina na presença de peróxido de hidrogênio (B).....	73
Figura 35 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase; (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG	75
Figura 36 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto.....	76
Figura 37 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo peroxidase extraída do pinhão e imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.....	77
Figura 38 - Tempo de equilíbrio na adsorção de HRP nanopartículas de PU-PEG.....	81
Figura 39 - Isoterma de adsorção de Langmuir obtida para diferentes concentrações de HRP em nanopartículas de PU-PEG durante 4 horas.....	83
Figura 40 - Representação esquemática da interação eletrostática entre a HRP e as nanopartículas de PU-PEG.....	85
Figura 41 - Estabilidade no tempo de armazenamento da enzima livre (-■-) e imobilizada (-▲-).....	86
Figura 42 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo 0,45 mg mL ⁻¹ de HRP (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo 0,45 mg mL ⁻¹ de HRP imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG.....	88

Figura 43 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto	89
Figura 44 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.....	90
Figura 45 - Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada do biossensor proposto para a determinação de hesperidina em tampão fosfato pH 6,0 (A), e de diosmina em tampão acetato de sódio pH 5,0 (B).....	95
Figura 46 - Representação esquemática do processo enzimático entre a hesperidina (A) e diosmina (B) na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase.....	96
Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto.....	97
Figura 48 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de hesperidina.....	98
Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto.....	101
Figura 50 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de diosmina.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores comparativos de diâmetro e altura das nanopartículas de PU-PEG depositadas em diferentes suportes sólidos. Os dados apresentados foram gerados pela análise das imagens topográficas do AFM.....	67
Tabela 2 - Valores de atividade enzimática, proteína total e atividade específica obtidas de diferentes vegetais.....	69
Tabela 3 - Otimização das variáveis experimentais.....	74
Tabela 4 - Valores da recuperação da solução padrão de dopamina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.....	78
Tabela 5 - Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.....	79
Tabela 6 - Otimização das variáveis experimentais.....	87
Tabela 7 - Valores da recuperação da solução padrão de dopamina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.....	91
Tabela 8 - Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.....	91
Tabela 9 - Comparação das figuras de mérito usando os biossensores de pasta de carbono modificados com peroxidase do pinhão (A) e HRP purificada (B) imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG para a determinação da dopamina.....	93
Tabela 10 - Otimização das variáveis experimentais para a determinação de hesperidina e diosmina.....	94
Tabela 11 - Valores da recuperação da solução padrão de hesperidina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.....	99
Tabela 12 - Determinação de hesperidina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.....	99

Tabela 13 - Valores da recuperação da solução padrão de diosmina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.....103

Tabela 14 - Determinação de diosmina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.....103

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a	amplitude do pulso de potencial
A	atividade da enzima
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (microscopia de força atômica)
AH	substrato redutor
A^\bullet	radical formado
Au	ouro
$B_{\text{máx.}}$	capacidade de adsorção máxima
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
C	concentração de equilíbrio
CMC	carboximetilcelulose
CV	<i>cyclic voltammetry</i> (voltametria cíclica)
DDAB	didodecildimetilamônio
DLS	<i>dynamic light scattering</i> (espalhamento de luz dinâmico)
DMPC	dimiristoilfosfatidilcolina
DPPA	ácido dipalmitoilfosfatídico
DTT	ditiotreitol
$\Delta\text{Abs.}$	variação da absorvância
ΔE	variação linear de potencial
ΔE_s	incremento de varredura de potenciais
Δt	variação do tempo
[E]	concentração da espécie em equilíbrio com a fase fluida
ϵ	constante dielétrica
ζ	potencial zeta

E_p^a	potencial de pico anódico
E_p^c	potencial de pico catódico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HEPES	ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2'-etanossulfônico
His170	resíduo de histidina
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (peroxidase da raiz forte)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta resolução)
i_p^a	corrente de pico anódica
i_p^c	corrente de pico catódica
IPDI	diisocianato de isoforeno
K_1	constante de equilíbrio na forma não linear
K_L	constante de Langmuir
λ	comprimento de onda
LD	limite de detecção
L-DOPA	dihidroxiifenilalanina (precursor da dopamina)
m/m	massa por massa
$mg mL^{-1}$	miligrama por mililitro
$mol L^{-1}$	mol por litro
η	viscosidade
N	Newton
nm	nanômetros
PCP	policaprolactona
PEG	poli(etileno glicol)

pI	ponto isoelétrico
PMMA	poli(metacrilato de metila)
PS-b-PAA	poliestireno-b-poli(ácido acrílico)
PVC	policloroetano ou cloreto de polivinila
PVP	polivilpirrolidona
PU-PEG	poliuretano peguilladas
q	densidade de carga
R ⁺	radical protoporfirina
REH	reação de evolução de hidrogênio
R _g	raio de giro
rpm	rotações por minuto
RSD	<i>relative standard deviation</i> (desvio padrão relativo)
SAMs	<i>self-assembled monolayers</i> (monocamadas auto-organizadas)
Sub	substrato
SWV	<i>Square-wave voltammetry</i> (voltametria de onda quadrada)
θ	quantidade de espécie adsorvida na superfície do sólido
t	largura do pulso
T	período
TH	tirosina hidroxilase
Tween 80 [®]	monooleato de polioxietileno sorbitano
μ	mobilidade eletroforética
U	unidades de enzima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	4
2.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATERIAIS SUPORTES...4	
2.1.1 Bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos.....	6
2.1.1.1 Superfícies de ouro e SAMs.....	8
2.1.1.2 Enzimas imobilizadas em bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos	10
2.1.2 Nanopartículas.....	12
2.1.2.1 Estudos da interação entre enzima e nanopartículas.....	14
2.2 BIOSSENSORES.....	17
2.3 PEROXIDASE.....	19
2.3.1 Extrato de vegetais como fonte enzimática e utilização de aditivos para a preservação da enzima.....	24
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS.....	26
2.4.1 Dopamina	26
2.4.2 Flavonóides: Hesperidina e Diosmina.....	27
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS ENZIMA-NANOPARTÍCULAS E ENZIMA-BICAMADAS LIPÍDICAS.....	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL.....	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3.2.1 Sistema enzima-bicamadas lipídicas poliméricas.....	32
3.2.2 Sistema enzima-nanopartículas.....	32
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1 SISTEMA ENZIMA-BICAMADAS LIPÍDICAS.....	34

4.1.1	Preparação das monocamadas auto-organizadas de tióis.....	34
4.1.2	Preparação dos lipossomas.....	34
4.1.3	Preparação das bicamadas lipídicas.....	35
4.1.4	Imobilização da HRP nas bicamadas lipídias suportadas em ouro.....	35
4.2	SISTEMA ENZIMA-NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	36
4.2.1	Obtenção das nanopartículas de PU-PEG.....	36
4.2.2	Preparação dos suportes sólidos para as medidas no AFM.....	36
4.2.3	Preparação das amostras para as medidas no AFM.....	37
4.2.4	Extração da peroxidase de diferentes vegetais.....	37
4.2.5	Determinação da atividade enzimática e do teor de proteína.....	38
4.2.6	Influência de aditivos na atividade da peroxidase extraída de vegetais.....	39
4.2.7	Imobilização da peroxidase do homogenato nas nanopartículas de PU- PEG.....	39
4.2.8	Estudo da interação entre a HRP e as nanopartículas de PU-PEG.....	40
4.2.9	Preparação dos biossensores de pasta de carbono.....	40
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS ESTUDADOS.....	42
4.3.1	Experimentos espectrofotométricos.....	42
4.3.2	Medidas do potencial zeta das nanopartículas.....	42
4.3.3	Experimentos eletroquímicos.....	43
4.3.4	Experimentos com o AFM.....	46
4.3.5	Determinação dos compostos fenólicos empregando-se os sistemas proposto.....	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1	IMOBILIZAÇÃO DA HRP NAS BICAMADAS LIPÍDICAS SUPORTADAS EM OURO.....	50

5.1.1	Caracterização do suporte sólido de Au (111).....	50
5.1.2	Curva de desorção eletroquímica do DTT no suporte de Au (111).....	51
5.1.3	Caracterização do sistema enzima-bicamadas lipídicas por AFM.....	52
5.1.4	Estudos eletroquímicos do sistema HRP-bicamadas lipídicas: otimização e aplicação.....	54
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG POR AFM EM DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS.....	61
5.3	ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE EXTRAÍDA DE TECIDO VEGETAL EM NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG.....	69
5.3.1	Fonte de peroxidase, atividade catalítica e estabilidade.....	69
5.3.2	Imobilização da peroxidase extraída do pinhão em nanopartículas de PU-PEG.....	72
5.3.3	Otimização e estudo da eficiência do biossensor proposto.....	74
5.3.4	Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica.....	75
5.3.5	Estudo de recuperação e aplicação analítica.....	78
5.3.6	Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor proposto.....	79
5.4	ESTUDO DA INTERAÇÃO DA HRP EM NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG.....	81
5.4.1	Determinação do tempo de equilíbrio.....	81
5.4.2	Isoterma de adsorção.....	82
5.4.3	Estabilidade da HRP livre e adsorvida em nanopartículas de PU-PEG.....	86
5.4.4	Construção e otimização do biossensor de pasta de carbono modificado com HRP-nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.....	87
5.4.4.1	Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica.....	89
5.4.4.2	Estudo de recuperação e aplicação analítica.....	90
5.4.4.3	Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade.....	92

5.4.5 Otimização do biossensor de pasta de carbono modificado com HRP-nanopartículas de PU-PEG para a determinação dos flavonóides: hesperidina e diosmina.....	93
5.4.5.1 Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada dos flavonóides estudados.....	94
5.4.5.2 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica da hesperidina.....	97
5.4.5.3 Estudo de recuperação e aplicação analítica da hesperidina.....	98
5.4.5.4 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor na determinação da hesperidina.....	100
5.4.5.5 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica da diosmina.....	100
5.4.5.6 Estudo de recuperação e aplicação analítica da diosmina.....	102
5.4.5.7 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor na determinação da diosmina.....	103
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biomoléculas complexas com alta massa molar, constituídas por longas cadeias de aminoácidos interligados entre si por ligações peptídicas. O centro ativo é o local onde se processam as reações com o substrato, podendo ser constituído por apenas alguns resíduos de aminoácidos ou ainda conter um grupo não-protéico responsável pela eficiência catalítica da enzima (VOET & VOET, 1990; LEADLAY, 1993). Estas moléculas têm uma ampla aplicação nas áreas de química, bioquímica, biomedicina, farmacêutica e industrial. Exibem um número de características tais como: alto nível de eficiência catalítica, alta seletividade, baixa toxicidade e solubilidade em água (KRAJEWSKA, 2004). Entretanto, as enzimas na sua forma livre possuem um curto tempo de vida, o que limita a sua utilização biotecnológica.

É importante o estudo de métodos de imobilização de enzimas, pois podem melhorar a estabilidade e desta forma reduzir a quantidade de material requerido em muitos processos. Além disso, pode-se prolongar o tempo de vida e aumentar o potencial para reutilização das moléculas protéicas. No caso da utilização de enzimas na construção de biossensores, pode-se obter uma maior sensibilidade e estabilidade do dispositivo (KIM *et al.*, 2006).

A imobilização de enzimas em materiais suportes tem sido uma estratégia muito comum para a maioria das aplicações, pois é um método que mantém as moléculas protéicas confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção e proteção de suas atividades catalíticas (ROMAŠKEVIČ *et al.*, 2006). Os materiais utilizados para a imobilização devem ser preferencialmente de fácil obtenção e não-tóxicos. Além disso, devem fornecer uma ampla área superficial para as reações enzimáticas (LI & LIU., 2004).

A utilização de materiais nanoestruturados pode melhorar a eficiência na imobilização de enzimas. Partículas pequenas fornecem uma área superficial maior, levando a uma maior concentração de enzima imobilizada por unidade de massa de partículas. Portanto, nanopartículas poliméricas são uma alternativa ideal de materiais nanoestruturados para a imobilização de enzimas, podendo oferecer também uma limitação difusional mínima, no caso da aplicação em biossensores (KIM *et al.*, 2006).

Outra alternativa para a imobilização de enzimas é a utilização de bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos condutores, que

além de serem sistemas modelo para as membranas celulares, também podem ser utilizados como sistemas nanoestruturados na aplicação como biossensores. As bicamadas lipídicas contendo enzimas podem ser preparadas de forma relativamente rápida, com controle da composição lipídica da amostra (TAMM & MCCONNELL, 1985; FLORIN & GAUB, 1993; KIESSLING & TAMM, 2003).

A partir dessas informações, este trabalho de doutorado visou desenvolver diferentes estratégias de imobilização da peroxidase (enzima da classe das óxido-redutases) em materiais nanoestruturados como, bicamadas lipídicas suportadas em superfícies de ouro via monocamadas auto-organizadas e nanopartículas de poliuretano peguiladas (PU-PEG). As nanopartículas de PU-PEG são hidrofílicas devido as cadeias de poli(etilenoglicol) (PEG), oferecendo um ambiente favorável para a imobilização de proteínas, uma vez que um alto nível de hidratação na superfície do material suporte pode preservar a conformação da enzima quando adsorvida. Apesar de a peroxidase não ser propriamente uma proteína de membrana, acredita-se que utilizando as bicamadas lipídicas como suporte desta enzima, pode-se obter um sistema de nanoestruturas proteo-lipídicas organizadas e estáveis, uma vez que bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos via monocamadas auto-organizadas possuem alta estabilidade mecânica.

Os sistemas enzima-bicamadas lipídicas e enzima-nanopartículas poliméricas, foram caracterizados através da técnica de microscopia de força atômica (AFM do inglês “atomic force microscopy”), e otimizados pelas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica (CV do inglês “cyclic voltammetry”) e voltametria de onda-quadrada (SWV do inglês “square wave voltammetry”). Utilizando tais técnicas foi possível determinar compostos fenólicos em produtos farmacêuticos, visto que de forma geral, os métodos comumente empregados, como por exemplo, espectrofotometria e cromatografia líquida e gasosa, apresentam procedimentos laboriosos, além da utilização de solventes orgânicos e outros reagentes tóxicos. Adicionalmente, foi possível obter informações relacionadas à estabilidade da peroxidase imobilizada nos materiais nanoestruturados propostos neste trabalho.

O estudo da estabilidade da peroxidase em materiais nanoestruturados e a utilização destes sistemas na construção de biossensores para determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos certamente contribuirá como uma importante ferramenta na área da nanotecnologia. Além disso, os resultados obtidos neste

trabalho de doutorado poderão ser úteis no desenvolvimento de novos materiais nanoestruturados para fins tecnológicos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM MATERIAIS SUPORTES

A imobilização de enzimas em diferentes materiais tem despertado grande interesse nos últimos anos na indústria e na pesquisa científica. Estas moléculas podem ser imobilizadas em vários suportes, tais como: matrizes poliméricas (AHUJA *et al.*, 2007; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009), bicamadas lipídicas (MURGIDA & HILDEBRANDT, 2005), monocamadas auto-organizadas (SOLANKI *et al.*, 2008), filmes de Langmuir-Blodgett (SCHMIDT *et al.*, 2008), entre outros. Tais biomateriais possuem inúmeras aplicações nas áreas biotecnológica e biomédicas.

Várias metodologias podem ser aplicadas para imobilizar enzimas em diferentes materiais e estão baseadas em métodos químicos e físicos (ROMAŠKEVIČ *et al.*, 2006).

A imobilização química, em que são formadas ligações covalentes com as enzimas, inclui a retenção da enzima no material suporte por ligações covalentes e ligação covalente cruzada entre enzimas por substâncias multifuncionais (agentes reticulantes). A imobilização física está baseada nas interações fracas entre a enzima e o material suporte, como as forças atrativas de van der Waals, ligações de hidrogênio e iônicas. Este tipo de imobilização pode ser realizado pela oclusão da enzima em uma matriz polimérica, pela micro encapsulação em uma membrana sólida ou líquida, ou pela adsorção em uma matriz insolúvel em água (TISCHER & WEDEKIND, 1999).

Ambos os métodos químicos e físicos de imobilização oferecem algumas vantagens e desvantagens. Pelos métodos químicos, a perda da atividade catalítica pode ser observada com maior frequência, sendo dependente do tipo de suporte e reagentes utilizados. As ligações covalentes formadas como resultado deste tipo de imobilização podem perturbar a estrutura nativa da enzima, e ao mesmo tempo, fornecem uma forte e estável retenção da mesma no material suporte. Os métodos de imobilização física podem perturbar ou não a estrutura nativa da enzima, porém neste tipo de imobilização a proteína se liga ao material suporte por ligações de hidrogênio fracas e iônicas ou forças atrativas de van der Waals, podendo ser observado uma fácil dessorção da proteína do suporte (DURÁN *et al.*, 2002).

A retenção da enzima ao material suporte por ligações covalentes é um dos métodos mais utilizados (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). A ligação é realizada quimicamente por meio de grupos

funcionais do material biológico que não sejam essenciais à atividade catalítica, sendo necessário certo conhecimento de sua estrutura, com os grupamentos ativos do suporte, tais como $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$. Este método tem como vantagem a forte ligação da enzima com o suporte sólido, diminuindo o processo de desorção da proteína e apresentando maior estabilidade em relação aos efeitos de variação de pH, da força iônica e do solvente. Porém, esta forte interação pode limitar a flexibilidade molecular protéica e prejudicar a atividade enzimática (VAN DE VELDE *et al.*, 2002).

A imobilização da enzima via ligação covalente cruzada é livre do material suporte e baseia-se na formação de ligações covalentes entre as moléculas da proteína através da utilização de substâncias multifuncionais. Alguns reagentes reticulantes e ativadores incluem glutaraldeído, diazobenzidina, carbodiimida, ácido bisdiazobenzidínico e triclorotriazina. Este método de imobilização é atrativo devido a sua simplicidade, porém a toxicidade de tais reagentes é um fator limitante da aplicação desta metodologia para muitas enzimas.

O método da oclusão da enzima em uma matriz polimérica envolve o confinamento da mesma nos espaços formados em um polímero insolúvel. Não ocorre ligação covalente entre a enzima e o suporte, porém parte da atividade enzimática pode ser reduzida se a polimerização química for utilizada como método de imobilização (ROMASKEVIČ *et al.*, 2006).

O método da micro encapsulação baseia-se no confinamento da enzima em microcápsulas, em que a mesma não interage quimicamente com o material suporte, permanecendo praticamente recoberta pelo sistema (esferas). Normalmente, o tamanho do poro das microcápsulas varia de 1 a 100 nm, o qual é suficiente para prevenir o lixiviamento da enzima e permitir a diálise dos substratos da enzima através dos poros (BICKERSTAFF, 1997). Porém, para substratos com alta massa molar, o tamanho reduzido de poro pode ser uma desvantagem.

A adsorção física de enzimas em matrizes insolúveis em água é um dos métodos mais simples de imobilização, a qual está baseada na interação física entre a enzima e o suporte. As vantagens da adsorção física são sua simplicidade e a grande variedade de materiais suporte que podem ser usados para a adsorção. Para que a imobilização da enzima seja eficiente, o material suporte deve apresentar algumas características, tais como força mecânica, estabilidade química e física, capacidade de adsorção, caráter hidrofóbico/hidrofílico e viabilidade econômica (BLUM & COULET, 1991; BICKERSTAFF, 1997). Entretanto, com

modificações de pH, força iônica ou temperatura durante as medidas; pode ocorrer a dessorção da enzima do suporte.

2.1.1 Bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos

As bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos têm sido extensivamente utilizadas como sistemas modelo para membranas celulares desde 1985, iniciados por Tamm & McConnell. Também são amplamente utilizadas para o estudo da estrutura e dinâmica de membranas, interações lipídio-receptor e propriedades eletroquímicas de membranas (HAMMER & TIRRELL, 1996; HEYSE, 1998; TIEN & OTTOVA, 1998; WAGNER & TAMM, 2000). Várias tentativas também vêm sendo realizadas aplicando as bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos para a aplicação como biossensores (CORNELL *et al.*, 1997).

Bicamadas lipídicas, que imitam a estrutura básica de membranas naturais representam uma estrutura relativamente biocompatível para o desenvolvimento de novos tipos de sensores eletroquímicos (XU *et al.*, 2006). Comparado com outros materiais para imobilização de enzimas, as bicamadas lipídicas oferecem um ambiente natural para incorporação ou imobilização de biomoléculas. Além disso, a presença de bicamadas lipídicas pode reduzir o ruído de fundo (interferentes) e excluir efetivamente macromoléculas que poderiam bloquear a transferência de elétrons de enzimas e compostos hidrofílicos eletroativos de alcançar a superfície de detecção.

Existem vários métodos simples e rápidos para suportar as bicamadas lipídicas em superfícies sólidas; seja pela auto-organização no suporte sólido via fusão de vesícula (PIERRAT *et al.*, 1997; PROUX-DELROUYRE *et al.*, 2002), ou pela auto-organização de monocamadas (SAMs do inglês, “self-assembled monolayers”) de moléculas funcionais em suporte sólido e subsequente deposição das bicamadas lipídicas por evaporação de solvente ou fusão de vesícula (CULLISON *et al.*, 1994; PANDEY *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1996; KNOLL *et al.*, 2000). Bicamadas lipídicas podem ser suportadas em várias superfícies tais como: vidro, sílica, mica ou superfícies metálicas como platina ou ouro. As propriedades dinâmicas das bicamadas lipídicas suportadas dependem da grande variedade de métodos, como é demonstrado na Figura 1.

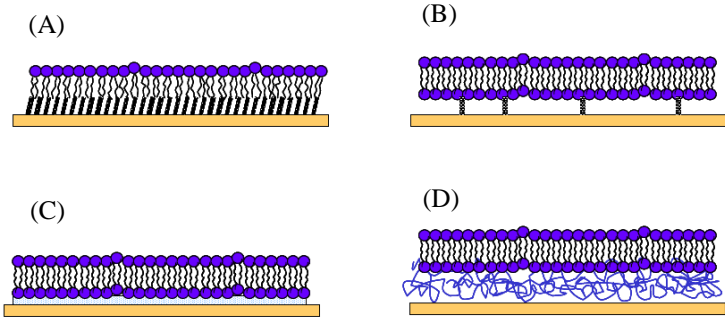


Figura 1 - Exemplos de métodos que podem ser utilizados para a imobilização de bicamadas lipídicas: a bicamada pode ser formada em SAMs de tióis ou silanos em suportes de ouro ou óxido de silício, respectivamente (A); imobilizada em moléculas espaçadoras (B); adsorvida diretamente no suporte sólido com um filme fino de água separando-os (C); imobilizada em uma matriz polimérica contendo cadeias hidrofóbicas (D).

A Figura 1 (A) representa filmes lipídicos com uma estrutura mais rígida e estável que podem ser construídos pela utilização de uma monocamada ligada covalentemente, tais como alcanotióis auto-organizados em superfícies de ouro, na qual uma segunda camada pode ser imobilizada. A Figura 1 (B) mostra a imobilização de bicamadas lipídicas ao suporte sólido por espaçadores hidrofílicos que estabilizam a membrana e aumentam o volume entre a bicamada e o suporte. Uma outra maneira é obter filmes lipídicos que são separados da superfície por uma camada ultrafina de uma camada de água (Figura 1 C) ou filmes poliméricos auto-organizados (Figura 1 D).

A interação entre o filme lipídico e o suporte sólido é reduzida quando a bicamada lipídica suportada está separada da superfície sólida. Isto permite que os lipídios difundam livremente na membrana e conseqüentemente mimetizem a natureza fluida das membranas biológicas. A maior vantagem das bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos via SAMs é a alta estabilidade mecânica. Estas membranas podem ser combinadas com todos os tipos de técnicas de superfícies e métodos eletroquímicos, desde que o suporte possua uma superfície condutora, tal como, metal ou polímero condutor.

2.1.1.1 Superfícies de ouro e SAMs

Para executar medidas eletroquímicas em bicamadas lipídicas imobilizadas em um suporte sólido condutor, é muito comum o uso de superfícies de metal nobre, e em particular, superfícies de ouro (Au), pois são inertes, possuem uma baixa corrente de fundo, uma rica superfície química e são apropriadas para uma série de aplicações. As superfícies de Au (111) são as mais comumente utilizadas para realizar estudos que implicam na modificação de superfícies mediante monocamadas. O Au (111) é obtido através de um processo chamado “flame annealing”, também conhecido como recozimento, em que a superfície do metal é submetida a uma chama de butano ou de hidrogênio por alguns minutos a uma temperatura de aproximadamente 650 °C. Para metais como o Au, que possuem um empacotamento cúbico de face centrada, o processo de “flame annealing” faz com que ocorra um rearranjo hexagonal de átomos na superfície, tornando-a lisa.

A modificação das superfícies de Au pelo uso de monocamadas auto-organizadas (SAMs) é realizada de forma que constituintes moleculares de uma solução ou de uma fase gasosa se adsorvam na superfície do suporte condutor. O adsorbato organiza-se espontaneamente na superfície do ouro em estruturas cristalinas (ou semicristalinas), formando SAMs que possuem um grupo funcional químico nas “cabeças”, com uma afinidade específica pela superfície do suporte e podendo também possuir grupos funcionais na “cauda” (LOVE *et al.*, 2005), conforme representado na Figura 2.

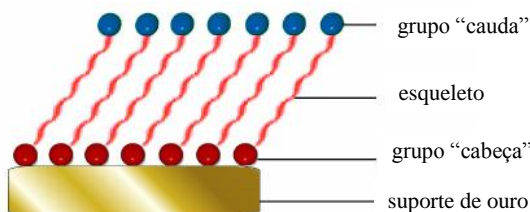


Figura 2 - Representação esquemática de uma monocamada auto-organizada (SAM).

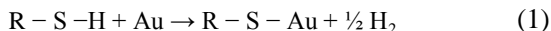
Devido à fácil preparação, baixo custo e ordem bem definida, as monocamadas auto-organizadas de tióis em superfícies de ouro são sistemas comumente utilizados (CHEN & LI, 2006). Monocamadas de tióis adsorvidas espontaneamente na superfície de suportes condutores,

baseadas na forte interação entre o metal e o enxofre são particularmente bem definidas para controlar e manipular a reatividade na interface. Estas monocamadas são comumente formadas pela imersão do suporte sólido condutor pré-tratado em soluções contendo concentrações milimolares de tióis. A formação de monocamadas organosulfuradas auto-organizadas tem atraído à atenção devido as suas aplicações tecnológicas (MANDLER & TURYAN, 1996; SAWAGUCHI *et al.*, 2001; PHONG *et al.*, 2005).

As SAMs de tióis sobre Au (111) possuem um arranjo estrutural básico conhecido como redes $\sqrt{3} \times \sqrt{3} - R 30^\circ$. Esta notação relaciona a célula unitária do suporte de Au (111) com a célula unitária da monocamada: a rotação indica que a distância tiol-tiol é $\sqrt{3}$ vezes maior que a distância Au – Au e a fila de moléculas de tiol está em um ângulo de 30° com respeito à direção dos primeiros átomos vizinhos de Au que se encontram na superfície inferior (MACDAIRMID *et al.*, 2003)

Os compostos alcanotiolados frequentemente estudados com diferentes características incluem: *n*-alcanotiol: (HS-(CH₂)_{*n*-1}-CH₃); α,ω -alcanoditiol: (HS-(CH₂)_{*n*}-SH); ω -mercaptoalcanol: (HS-(CH₂)_{*n*}-OH); ω -ácido carboxílico mercaptoalcano: (HS-(CH₂)_{*n*-1}-COOH); ω -aminoácido mercaptoalcano: (HS-(CH₂)_{*n*-1}-NH₂).

A quimiosorção de alcanotióis em suportes sólidos pode ser considerada formalmente como uma adição oxidativa da ligação entre S-H e a superfície de ouro, seguida de uma eliminação redutiva do hidrogênio. Quando se utiliza uma superfície de ouro limpa, o hidrogênio do grupo mercaptano se separa provavelmente como uma molécula de H₂ (Equação 1):



Deve-se observar que na reação proposta, a espécie que se quimiosorbe sobre Au é um alcanotiolato e que a principal força motriz é a ligação que se forma entre Au – S (FINKLEA, 1996).

O ditiotreitil (DTT) é um α,ω -alcanoditiol de quatro carbonos e com grupos hidroxilas no segundo e terceiro carbonos, como mostrado na Figura 3.

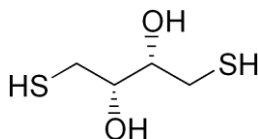


Figura 3 - Estrutura química do ditiotreitil (DTT).

MacDairmid e colaboradores (2003) observaram que o DTT adsorvido em superfícies de ouro forma monocamadas altamente desordenadas. Entretanto, esta aparente desvantagem em um sistema de monocamadas auto-organizadas pode ser de grande ajuda em estudos eletroquímicos, uma vez que as transferências de carga nas SAMs de DTT podem ocorrer através dos defeitos.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com o DTT por ser uma molécula tiolada pequena, de fácil manipulação e com resultados promissores. Creczynski-Pasa e colaboradores (2009) observaram que a molécula de DTT pode auto-organizar-se na superfície de Au (111) em configurações “em pé” ou “deitada” dependendo da concentração da solução e da temperatura. A superfície de ouro modificada com monocamada de DTT permite a formação de bicamada fluida de dimiristoilfosfolidilcolina (DMPC) obtidas pela fusão de vesículas como foi observado nas imagens *in-situ* de AFM. O sistema Au (111) - DTT - DMPC foi utilizado para testar eletroquimicamente o comportamento do transporte de azul de metileno e da flavina adenina dinucleotídeo através da membrana lipídica.

2.1.1.2 Enzimas imobilizadas em bicamadas lipídicas suportadas em materiais sólidos

A imobilização de enzimas em bicamadas lipídicas suportadas em material sólido é considerada um desafio no que se diz respeito à aplicação de biossensores (JANSHOFF & STEINEM, 2006), principalmente pelo fato de que nem todos os sistemas de bicamadas lipídicas são apropriados para imobilização de biomoléculas.

As bicamadas lipídicas suportadas em um material hidrofóbico não são apropriadas para a inserção de proteínas transmembranas na forma funcional ativa. Isto se deve à estrutura rígida e geralmente cristalina destas bicamadas, prejudicando a correta inserção e dobramento das partes intramembranares das proteínas. Além disso, este tipo de bicamada lipídica está diretamente suportada ao material sólido e, portanto, o dobramento apropriado das partes intramembranares das proteínas, é também prejudicado, levando a inatividade das mesmas.

As bicamadas lipídicas imobilizadas em um suporte sólido via SAMs atuam como bicamadas lipídicas com uma fase aquosa hidrofílica (espaçadores) separando-as do suporte, fazendo com que este sistema possua uma estabilidade mecânica maior. Por outro lado, os espaçadores previnem as bicamadas lipídicas de interagirem fortemente com o

suporte sólido, o que particularmente compromete as propriedades dinâmicas das moléculas de lipídio na bicamada, como por exemplo, a difusão lateral. Além disso, as SAMs também fornecem o espaço necessário para a imobilização de proteínas/enzimas, mantendo a mobilidade natural das mesmas (KNOLL *et al.*, 2008).

O processo da construção de bicamadas lipídicas em suporte sólido via monocamadas auto-organizadas e posterior imobilização da enzima está esquematicamente representado na Figura 4.

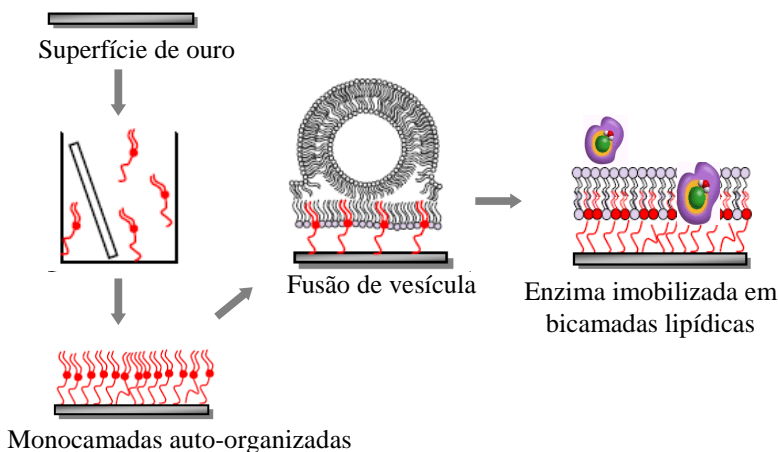


Figura 4 - Representação esquemática da formação de SAMs em suporte sólido, com posterior fusão de vesículas formando bicamadas lipídicas e imobilização de enzimas.

Primeiramente, as monocamadas de moléculas funcionalizadas, como por exemplo tióis, são formadas pela auto-organização das mesmas na superfície do suporte sólido. Posteriormente, com a fusão de vesículas ocorre a formação das bicamadas lipídicas, seguido da imobilização de qualquer estrutura funcional, tais como peptídeos ou enzimas.

Com esta abordagem, estudos fundamentais podem ser realizados, por exemplo: Naumann e colaboradores (1997) imobilizaram a F_0F_1 -ATPase em bicamadas lipídicas suportadas em um eletrodo de ouro via espaçadores peptídicos, pela fusão de um proteolipossoma com a ATPase inserida. Através da técnica de voltametria de onda quadrada foi possível determinar o número de prótons transportados para cada molécula de ATP sintetizada. Huang e colaboradores (2003)

imobilizaram a microperoxidase-11 em filmes lipídicos de didodecildimetilamônio (DDAB) e obtiveram um biocatalisador altamente ativo para a redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Liu e colaboradores (2006) investigaram a transferência de elétrons e a atividade catalítica da enzima peroxidase de raiz forte (HRP) incorporada em filmes de ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA) suportadas em eletrodos de grafite pirolítico. A enzima reteve o seu estado nativo nos filmes de DPPA e a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo foi aparentemente acelerada. Além disso, a HRP exibiu atividade catalítica na redução de oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO).

A imobilização da peroxidase tem mostrado ser uma opção interessante para sistemas modelos de enzimas imobilizadas em bicamadas lipídicas suportadas em material sólido. Existem poucos trabalhos na literatura que mostram a interação desta enzima com bicamadas lipídicas (LIU *et al.*, 2006; SCHIMDT *et al.*, 2008). Apesar de a peroxidase não ser propriamente uma proteína de membrana, pode-se obter nanoestruturas proteo-lipídicas organizadas que permitam uma manipulação precisa da molécula. A enzima pode ser imobilizada em uma camada lipídica altamente controlada em termos de composição, espessura e carga. Além disso, as bicamadas lipídicas que fornecem microambientes como as biomembranas são úteis para o estudo da química de proteínas redox, bem como para a aplicação em biossensores e catálise.

2.1.2 Nanopartículas

O uso de nanopartículas na imobilização de biomoléculas data do começo da década de 80 (REMBaum & DREYER, 1980). Desde então, nanopartículas inorgânicas (PHADTARE *et al.*, 2003) e poliméricas (JIA *et al.*, 2003) têm sido conjugadas com proteínas/enzimas.

Nanopartículas de óxidos metálicos foram usados com sucesso na imobilização de proteínas (ARMSTRONG & WILSON, 2000). A mioglobina e outras hemoproteínas foram adsorvidas em filmes de nanopartículas de óxidos de manganês (LVOV *et al.*, 2000; GAO *et al.*, 2002) e argilas (ZHOU *et al.*; 2002). Além disso, a habilidade de nanopartículas de óxido de titânio em interagir com biomoléculas encontra-se bem estabelecida. Li e colaboradores (2001) demonstraram que a adsorção de hemoproteínas (tal como citocromo c) em superfícies de óxido de titânio nano cristalino pode melhorar o processo de

transferência de elétrons entre as moléculas de proteínas e o eletrodo. Liu e colaboradores (2005) imobilizaram a HRP em um composto inorgânico/orgânico (nanopartículas de ZnO/quitosana) para construção de um biossensor sensível H_2O_2 . Estes autores obtiveram resultados satisfatórios pois o biossensor mostrou uma faixa de linearidade de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para H_2O_2 com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Nanopartículas poliméricas vêm sendo utilizadas como materiais suportes na adsorção de biomoléculas devido a grande área superficial e a facilidade na transferência de elétrons do material biológico para a superfície do eletrodo, no caso de aplicação como sensor. Materiais de poliuretano podem ser aplicados em áreas da bioquímica e biotecnologia, como suportes adequados para imobilização de enzimas. Poliuretanos podem ser utilizados nas seguintes formas: espumas, microesferas, microcápsulas, nanopartículas e membranas (ROMAŠKEVIČ *et al.*, 2006). Micro e nanopartículas de poliuretano podem ser amplamente utilizados na indústria, seja para o desenvolvimento de dispositivos biomédicos ou para sistemas de liberação de fármacos (ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2006). Muitas tentativas têm sido realizadas para construir biossensores com enzimas imobilizadas em materiais de poliuretano. Veselova & Shekhovtsova (2000) estudaram diferentes ésteres, éteres e suas misturas em espuma de poliuretano como suportes para imobilização da enzima HRP. Phadtare e colaboradores (2003) construíram um biossensor baseado na imobilização da pepsina em um conjugado nano de ouro e micropartículas de poliuretano. Budriene e colaboradores (2005) sintetizaram uma série de microesferas de poliuretano para imobilizar a maltogenase.

Zanetti-Ramos e colaboradores (2006) sintetizaram recentemente nanopartículas de poliuretano biodegradáveis baseadas em um monômero triol natural (óleo de castor) pela técnica da miniemulsão. Miniemulsões são definidas como dispersões aquosas estáveis de gotículas oleosas com tamanho variando entre 50 e 500 nm. Geralmente são preparadas pela alta agitação de um sistema contendo óleo, água, surfactante e um co-estabilizador (agente hidrofóbico) (SUDOL & EL-AASSER, 1997). Em algumas formulações foram adicionadas poli(etileno glicol) (PEG) como co-monômero para obter nanopartículas peguilladas e hidrofílicas. Apesar de estas nanopartículas terem sido desenvolvidas para aplicação em sistemas carreadores de fármacos, elas também são excelentes candidatas para imobilização de enzimas, pois

possuem propriedades físicas adequadas para este fim e biocompatibilidade.

2.1.2.1 Estudos da interação entre enzima e nanopartículas

A adsorção física tem sido usada com maior frequência para a imobilização de enzimas em materiais poliméricos. Na literatura existe um grande número de publicações com aplicações de enzimas imobilizadas por adsorção física (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; BAHAR & ÇELEBI, 1999; LI & LIU, 2004; LEI & BI, 2007; KOUTSOPOULOS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

Silva e colaboradores (2007) estudaram o comportamento da adsorção da HRP em partículas híbridas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) e carboximetilcelulose (CMC). As partículas híbridas de PMMA/CMC apresentam um centro com maior dureza e uma camada em volta da partícula altamente hidratada devido ao CMC. Os autores observaram que ocorreu a adsorção irreversível entre a peroxidase e as partículas de PMMA/CMC, e que a isoterma de adsorção mostrou um aumento inicial até atingir um plateau de adsorção. A imobilização da HRP não reduziu a atividade da enzima em comparação com a atividade da proteína livre.

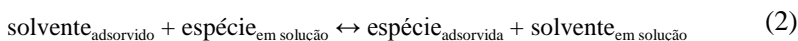
Em outro trabalho, partículas coloidais do copolímero bloco poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA) foram usadas para a imobilização da pectinase (LEI & BI, 2007). Os grupos carboxílicos na superfície das partículas aumentaram a estabilidade da pectinase imobilizada. Foi observado que altos níveis de hidratação na superfície do material suporte podem ter um importante papel na preservação da conformação da enzima quando adsorvida.

A adsorção de tripsina, uma enzima proteolítica, em superfícies de poliestireno e sílica foi investigada por Koutsopoulos e colaboradores (2007). A afinidade da tripsina pela superfície hidrofóbica do poliestireno foi maior do que pela superfície hidrofílica da sílica, porém as quantidades adsorvidas da enzima foram as mesmas para ambas as superfícies. A adsorção da tripsina na superfície do poliestireno foi quase irreversível e foi observado 20% de dessorção desta enzima da superfície da sílica.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do material suporte, da porosidade e tamanho dos poros. A eficiência da imobilização depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida no suporte

aumenta com o aumento da concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação. Este processo, em geral, é realizado à temperatura constante e isotermas de adsorção são obtidas, as quais podem seguir as equações de Langmuir ou Freundlich (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004).

A isoterma segundo a equação de Langmuir foi o primeiro modelo proposto e é a isoterma mais amplamente utilizada (ADAMNSON, 1990). Esta isoterma se ajusta a uma grande variedade de dados de adsorção. Foi inicialmente aplicada para adsorção de gases sobre sólidos, mas também é usada para descrever adsorções de soluções diluídas. A adsorção na interface sólido-líquido é, em geral, similar àquela que ocorre na interface sólido-gás. De acordo com Langmuir, um equilíbrio entre a espécie adsorvida e a espécie na solução é estabelecido (Equação 2), e a constante de equilíbrio pode ser representada pela Equação 3.



$$K = \frac{[\text{espécie}_{\text{ads.}}] \times [\text{solvente}_{\text{solução}}]}{[\text{solvente}_{\text{ads.}}] \times [\text{espécie}_{\text{solução}}]} \quad (3)$$

Assumindo ser a solução ideal, a concentração do solvente constante e que as moléculas da espécie em solução ocupem um único sítio sobre a superfície, e não estejam dissociadas, a forma final da equação de Langmuir em termos total de superfície ocupada é dada pela Equação 4.

$$\theta = \frac{K_L C}{1 + K_L C} \quad (4)$$

Sendo K_L a constante de equilíbrio e C , a concentração de equilíbrio da espécie. O símbolo θ é a fração da superfície ocupada, expressa pela razão entre o número dos sítios de adsorção ocupados e o número de sítios de adsorção disponíveis. Experimentalmente, θ é definido pela Equação 5 como:

$$\theta = \frac{Y}{B_{\text{máx.}}} \quad (5)$$

Em que Y é a quantidade da espécie adsorvida da solução na superfície do sólido, expresso em μg da espécie por mg de material sólido; $B_{\text{máx.}}$ é a máxima quantidade da espécie que pode ser adsorvida na superfície do sólido, expresso em μg de soluto por mg de material sólido.

Os parâmetros da isoterma de Langmuir ($B_{\text{máx.}}$ e K_L) são normalmente estimados transformando a Equação 4 na sua forma linear. Porém, tais parâmetros também podem ser estimados utilizando a forma não linear da isoterma de Langmuir, representada pela Equação 6, e podem ser obtidos através da análise dos dados pelo programa Origin 8.0.

$$Y = \frac{B_{\text{máx.}} [E]}{K_1 + [E]} \quad (6)$$

Na Equação 6, Y e $B_{\text{máx.}}$ são os mesmos parâmetros citados anteriormente; $[E]$ é a concentração da espécie em equilíbrio com a fase fluida; K_1 é a constante de equilíbrio de adsorção, que é a medida da afinidade da espécie em solução pela superfície de uma determinada fase. A constante de Langmuir (K_L) é inversamente proporcional à constante de equilíbrio da equação na forma não linear (K_1).

O modelo da isoterma de Langmuir assume que a energia livre de adsorção é constante e prevê a adsorção em monocamada para superfícies contendo número finito de sítios de adsorção, assumindo que as moléculas da espécie em solução somente interagem com sítios de adsorção. O significado destas suposições é que o máximo de adsorção ocorre para uma monocamada saturada de moléculas da espécie em solução sobre a superfície do adsorvente (ADAMNSON, 1990). Para baixas concentrações a superfície coberta é proporcional a concentração da espécie, e para o caso de altas concentrações a superfície coberta tende a um valor máximo que corresponde à superfície máxima coberta com uma monocamada, e considera a constante K_L como uma medida da ligação da espécie na superfície. Além do modelo de Langmuir, podem ser utilizados outros modelos de adsorção, como por exemplo, isoterma de Temkin; isoterma de Freundlich; entre outras. Porém, devido à dificuldade de se obter dados experimentais para sistemas multicomponentes, muitas vezes estes são estimados a partir de isotermas monocomponentes. Por isso, o modelo de Langmuir têm sido aplicado amplamente por sua simplicidade e pelo fato de sua equação se ajustar aos dados experimentais de muitos sistemas.

2.2 BIOSSENSORES

Os biossensores são definidos geralmente como dispositivos analíticos os quais convertem uma resposta biológica em um sinal confiável e processável (LOWE, 1984). A Figura 5 mostra na forma de um esquema simplificado, o funcionamento de um biossensor (ARYA *et al.*, 2008).

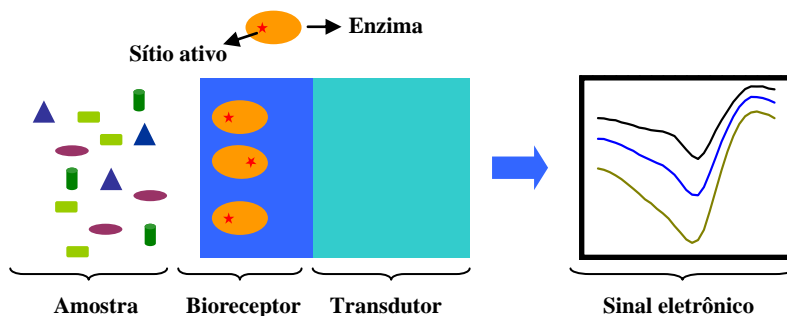


Figura 5 - Esquema dos componentes básicos e do funcionamento de um biossensor.

Os componentes de um biossensor estão conectados em série e compreendem um sistema de reconhecimento molecular (bioreceptor) e um transdutor físico-químico. As etapas de funcionamento do biossensor estão baseadas na interação específica do analito da amostra com o material biológico (bioreceptor) imobilizado na superfície do sensor ou ainda incorporado ao transdutor. Posteriormente, ocorre a detecção, por parte do transdutor, devido à variação de alguma propriedade física ou química do sistema, provocada pela reação de reconhecimento seletivo e finalmente o processamento do sinal e obtenção dos resultados (FATIBELLO-FILHO & CAPELATO, 1992).

Para alcançar alta sensibilidade e seletividade para um determinado biossensor, é importante a total funcionalidade da biomolécula após a sua imobilização na superfície do sensor. As biomoléculas comumente utilizadas em biossensores são enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, células e receptores. Um número de condições deve ser seguido para a construção de um biossensor, entre as quais, a biomolécula deve ser altamente específica para a análise em questão, ser estável em condições normais de estocagem e mostrar baixa variação nas medições. A resposta do biossensor deve ser precisa,

reprodutível, linear sob a faixa de concentração do substrato de interesse e deve ser livre de ruídos elétricos. Além disso, o dispositivo deve ser de baixo custo e de fácil construção, ter resposta rápida, potencial para miniaturização, potencial de automação e construção de equipamentos simples e portáteis (GRIESHABER *et al.*, 2008).

O desempenho dos biossensores depende dos materiais empregados na elaboração. Depende também das características físico-químicas do material empregado para a construção do transdutor e dos materiais nanoestruturados usados para a imobilização de enzimas, de estabilizadores e mediadores (SOTIROPOULOU *et al.*, 2003).

A seleção do transdutor depende de qual mudança físico-química é gerada na camada do sensor por uma reação específica. Os biossensores podem ser classificados em quatro grupos básicos de acordo com o tipo de transdutor utilizado: eletroquímico, ótico, piezoelétrico e termométrico.

As biomoléculas e a superfície dos transdutores podem ser combinadas em um número diferente de configurações. Os biossensores mais comuns, e comercialmente disponíveis, são aqueles baseados em enzimas redox e detecção eletroquímica: um exemplo é o sensor de glicose. Reações catalíticas são as mais utilizadas para medidas contínuas, uma vez que problemas com reações irreversíveis podem ser evitados. Os biossensores baseados em enzimas tendem a ser mais sensitivos pois a enzima é capaz de catalisar um grande número de analitos e com isso amplificar o sinal do sensor. Além disso, os biossensores podem ser aplicados em uma vasta variedade de amostras incluindo fluidos humanos, amostras de alimentos, produtos farmacêuticos, culturas de células e amostras ambientais.

Uma das limitações que impedem o uso de biossensores desenvolvidos manualmente em larga escala é a baixa reprodutibilidade de sensor-a-sensor. Um dos fatores que contribuem para este problema é a dificuldade de controlar precisamente o transdutor e outros materiais usados na construção de biossensores. Os transdutores eletroquímicos mais comumente empregados são metais inertes como platina ou ouro (KHAN & WERNET, 1997) ou materiais carbonáceos (GORTON, 1995).

A ampla utilização de eletrodos de pasta de carbono como matriz suporte para a construção de biossensores é atribuída à sua versatilidade, baixo custo, modificação conveniente e facilidade de renovação da superfície, ampla faixa de potencial de trabalho, facilidade de construção e possibilidade da modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com os eletrodos

convencionais, em que a modificação ocorre apenas na superfície (KALCHER *et al.*, 1995).

O eletrodo de pasta de carbono proposto por Adams, em 1958, é uma composição de pó de grafite e de um aglutinante imiscível em solução aquosa. O pó de grafite deve possuir tamanho uniforme, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas. O aglutinante é geralmente um líquido orgânico quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas e eletroinativo.

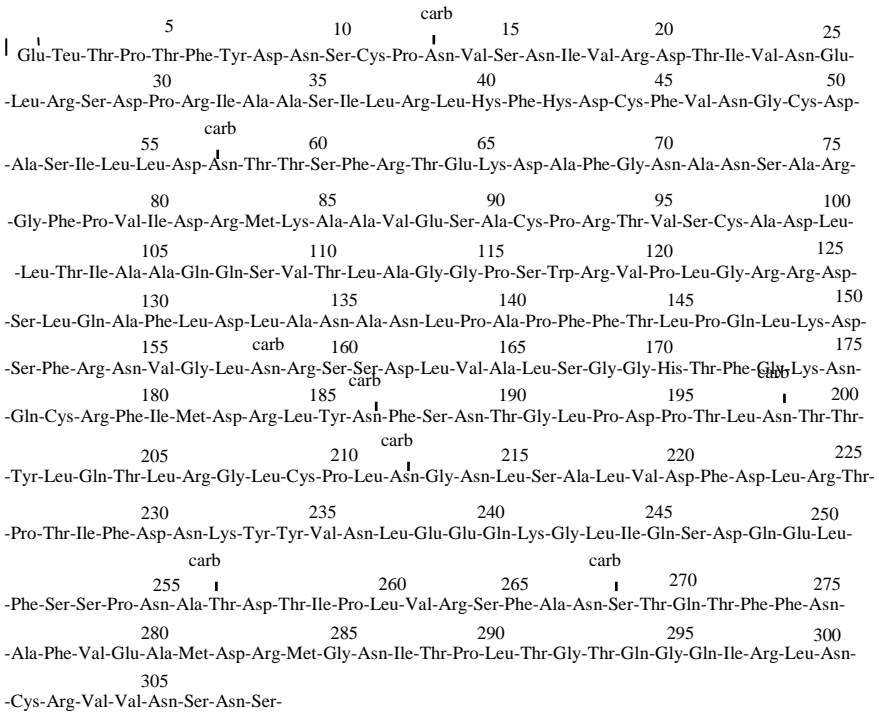
Pereira e Kubota (2004) aperfeiçoaram um eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em sílica modificada com óxido de nióbio, em que um planejamento fatorial foi aplicado para averiguar e otimizar a preparação do eletrodo. Foi possível concluir que a proporção utilizada dos componentes do eletrodo de pasta de carbono é estatisticamente significativo e a melhor proporção foi definida como 60/40 (% m/m) de modificador/pó grafite e posterior adição do aglutinante (óleo mineral). Porém, Oliveira e Vieira (2006) estudaram diferentes proporções dos componentes do eletrodo de pasta de carbono e a melhor resposta do biossensor foi obtida na composição de 75/15/10 % (m/m) de grafite/óleo mineral/enzima.

2.3 PEROXIDASE

A peroxidase é uma enzima da classe das óxido redutases, que se encontra extensivamente distribuída no reino animal e vegetal, e é caracterizada pela presença do grupo prostético heme no seu sítio ativo (Fe^{3+} protoporfirínico), o qual é oxidado na presença de peróxido de hidrogênio levando à produção de cátions radicais π . Estes, por sua vez, podem oxidar uma série de substratos, dentre eles compostos fenólicos.

A peroxidase da raiz forte (HRP, do inglês “horseradish peroxidase”) tem sido a enzima mais utilizada em diferentes processos, devido principalmente a sua alta estabilidade por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH; e estar disponível comercialmente em diferentes graus de pureza. A HRP é uma glicoproteína globular, sendo conhecidas várias isoenzimas. A isoenzima C (HRP C) é a mais abundante delas (VEITCH, 2004). Esta isoenzima é constituída de 308 resíduos de aminoácidos (Figura 6), um grupo prostético heme, dois íons cálcio e oito cadeias laterais neutras de carboidratos que se ligam à enzima através dos resíduos de asparagina (WELINDER, 1976). Apresenta massa molar entre $40.000 \text{ g mol}^{-1}$ e

45.000 g mol⁻¹, sendo que a cadeia polipeptídica corresponde a 33.890 g mol⁻¹ e a porção de carboidratos constitui entre 18 e 22% do total.



Pontes di-sulfeto: 11-91; 44-49; 97-301; 177-209

Figura 6 - Sequência de aminoácidos da peroxidase da raiz forte. Carb indica a cadeia de carboidratos ligada aos resíduos de aminoácidos.

A estrutura da HRP C (Figura 7A) possui dois domínios similares e bem definidos. Cada domínio contém um íon cálcio que garante a estabilidade estrutural e controla diretamente a atividade enzimática. Ambos os domínios fornecem um ambiente hidrofóbico onde o grupo heme se localiza, sendo que um resíduo de histidina (His170) ocupa a posição da 5ª coordenação do átomo de ferro (Figura 7B).

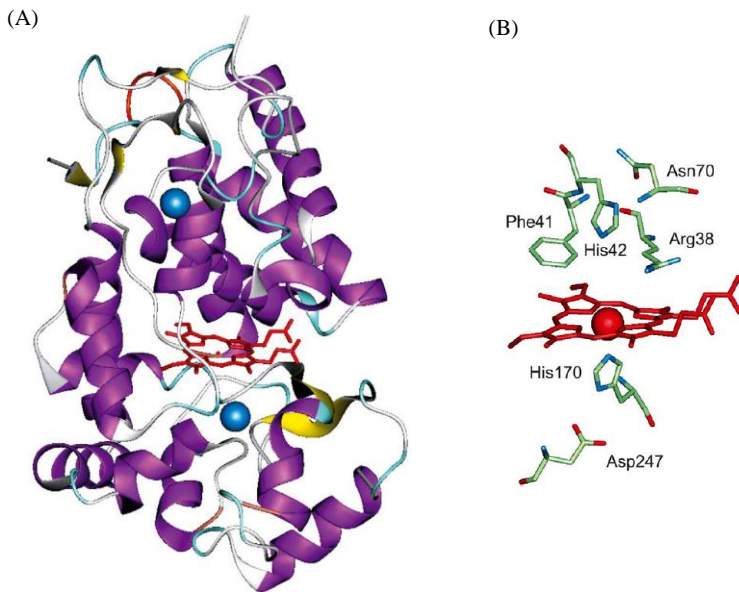


Figura 7 - Representação tridimensional da estrutura da HRP C determinada por cristalografia de raio-x (Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb, pdbID: 1H58). O grupo prostético heme (em vermelho) está localizado entre os domínios distal e proximal, cada um contendo um íon Ca^{2+} (em azul). As regiões de α -hélice e folha β da enzima são mostradas em violeta e amarelo, respectivamente (A); o resíduo His170, da histidina proximal, é coordenado ao átomo de ferro enquanto o sítio de coordenação distal acima do grupo heme fica vazio (B).

Esta situação é muito similar àquela encontrada nas estruturas da hemoglobina e da mioglobina, tal que a histidina é chamada proximal e o domínio da enzima próximo a este ligante é denominado domínio proximal. O outro domínio é análogo e nomeado domínio distal, contendo uma histidina não coordenada (His42), a qual é identificada como histidina distal. A HRP apresenta ponto isoelétrico (pI) de 7,2 (CUI *et al.*, 2001) e pH ótimo entre 6,0 e 6,5 (CHATTOPADHYAY & MAZUMDAR, 2000). Estudos anteriores comprovaram que a perda de íons cálcio se reflete diretamente a estrutura da HRP C, ocasionando aumento no valor do raio de giro ($R_g = 26,545 \text{ \AA}$) da enzima. Este pode variar para $R_g = 26,583 \text{ \AA}$ na presença de íon Ca^{2+} distal apenas. Quando apenas o íon Ca^{2+} proximal constitui a estrutura da HRP observa-se $R_g = 26,567 \text{ \AA}$ e a ausência de ambos em $R_g = 26,477 \text{ \AA}$ (LABERGE *et al.*, 2003). Estas evidências suportam a perda da atividade catalítica e

confirmam que os íons cálcio são indispensáveis para manter a não-planaridade funcional da ponte heme. Ainda, a enzima se torna inativa na presença de cianeto, sulfeto e fluoreto, uma vez que estes substratos podem se ligar irreversivelmente no sítio catalítico.

O mecanismo geral de catálise da HRP C ocorre em três etapas distintas (Figura 8). Na primeira etapa, ocorre a redução do peróxido de hidrogênio (agente oxidante) pela enzima. Um dos oxigênios do H_2O_2 deixa a molécula em forma de água enquanto o outro fica retido no grupo heme da enzima, o qual contém Fe^{3+} , que é oxidado formando um composto intermediário (composto I). Na ausência de doadores fortes de elétrons o composto I pode abstrair um elétron do substrato (substância orgânica) e se transformar no composto II, que por sua vez aceita um elétron de outra molécula de substrato e retorna à forma nativa da enzima (RUZGAS *et al.*, 1996). Nesta etapa, a perda de um elétron do substrato geralmente é acompanhada pela perda de um próton, determinando a formação de um radical. A alta reatividade e a baixa seletividade comumente associada aos radicais orgânicos tornam a química dos produtos originários de peroxidases muito complicada.

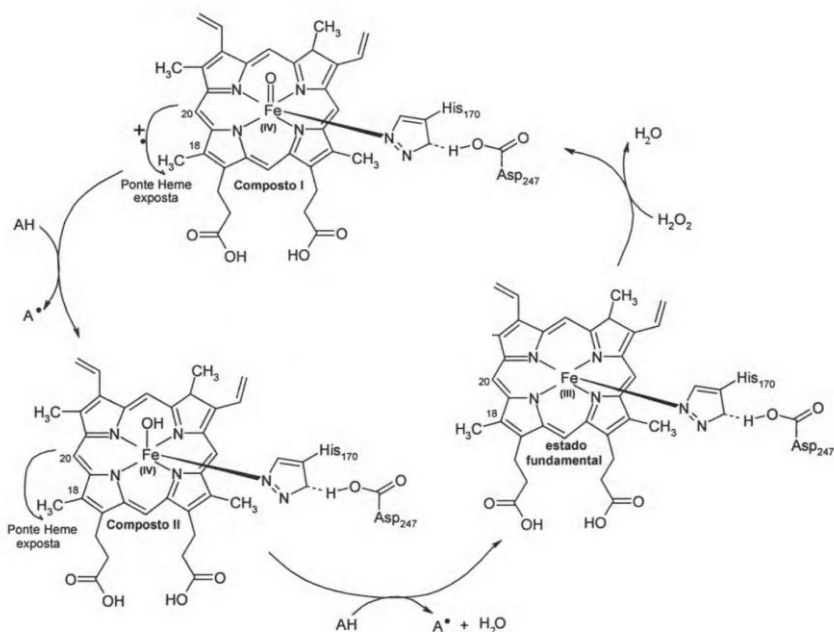


Figura 8 - Mecanismo geral do ciclo catalítico da HRP C na presença de H_2O_2 (agente oxidante). AH representa o substrato redutor e A^\bullet o radical formado.

Os substratos que reduzem os compostos I e II são chamados “substratos redutores” e a interação destes com o sítio ativo acontece através da posição delta da ponte heme. Não somente o peróxido de hidrogênio, como também muitos compostos contendo ligações peroxo podem gerar o composto I (HRP-I); os perácidos, por exemplo, reagem mais rápido que o peróxido de hidrogênio. A redução do composto II é geralmente a etapa determinante da velocidade da reação. O excesso de H_2O_2 pode inibir o ciclo catalítico normal, assim o composto II passa à forma de composto III, que por perda de oxigênio pode chegar ao composto IV, o qual pode reagir com H_2O_2 e retornar à forma de composto II. Este caminho, além de possuir uma velocidade de reação muito inferior, ainda apresenta um agravante que é a possibilidade de o composto III passar a uma forma inativa irreversível, ocasionando a perda total da atividade enzimática.

Como em outras peroxidases, somente a posição delta da ponte heme (C_{20} e o grupo metil ligado ao C_{18} , veja Figura 8) é exposta para ligantes volumosos, sendo que moléculas com tamanho comparável ao peróxido de hidrogênio obviamente têm acesso à posição de coordenação 6 no Fe. Este sítio ligante é circundado de resíduos hidrofóbicos, os quais impedem o acesso do substrato ao grupo ferril. Esta é a razão pela qual quase todas as reações catalisadas pela HRP são reações de transferência de elétrons ao invés de reações de transferência de oxigênio, como acontece na peroxidase 450 (P450) e na cloroperoxidase.

Dois mecanismos têm sido propostos para a redução do composto I pelo substrato: a abstração do átomo de hidrogênio é feita pelo grupo ferril (o elétron fica no grupo porfirina e o próton vai para a histidina distal) ou ocorre a transferência direta de elétron do substrato para a ponte heme.

Os estudos cinéticos sobre o mecanismo da HRP tornam-se uma questão particularmente difícil por três razões: (i) a oxidação de substratos geralmente produz radicais altamente reativos e não seletivos, os quais subsequentemente se submetem a polimerizações (ou formações de oligômeros) sem controle, com estequiometria imperfeita; (ii) a maioria dos substratos não consegue saturar a enzima devido à solubilidade limitada em água; (iii) as velocidades de reação são muito rápidas para que determinações precisas sejam feitas (DUNFORD, 1999).

O mecanismo da HRP envolvendo reduções de um elétron do composto II traz a enzima de volta ao estado fundamental. Deve-se, contudo, notar que alguns substratos são oxidados em uma única etapa

envolvendo dois elétrons, dentre eles estão o guaiacol, tiocianato e tioanisol. Há também alguns poucos casos que a HRP atua como peroxigenase, transferindo um átomo de oxigênio do peróxido para o substrato (tioanisol e alguns derivados de hidroxilaminas).

Entretanto, quando a peroxidase está imobilizada na superfície de um material suporte, os intermediários oxidados da enzima, composto I e composto II, podem ser reduzidos de volta ao seu estado nativo por dois caminhos: uma transferência de elétrons direta ou mediada. Na transferência de elétrons direta as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo, principalmente se este for grafite. Já na transferência mediada de elétrons, a enzima recebe elétrons de substâncias doadoras (substratos redutores), como por exemplo, fenóis, aminas aromáticas, ferrocenos (ROSATTO *et al.*, 2001). Na presença de uma substância doadora de elétrons a enzima é regenerada e as espécies radicalares formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução proporcional à concentração da substância doadora.

Já foi demonstrado que uma alta concentração de peróxido pode levar a uma forma inativa da peroxidase (ROSATTO *et al.*, 2001). Deste modo, os fenóis podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas (REGALADO *et al.*, 2004; CASTILHO *et al.*, 2005).

2.3.1 Extrato de vegetais como fonte enzimática e utilização de aditivos para a preservação da enzima

A fonte comercial mais utilizada de peroxidase é a HRP, que é geralmente cultivada e colhida em países de clima frio. Assim, novas fontes de peroxidase precisam ser obtidas, para atender a crescente demanda desta enzima. O uso de homogenato de vegetais, como fonte de enzimas para construção de biossensores, tem-se tornado frequente devido à simplicidade e à facilidade de obtenção da enzima. Além disso, são extremamente econômicos e geralmente possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que estas enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos (habitat natural) são mais estáveis e geralmente possuem os cofatores disponíveis (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002).

Entretanto, o homogenato de vegetais pode apresentar em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico devido à presença de uma multiplicidade de enzimas. Ainda, tecidos

vegetais tendem ao escurecimento na presença de oxigênio molecular devido às reações entre a enzima e os substratos naturais presentes nesses tecidos, e com isso, pode ocorrer uma diminuição da atividade enzimática de extratos vegetais em função do tempo. Com o objetivo de minimizar esses efeitos, diversas substâncias protetoras e/ou estabilizadoras podem ser utilizadas para separar compostos fenólicos naturais de diversos extratos enzimáticos. Os aditivos têm sido utilizados para proteção da inativação da enzima, retenção da camada de água ao redor do biocatalisador e como dispersantes das moléculas da enzima e facilitadores de transporte de massa. O polímero polivinilpirrolidona (PVP), por exemplo, é capaz de remover compostos fenólicos naturais de soluções devido à sua baixa solubilidade e à sua capacidade de formar pontes de hidrogênio entre os substratos naturais e o polímero. Outras substâncias e polímeros também têm sido usados para remoção dos compostos fenólicos durante a obtenção dos extratos brutos como resinas de troca iônica, policaprolactona (PCP), polietileno glicol (PEG) (VIEIRA *et al.*, 2003); e osmólitos como glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol (FERREIRA *et al.*, 2004)

Diferentes extratos de vegetais com ou sem a adição de aditivos e/ou estabilizantes têm sido investigados e utilizados na construção de biossensores.

O primeiro trabalho analítico usando extrato de tecidos vegetais foi desenvolvido por Uchiyama e colaboradores, publicado em 1988. Neste trabalho foi utilizado extrato de pepino (fonte da enzima *ascorbato oxidase*) em um sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de ácido ascórbico.

Em 1994, Signori e Fatibello-Filho desenvolveram o primeiro biossensor amperométrico utilizando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrôhiza*) como fonte enzimática da polifenol oxidase. A enzima foi imobilizada com glutaraldeído em uma membrana de acetato de celulose e afixada em um eletrodo de oxigênio e posteriormente otimizado e empregado na determinação de compostos fenólicos em águas residuárias industriais. O biossensor apresentou uma resposta linear para pirogalol, catecol, fenol e p-cresol nas faixas de concentrações de $2,5 \times 10^{-5}$ a $8,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; $1,0 \times 10^{-5}$ a $8,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹; $1,0 \times 10^{-5}$ a $9,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, respectivamente. O biossensor foi estável durante duas semanas com aproximadamente 300 determinações por membrana.

Bassi e McGrath (1999) prepararam um biossensor baseado em extrato da casca da semente de soja contendo peroxidase, que demonstrou resultados promissores na determinação de fenol. Sobre a

superfície de um eletrodo de pasta de carbono quimicamente modificado construído combinando-se dimetilferroceno, grafite em pó e óleo mineral, foi feita a deposição do extrato contendo a enzima através de ligação cruzada com glutaraldeído.

Recentemente, Oliveira e colaboradores (2006) utilizaram o homogenato de jiló (*Solanum gilo*) como fonte da enzima peroxidase. A enzima foi imobilizada em matriz de quitosana previamente reticulada com epicloriglutaraldeído e incorporada à pasta de carbono.

2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS

Os compostos fenólicos podem atuar como doadores de elétrons na reação da peroxidase com peróxidos, sendo este o princípio da utilização de eletrodos modificados com peroxidase para a detecção de espécies fenólicas como monofenóis, difenóis, polifenóis, entre outros (ROSATTO *et al.*, 2001). Procedimentos enzimáticos para a quantificação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos são de grande interesse principalmente porque permitem o monitoramento de parâmetros de qualidade, garantindo a segurança e a eficácia das formulações.

Neste trabalho, o sistema enzima-bicamadas lipídicas foi utilizado como um modelo de sensor na determinação de dopamina padrão e o sistema peroxidase imobilizada em nanopartículas poliméricas foi empregado como eletrodo modificado na determinação de compostos fenólicos como dopamina, hesperidina e diosmina em produtos farmacêuticos.

2.4.1 Dopamina

A dopamina é um difenol e neurotransmissor central, precursor metabólico da noradrenalina e da adrenalina, que atua em receptores específicos, presentes no sistema nervoso central, nos vasos mesentéricos, renais e nas coronárias (Figura 9).

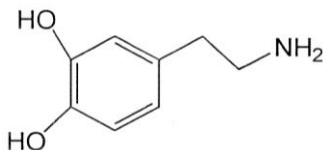


Figura 9 - Estrutura química da dopamina (3,4-dihidroxifenetilamina).

É sintetizada no cérebro através da ativação da enzima tirosina hidroxilase (TH) que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, que por sua vez é descarboxilado para formar a dopamina. Assim, a taxa de síntese de dopamina é modulada pela atividade da TH e pode ser atenuada pela ativação dos auto-receptores, ou seja, dos receptores localizados na célula pré-sináptica. A dopamina possui um importante papel nas funções cerebrais e extremas anomalias em suas concentrações são sintomas de doenças como o mal de Parkinson (HORNYKIEWICZ, 2006). Além disso, este difenol é também utilizado para o tratamento de diversos tipos de choque e da hipotensão grave após infarto agudo do miocárdio, dilatando os vasos sanguíneos renais e aumentando dessa forma o fluxo de sangue. No Brasil, a dopamina é comercializada em forma de ampolas de 5 mg mL⁻¹, como exemplo, o medicamento Revivan[®].

Enquanto nos anos 60 e 70 a maior preocupação era estabelecer um papel independente à dopamina e determinar suas funções comportamentais e fisiológicas, os anos 80 foram destinados ao conhecimento dos receptores de dopamina e suas funções específicas nas diferentes vias cerebrais dentro de um complexo crescente sistema de interação neuronal.

Dada a importância dos níveis de dopamina no sistema nervoso central, o desenvolvimento de um método simples e rápido para a sua determinação tem apresentado um grande interesse nos últimos anos. Vários métodos, incluindo quimiluminescência (HUANG *et al.*, 1998), espectrofotometria (LUPETTI *et al.*, 2003), cromatografia líquida e gasosa (YOSHITAKE *et al.*, 2004), podem ser encontrados na literatura para determinação de dopamina em fluidos biológicos e produtos farmacêuticos. Entretanto, estes métodos possuem algumas desvantagens, incluindo a necessidade do pré-tratamento da amostra, longo período da análise e altos custos. Portanto, é importante o desenvolvimento de um método rápido, de baixo custo, seletivo e sensível para a determinação de dopamina (ALPAT *et al.*, 2005). As técnicas eletroquímicas caracterizam-se como mais vantajosas para a determinação de dopamina (CARUSO *et al.*, 1999; MA & SUN, 2007).

2.4.2 Flavonóides: Hesperidina e Diosmina

A hesperidina é um produto natural encontrado em abundância no mesocarpo (porção branca) dos limões e das laranjas verdes. É um membro do grupo flavanona dos flavonóides, cuja estrutura glicosídeo-flavonoídica está representada na Figura 10. A hesperidina é conhecida

também como vitamina P ou citrina e possui uma ampla faixa de atividade fisiológica como anti-inflamatório, antitumoral, antibacteriana e inibidora da xantina oxidase (GARG *et al.*, 2001). Tem sido demonstrado também que a hesperidina é um efetivo antioxidante (CHEN *et al.*; 2002). Além disso, possui atividade reguladora sobre a permeabilidade capilar, sendo normalmente empregada em hemorragias e púrpuras vasculares. Esta molécula está presente em medicamentos venotônicos e vasculoprotetores.

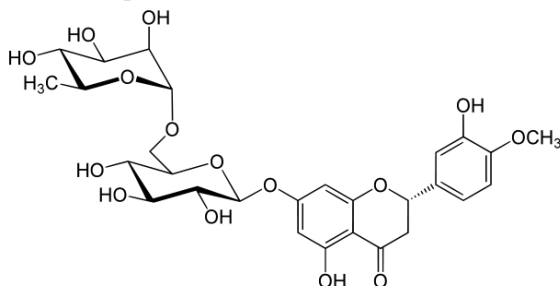


Figura 10 - Estrutura química da hesperidina [3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavanona-7-(6- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosídeo].

Já a diosmina é uma flavona glicosídica (Figura 11), cuja hesperidina é a sua análoga flavanona e é um constituinte comum de muitas espécies cítricas (KANAZE *et al.*, 2003). Assim como a hesperidina, a diosmina possui atividade antioxidante e anticarcinogênica e, reduz os lipídeos no sangue. Além disso, melhora o tono venoso e a microcirculação, e é portanto usada para o tratamento de insuficiência venosa crônica, hemorróidas e na prevenção do tromboembolismo pós-operatório. Esta molécula está associada à hesperidina em medicamentos venotônicos e vasculoprotetores.

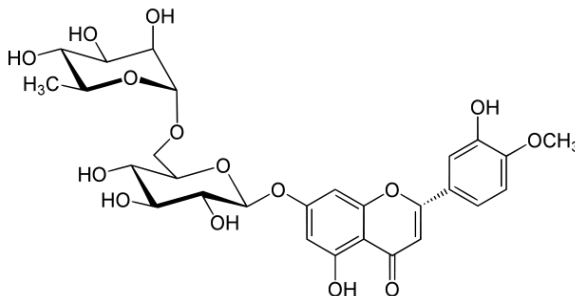


Figura 11 - Estrutura química da diosmina (3',5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona 7-rutinosídeo).

Recentemente um número considerável de diferentes métodos tem sido utilizado para a separação e a determinação de diosmina e hesperidina, sejam sozinhas ou combinadas com outros flavonóides glicosídicos, em extratos de plantas, fluidos biológicos, ou formulações farmacêuticas (CHEN *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008; BUNACIU *et al.*, 2009). Métodos espectrofotométricos têm sido desenvolvidos para quantificação de flavonóides em diferentes tipos de materiais. Técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e de eletroforese são amplamente utilizadas para a separação e quantificação destes compostos (AKYIAMA *et al.*, 2000; MOLNÁR-PERL & FUZFAI, 2005).

Entretanto, alguns destes métodos não são validados, alguns consomem tempo, outros requerem equipamentos caros ou técnicas de extração trabalhosas, ou não existe padrão interno. Por esse motivo, métodos eletroquímicos são métodos alternativos para a detecção de espécies eletroativas, como a hesperidina e a diosmina, pelas vantagens de simplicidade, fácil miniaturização, alta sensibilidade e relativamente baixo custo (ADAM *et al.*, 2007).

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS ENZIMA-BICAMADAS LIPÍDICAS E ENZIMA-NANOPARTÍCULAS

Diversas técnicas podem ser utilizadas para caracterizar os sistemas enzima-bicamadas lipídicas e enzima-nanopartículas tais como: voltametria cíclica (CV), voltametria de onda quadrada (SWV) e microscopia de força atômica (AFM).

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência desta técnica resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (DIAO *et al.*, 1999; CHEN & LI, 2006). Além disso, no que diz respeito ao processo de formação de SAMs, é possível obter informações valiosas sobre a distribuição de defeitos/buracos, a cinética e mecanismos do processo de formação, a cobertura da superfície e a espessura efetiva aparente das monocamadas auto-organizadas (VELA *et al.*, 2000; VERICAT *et al.*, 2005; CAMPUZANO *et al.*, 2006). Neste trabalho, a técnica CV foi utilizada para verificar o potencial de oxirredução dos compostos dopamina, hesperidina e diosmina; e monitorar a formação das bicamadas lipídicas suportadas na superfície do eletrodo via monocamadas auto-organizadas.

A voltametria de onda quadrada é uma das técnicas de pulso mais rápidas e sensíveis utilizadas atualmente. Os limites de detecção obtidos com sua utilização podem ser melhores ou comparados àqueles das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Dentre as muitas vantagens apresentadas pela SWV pode-se destacar a ausência da interferência proveniente da corrente capacitiva, já que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial em que a corrente capacitiva já se tornou negligenciável; e a análise de componentes de corrente direta e reversa, que possibilita a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos por voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade, devido à minimização das correntes capacitivas. Neste trabalho, a técnica SWV foi empregada para otimização dos sistemas enzima-bicamadas lipídicas e enzima-nanopartículas e para a determinação dos compostos dopamina, hesperidina e diosmina em produtos farmacêuticos.

A microscopia de força atômica tem sido útil para as investigações envolvendo a morfologia de bicamadas lipídicas (ZASADZINSKI *et al.*, 1991; HUI *et al.*, 1995; SHAO *et al.*, 1996). Medidas *in-situ* de AFM permitem investigar fenômenos biológicos em tempo real e em meios fisiológicos (TOKUMASU *et al.*, 2002; MUNFORD *et al.*, 2005). AFM também vem sendo utilizada para caracterizar a estrutura de bicamadas lipídicas em meio aquoso e a interação com agentes externos como peptídeos e fármacos, bem como para o desenvolvimento de biossensores (MOU *et al.*, 1996; TAMM *et al.*, 1996; MERINO *et al.*, 2003). As bicamadas lipídicas podem ser

investigadas através de AFM em modo contato, de uma forma simples e econômica, desde que a força operacional de varredura seja mínima. Deste modo, evita-se que a ponta que efetua a varredura da amostra não danifique a mesma (MUNFORD *et al.*, 2005). Na caracterização de nanopartículas poliméricas, a microscopia de força atômica tem sido utilizado como uma técnica complementar, visto que para tal sistema a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “dynamic light scattering”) é amplamente utilizada para a determinação do tamanho e distribuição das nanopartículas. Entretanto, existem algumas vantagens na utilização do AFM como ferramenta na caracterização de nanopartículas poliméricas (GARG & KOKKOLI, 2005). É possível caracterizar simultaneamente o formato e estrutura das nanopartículas, além de observar a distribuição de diferentes populações de nanopartículas, as quais geralmente não podem ser observadas por DLS (FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009; ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2009). Este tipo de informação é fundamental no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas para o carreamento de fármacos ou como material suporte de enzimas na aplicação de biossensores. Neste trabalho propomos duas estratégias para a imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas. Ambos os sistemas foram desenvolvidos e caracterizados em diferentes desenhos experimentais para a aplicação como biossensores e utilização destes como dispositivos para a determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos.

A descrição sucinta de cada técnica utilizada neste trabalho de doutorado está apresentada na seção Parte Experimental.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Esta tese de doutorado tem como objetivo propor duas estratégias para a imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas; para a utilização destes como dispositivos na determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Sistema enzima-bicamadas lipídicas

- Preparar monocamadas auto-organizadas em suporte sólido de ouro, utilizando o sistema de monocamadas auto-organizadas do alcanoditiol: ditioneitol (DTT);
- Caracterizar o suporte de ouro e as monocamadas auto-organizadas de DTT neste suporte através de AFM e técnicas eletroquímicas como CV;
- Preparar bicamadas lipídicas compostas por dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) em suporte sólido de ouro via monocamadas auto-organizadas;
- Caracterizar as bicamadas lipídicas através de AFM;
- Imobilizar a peroxidase HRP nas bicamadas lipídicas suportadas em ouro;
- Determinar concentrações de dopamina através das técnicas de CV e SWV utilizando o sistema enzima-bicamadas lipídicas.

3.2.2 Sistema enzima-nanopartículas poliméricas

- Caracterizar as nanopartículas de PU-PEG por AFM;
- Selecionar diferentes vegetais, obter a peroxidase, determinar a atividade enzimática, proteína total e atividade específica;
- Estudar o efeito de aditivos sobre a atividade da peroxidase obtida de tecido vegetal;
- Imobilizar a peroxidase obtida de tecido vegetal em nanopartículas de PU-PEG e construir eletrodos de pasta de carbono;
- Imobilizar a peroxidase HRP purificada em nanopartículas de PU-PEG e construir eletrodos de pasta de carbono;

- Estudar a interação entre a HRP e nanopartículas de PU-PEG através de técnicas espectrofotométricas;
- Otimizar os eletrodos modificados utilizando as técnicas de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada para investigar parâmetros, tais como: pH, concentração da enzima, frequência e amplitude de potencial;
- Comparar o desempenho dos eletrodos desenvolvidos e utilizar na determinação de dopamina, hesperidina e diosmina em produtos farmacêuticos.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 SISTEMA ENZIMA-BICAMADAS LIPÍDICAS

4.1.1 Preparação das monocamadas auto-organizadas de tióis

Os suportes de ouro utilizados para a preparação das monocamadas de tióis foram comprados da Gold Arrandee® (Alemanha) e consistem de uma camada de ouro de 250 nm depositada sobre 4 nm de cromo em vidro. Antes da imersão do suporte de ouro na solução de DTT, foi realizado o processo conhecido como “flame annealing” (recozimento) durante 3 minutos no suporte de ouro para gerar terraços atomicamente lisos (Au 111). As monocamadas auto-organizadas de tióis foram formadas no suporte sólido de ouro pela imersão deste suporte em uma solução etanólica de ditioneína (DTT) na concentração de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 60°C, num tempo de incubação de 30 minutos, adaptado do procedimento apresentado por MacDairmid e colaboradores (2003) e conforme descrito no procedimento de Creczynski-Pasa e colaboradores (2009).

4.1.2 Preparação dos lipossomas

Os lipossomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Figura 12 A) foram obtidos pelo método da extrusão de lipossomas multilamelares (OLSON *et al.*, 1979; CRECZYNSKI-PASA *et al.*, 2000). Resumidamente, um filme lipídico foi obtido pela evaporação do solvente, sob fluxo de nitrogênio, de uma solução de DMPC (20 mg mL⁻¹) preparada em clorofórmio. Para eliminar traços do solvente, as amostras foram deixadas sob vácuo durante 1 hora. Subsequentemente, lipossomas multilamelares foram obtidos pela adição do tampão HEPES 0,01 mol L⁻¹ e NaCl 0,9% m/v (pH 7,4) e pela agitação vigorosa em um agitador tipo vortex. A suspensão multilamelar foi então submetida à filtração forçada com filtro de policarbonato com poro de 400 nm (Nuclepore) para formação de lipossomas unilamelares (Figura 12 B). Os lipossomas obtidos foram então diluídos em tampão até uma concentração final de 10 mg mL⁻¹.

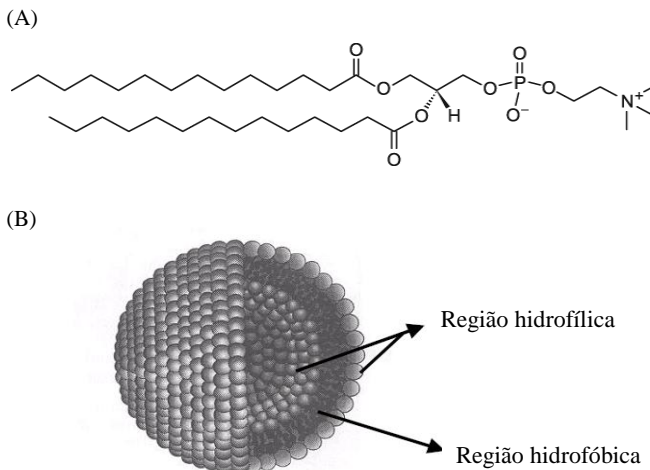


Figura 12 - Estrutura química do fosfolípido dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (A) e modelo de um lipossoma de fosfolípidios (B).

4.1.3 Preparação das bicamadas lipídicas

As bicamadas de DMPC foram preparadas pelo método de fusão de vesícula nos suportes sólidos de ouro contendo monocamadas de DTT (CRECZYNSKI-PASA *et al.*, 2009). Os suportes foram imersos em 1mL de suspensão de lipossomas de DMPC (10 mg mL^{-1}) por 90 minutos a 30°C (acima da temperatura de transição de fase do DMPC). Para remover o excesso de lipossomas, os suportes foram enxaguados com tampão HEPES $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,9\%$ NaCl m/v (pH 7,4) e imediatamente transferidos para a análise pelas técnicas eletroquímicas e AFM.

4.1.4 Imobilização da HRP nas bicamadas lipídicas suportadas em ouro

O procedimento da imobilização da HRP em bicamadas lipídicas foi adaptado do procedimento apresentado por Tang e colaboradores (2003). Diferentes concentrações de HRP ($0,05$ a 2 mg mL^{-1}) foram preparadas adicionando-se os volumes calculados para as concentrações desejadas, e completou-se o volume para 1 mL com a suspensão de lipossomas formados de DMPC (10 mg mL^{-1}). Cerca de 20

μL desta mistura de HRP e lipossomas de DMPC foram adicionados nos suportes contendo as monocamadas auto-organizadas de DTT. Após 90 minutos de incubação, os suportes foram enxaguados com tampão HEPES $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl $0,9\% \text{ m/v}$ (pH 7,4) para remover o excesso de lipossomas e HRP que não foram imobilizados. Após esta etapa, o sistema enzima-bicamadas lipídicas foi caracterizado por AFM, e também usado para a determinação de dopamina através das técnicas eletroquímicas.

4.2 SISTEMA ENZIMA-NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

4.2.1 Obtenção das nanopartículas de PU-PEG

As nanopartículas utilizadas neste trabalho de doutorado foram produzidas pela Dra. Betina Giehl Zanetti-Ramos do Departamento de Ciências Farmacêuticas-UFSC e foram preparadas pela técnica da miniemulsão, conforme previamente descrito (Zanetti-Ramos *et al.*, 2006). Resumidamente, 10 g de uma mistura de monômero contendo diisocianato de isoforeno (IPDI), triol natural, poli (etilenoglicol) 400 (PEG 400) e 3 m/m % de azeite de oliva foram adicionados em uma solução aquosa contendo Tween 80[®] (monooleato de polioxietileno sorbitano) (20 m/m% *vs.* monômero), e agitados à temperatura ambiente. As nanogótulas do monômero foram obtidas utilizando um homogeneizador Ultra-Turrax[®] T18 a 18.000 rpm por 15 minutos. A dispersão foi mantida sob agitação mecânica (800 rpm) a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas para a completa formação das nanopartículas de PU-PEG. A concentração final obtida do sistema polimérico coloidal foi de 50 mg mL^{-1} . Estas nanopartículas foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Neste trabalho entretanto, foi utilizada a microscopia de força atômica (AFM) como técnica complementar para a caracterização morfológica.

4.2.2 Preparação dos suportes sólidos para o AFM

Os suportes sólidos utilizados na caracterização das nanopartículas poliméricas por AFM foram mica muscovita, silício hidrofílico e silício hidrofóbico. As lâminas de mica (SPI-supplies, West Chester, PA, USA) foram clivadas antes de sua utilização, ou seja, as primeiras lâminas da superfície foram removidas para a obtenção de um suporte livre de contaminantes. As lâminas de silício 100 foram fabricadas pela MEMC Electronic Materials (Malásia). As lâminas

foram cortadas em quadrados com área de aproximadamente 1 cm^2 . O silício hidrofóbico foi obtido pela remoção do óxido nativo da superfície deste suporte inserindo-o por 15 segundos em uma solução de ácido fluorídrico (HF 5% v/v). Em seguida, o silício foi removido, lavado com água ultrapura (resistividade específica $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) e secado com fluxo de gás nitrogênio. O resultado é que todas as ligações livres do silício ficam saturadas por átomos de hidrogênio e as ligações Si - H formadas são estáveis e impedem uma nova contaminação do suporte pelo oxigênio do ar. Este simples procedimento faz com que a superfície de silício se torne hidrofóbica (DAHMEN *et al.*, 2003). O silício hidrofílico foi obtido pelo aparecimento de uma camada fina de dióxido de silício quando o suporte foi imerso a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos em uma solução contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado e peróxido de hidrogênio (30 volumes) na proporção 3:1. O suporte foi lavado com água ultrapura em abundância e secado sob fluxo contínuo de gás nitrogênio. Através desse procedimento obtém-se na superfície do silício a formação de ligações SiO_2 , com propriedades hidrofílicas (GU *et al.*, 1999).

4.2.3 Preparação das amostras para o AFM

As nanopartículas de PU-PEG foram diluídas com água deionizada para uma concentração final de 1 mg mL^{-1} . Em seguida, um volume de $20 \text{ }\mu\text{L}$ da suspensão foi depositado em mica, silício hidrofílico e hidrofóbico, e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente até completa evaporação do solvente. As imagens das nanopartículas por AFM foram obtidas conforme descrito na seção 4.3.4.

4.2.4 Extração da peroxidase de diferentes vegetais

Os vegetais caqui (*Diospyros kaki* L.), carambola (*Averrhoa carambola* L.), inhame (*Dioscorea* sp.), açafraão (*Crocus sativus* L.), batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*), ervilha (*Pisum sativum* L.) e pinhão (*Araucaria angustifolia*) foram usados e testados como fonte da peroxidase. O procedimento da extração foi adaptado do procedimento apresentado por Oliveira e colaboradores (2006). Sucintamente, 25 g de cada vegetal (lavado e descascado) a ser testado foi fatiado e homogeneizado em um liquidificador, com 100 mL de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) por 1 minuto a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O homogenato foi filtrado e centrifugado a 15.000 rpm por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução

sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4 °C, e usada como fonte de peroxidase para a determinação da atividade enzimática dos diferentes vegetais utilizados, com posterior construção dos eletrodos.

4.2.5 Determinação da atividade enzimática e do teor de proteína

A atividade enzimática da peroxidase presente no homogenato dos vegetais selecionados foi determinada em triplicata medindo-se a absorbância ($\lambda = 470$ nm) do tetraguaiacol formado na reação entre 0,13 mL da solução sobrenadante contendo a enzima, 1,7 mL da solução de guaiacol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 0,06 mL de peróxido de hidrogênio $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) num período de 2 minutos (JEFFERY *et al.*, 1992). A Figura 13 mostra a reação de oxidação catalítica do guaiacol e H_2O_2 na presença de peroxidase.

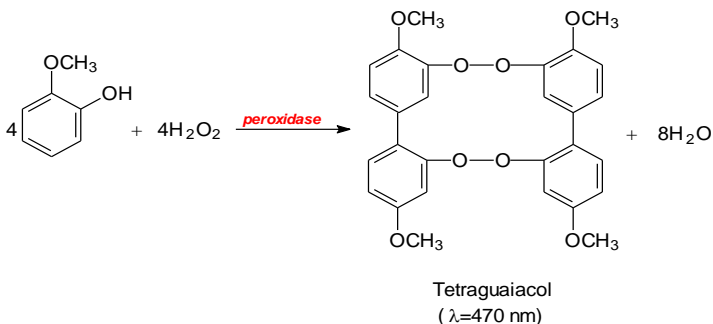


Figura 13 - Representação esquemática da reação de oxidação catalítica do guaiacol e H_2O_2 na presença da peroxidase.

A atividade enzimática – unidades mL^{-1} (U mL^{-1}) - definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto, foi determinada pela Equação 7.

$$A (\text{U mL}^{-1}) = \frac{\Delta \text{Abs } 1000}{\Delta t V} \quad (7)$$

Em que:

A = atividade da enzima (U mL^{-1})

ΔAbs = variação da absorbância ($\lambda = 470$ nm)

V = volume do homogenato (mL)

Δt = variação do tempo (minutos)

O teor de proteína total do extrato enzimático foi determinado pelo método do biureto (GORNALL *et al.*, 1949), empregando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A curva analítica foi construída a partir de 8,0 mL do reagente de biureto, variando os volumes de 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; e 2,0 mL de BSA e completando o volume para 10,0 mL com água destilada. Utilizando 1,0 mL do homogenato dos vegetais e 4,0 mL da solução de biureto, após homogeneização destas soluções e repouso durante 30 minutos, as leituras foram feitas em $\lambda = 546$ nm. A atividade específica (U mg^{-1} de proteína) foi calculada pela razão da atividade da enzima (U mL^{-1}) e o teor de proteína total (mg mL^{-1}).

4.2.6 Influência de aditivos na atividade da peroxidase extraída de vegetais

Foi utilizado o homogenato do vegetal que apresentou maior atividade para a incorporação de aditivos, e para a avaliação da influência na atividade enzimática, de acordo com o procedimento adaptado do trabalho de Maciel e colaboradores (2006). Foram utilizados sacarose $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; glicerol $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; PEG (polietileno glicol) 2% (v/v), PVP (polivinilpirrolidona) 1:10 (v/v) e PCP (policaprolactona) 1:1 (v/v), os quais foram incorporados a solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0). Foi medida a atividade dos extratos contendo os aditivos num período de 35 dias, cujo procedimento está descrito na seção 4.2.5. As medidas foram realizadas em triplicata com uma periodicidade semanal para cada amostra de homogenato contendo aditivo. As amostras foram mantidas a temperatura de 4°C durante todo o período quando não utilizadas nos experimentos.

4.2.7 Imobilização da peroxidase do homogenato nas nanopartículas de PU-PEG

Foram adicionadas alíquotas de 30 a 630 μL da peroxidase extraída do vegetal selecionado (pinhão – *Araucaria angustifolia*) (contendo de 100 a 2000 unidades da peroxidase mL^{-1}) sobre 0,1 g de nanopartículas de PU-PEG. Após 24 horas em temperatura ambiente, esse material foi colocado para secar em um dessecador e armazenado a temperatura ambiente. A atividade da peroxidase do homogenato não foi determinada após a imobilização em nanopartículas de PU-PEG. Entretanto, foi avaliado o desempenho de cada eletrodo construído

contendo diferentes quantidades de enzima imobilizada (ver seção 5.3.3).

4.2.8 Estudo da interação entre HRP e nanopartículas de PU-PEG

Para o estudo da interação entre a peroxidase e as nanopartículas de PU-PEG, optou-se em utilizar a enzima purificada HRP (horseradish peroxidase) proveniente da Sigma-Aldrich (Tipo I, $\sim 44.000 \text{ g mol}^{-1}$, 113 U mg^{-1} , EC 1.11.1.7). O procedimento da adsorção da HRP em nanopartículas de PU-PEG foi adaptado do procedimento apresentado por Silva e colaboradores (2007). Diferentes concentrações da HRP ($0,5$ a 2 mg mL^{-1}) foram preparadas adicionado-se os volumes calculados para as concentrações desejadas, e completou-se o volume para 1 mL com tampão fosfato ($\text{pH } 6,5$). As diferentes soluções da enzima foram adicionadas em 20 mg de nanopartículas de PU-PEG em eppendorfes com capacidade de $1,5 \text{ mL}$. O sistema foi agitado e incubado pelo tempo de adsorção de equilíbrio obtido a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o tempo de incubação, a mistura foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e a absorbância em $\lambda = 403 \text{ nm}$ do sobrenadante foi medida em um espectrofotômetro-UV e comparada com uma curva de calibração para determinar a concentração da enzima que não foi adsorvida nas nanopartículas. Subtraindo os valores encontrados das respectivas concentrações iniciais, obteve-se o valor da concentração da peroxidase adsorvida nas nanopartículas. Testes de dessorção foram realizados redispersando as nanopartículas com a enzima adsorvida em $1,0 \text{ mL}$ de tampão fosfato ($\text{pH } 6,5$). Após 24 horas, as dispersões foram centrifugadas a 15.000 rpm por 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e a concentração da enzima livre no sobrenadante foi novamente determinada por espectrofotometria em 403 nm . A atividade da HRP foi determinada antes e após a imobilização em nanopartículas de PU-PEG, cujo procedimento está descrito na seção 4.2.5.

4.2.9 Preparação dos eletrodos de pasta de carbono

Diferentes eletrodos foram preparados para avaliar o desempenho dos biossensores contendo a peroxidase do homogenato de pinhão (*Araucaria angustifolia*) e da HRP purificada imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG. A composição de pasta de carbono utilizada para a construção dos eletrodos modificados foi de $75/15/10 \%$ (m/m) de grafite/óleo mineral/enzima, conforme o procedimento apresentado por Oliveira e Vieira (2006).

Os procedimentos da preparação dos eletrodos são os que seguem:

(a) Eletrodo de pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG: foi preparado misturando-se 150 mg de pó de grafite (75% m/m), e 20 mg de nanopartículas de PU-PEG em um macerador durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 30 mg de óleo mineral (15% m/m) e homogeneizados por mais 20 minutos.

(b) Eletrodo de pasta de carbono contendo a peroxidase extraída do pinhão: foi preparado adicionando-se diferentes quantidades da enzima (100-2000 unidades) em 150mg de pó de grafite. Este material foi deixado secar por 24 horas a temperatura ambiente e após este período, foi homogeneizado por 20 minutos, adicionado 30 mg de óleo mineral e misturado por mais 20 minutos.

(c) Eletrodo de pasta de carbono: foi preparado misturando-se 150 mg de pó de grafite (75% m/m), e 30 mg de óleo mineral em um macerador durante 20 minutos.

(d) Eletrodo de pasta de carbono contendo a peroxidase extraída do pinhão e imobilizada em nanopartículas de PU-PEG: foi preparado misturando-se 150 mg de pó de grafite (75% m/m), e 20 mg de nanopartículas de PU-PEG contendo a peroxidase imobilizada (100-2000 unidades de enzima, 10 m/m %) durante 20 minutos. Em seguida, 30 mg de óleo mineral foi adicionado e o material foi misturado por mais 20 minutos.

(e) Eletrodo de pasta de carbono contendo a HRP (enzima purificada): foi preparado de forma similar ao que está descrito no item (b), entretanto a quantidade de HRP adicionada à pasta de carbono foi determinada pelas isotermas de adsorção obtidas conforme descrito na seção 4.2.8.

(f) Eletrodo de pasta de carbono contendo a HRP (enzima purificada) imobilizada em nanopartículas de PU-PEG: foi preparado de forma similar ao que está descrito no item (d), entretanto a concentração de enzima imobilizada nas nanopartículas foi determinada pelas isotermas de adsorção obtidas conforme descrito na seção 4.2.8.

Todas as pastas de carbono obtidas conforme os itens descritos acima foram transferidas para uma seringa plástica de 1 mL (diâmetro interno de 3 mm) e um fio de cobre foi inserido para obtenção do contato elétrico. Os eletrodos foram mantidos a temperatura de 4 °C quando não utilizados nos ensaios.

Para avaliar o desempenho dos eletrodos de pasta de carbono, parâmetros como concentração da enzima, pH, frequência e amplitude

foram otimizados pelas técnicas voltamétricas e os melhores valores obtidos estão descritos na seção de Resultados e discussão.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS ESTUDADOS

4.3.1 Experimentos espectrofotométricos

As medidas espectrofotométricas para a determinação da atividade enzimática e proteína total da peroxidase extraída de vegetais; e para a determinação do comprimento de onda, atividade da HRP livre e imobilizada nas nanopartículas de PU-PEG, foram obtidas em um espectrofotômetro Spectro Vision, Single Beam, modelo SB-1810S, no laboratório do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas, Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFSC. Todas as medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, com capacidade de 2mL e à temperatura ambiente (24 ± 1) °C.

4.3.2 Medidas do potencial zeta das nanopartículas

As medidas do potencial zeta das nanopartículas foram obtidas em um Zetasazier Nano ZS (Malvern Instruments), modelo ZEN 3600, equipado com um laser de 633 nm (He-Ne; 4 mW), no laboratório do Grupo de Estudos de Interações entre Micro e Macromoléculas, Departamento de Ciências Farmacêuticas – UFSC. O equipamento opera na faixa de 0,6 a 6000 nm. As amostras foram diluídas dez vezes em água destilada e colocadas em cubetas especiais para a medida do potencial zeta.

O potencial zeta é o potencial eletrostático gerado pela acumulação de íons na superfície da partícula ou pela ionização dos grupos funcionais da superfície. É aplicado na determinação da carga de superfície de partículas como nanopartículas, proteínas, lipossomas, entre outros (DOUGHERTY *et al.*, 2008; JACHIMSKA *et al.*, 2008).

A superfície da partícula está organizada numa dupla camada elétrica, composta pela região interna ou camada de Stern (em que os íons estão fortemente ligados à superfície) e a região externa ou camada difusa (em que os íons estão ligados à superfície de um modo mais fraco). Dentro da camada difusa existe uma fronteira em que os íons e as partículas formam uma entidade estável, denominada de plano deslizante e o potencial existente nesta fronteira é designado de potencial zeta, como ilustra a Figura 14.

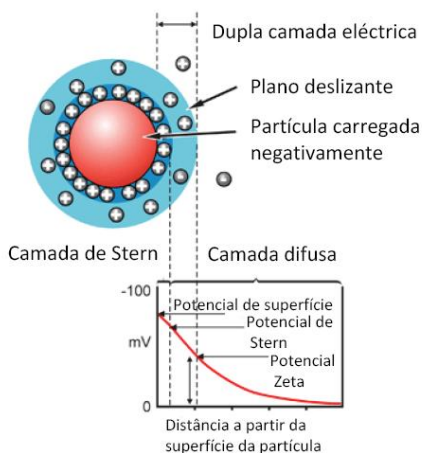


Figura 14 - Representação esquemática do potencial zeta.

Neste trabalho, o valor do potencial zeta (ζ) foi determinado pelos valores da mobilidade eletroforética usando a equação de Smoluchowski: $\zeta = \mu\eta/\epsilon$, onde μ é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do meio e ϵ é a constante dielétrica do meio.

4.3.3 Experimentos eletroquímicos

Os experimentos de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada foram realizados em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12, no Laboratório de Filmes Finos e de Superfícies, Departamento de Física – UFSC, usando uma célula de vidro, sem compartimento divisório, com capacidade aproximada de 15 mL, contendo tampa de PVC com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções. Uma placa de platina com área de 0,5 cm² foi utilizada como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência. Os eletrodos de trabalho utilizados foram os de pasta de carbono construídos conforme os procedimentos descritos na seção 4.2.9 ou o suporte sólido de ouro funcionalizado com as monocamadas auto-organizadas de DTT contendo as bicamadas lipídicas com ou sem a HRP conforme descrito nas seções 4.1.4 e 4.1.3, respectivamente.

As soluções utilizadas (diferentes tampões e pHs, dependendo do sistema estudado) e a otimização de cada sistema estão descritas na

seção de Resultados e discussão. A concentração de peróxido de hidrogênio utilizada em todos os experimentos foi de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a temperatura ambiente, conforme descrito por Vieira e colaboradores (1999). Testes preliminares foram realizados para determinar a faixa de potencial e velocidade de varredura para as medidas de voltametria cíclica; e faixa de potencial, amplitude e frequência para as medidas de voltametria de onda quadrada. A descrição das técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho está apresentada a seguir.

A técnica de voltametria cíclica baseia-se na aplicação de um potencial para regiões mais positivas (anódica), em que ocorre a oxidação da substância em solução e um pico de corrente é gerado, sendo proporcional à concentração da mesma. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de oxidação ocorre, o potencial é varrido no sentido inverso, para regiões mais negativas (catódica), até o valor inicial, neste sentido de varredura ocorre a redução do composto. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão reduzidos, gerando um pico simétrico ao pico da oxidação. O tipo de voltamograma gerado depende do mecanismo redox do composto em questão, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos. A Figura 15 mostra um típico voltamograma cíclico.

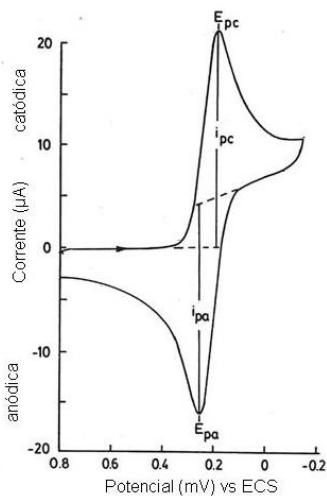


Figura 15 - Voltamograma cíclico onde i_p^a = corrente de pico anódica, i_p^c = corrente de pico catódica, E_p^a = potencial de pico anódico e E_p^c = potencial de pico catódico.

A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica está representada na Figura 16. O potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando um potencial em forma de triângulo. Dependendo da informação desejada, simples ou múltiplos ciclos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante desta corrente versus o potencial aplicado.

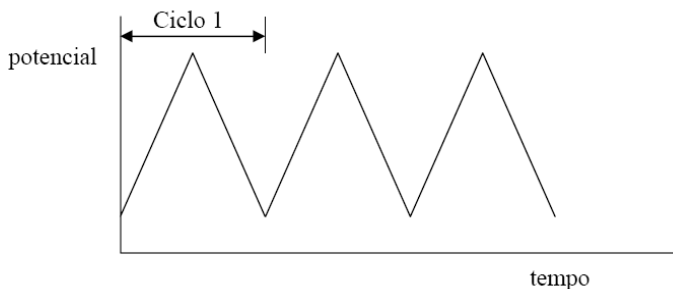


Figura 16 - Variação linear do potencial (ΔE) em função do tempo.

Para a quantificação, a voltametria cíclica é muito limitada, pois geralmente pode-se determinar espécies químicas nas concentrações de 10^{-5} a 10^{-4} mol L⁻¹. A baixa sensibilidade pode estar relacionada à chamada corrente capacitiva, que é uma das principais componentes da corrente de fundo. Essa corrente surge devido a fenômenos relacionados à dupla camada elétrica. Quando um potencial é aplicado a um eletrodo, ele adquire uma carga, devido ao carregamento e descarregamento da dupla camada elétrica. Como em voltametria usa-se varredura de potencial, a cada etapa de potencial aplicado, o eletrodo apresentará esse descarregamento da dupla camada, desenvolvendo uma corrente, que, por esta razão, é chamada de corrente capacitiva. A corrente faradaica também favorece a corrente de fundo, que ocorre devido a impurezas presentes nos reagentes utilizados e a presença de oxigênio dissolvido, que pode ser minimizada empregando-se reagentes de alto grau de pureza e a deaeração do sistema. No entanto, a principal componente da corrente de fundo pode ser considerada a corrente capacitiva (BARD & FAULKNER, 2001).

Já a voltametria de onda quadrada é uma técnica voltamétrica de pulso em que a forma do pico de corrente resultante é proveniente da sobreposição de pulsos de potencial de altura a (amplitude de pulsos), a

uma escada de potenciais de largura ΔE_s (incremento de varredura de potenciais) e duração $2t$ (período), como mostrado na Figura 17 A.

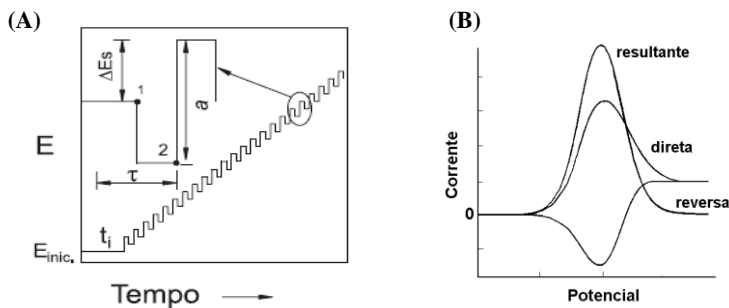


Figura 17 - Forma de aplicação do potencial no SWV (A) e voltamograma esquemático de onda quadrada de um processo redox reversível (B).

As medidas de corrente são realizadas no final dos pulsos diretos e reversos e o sinal obtido, após derivação, é dado como uma intensidade da corrente resultante, apresentando elevada sensibilidade a pequenos valores de corrente e pouca influência das correntes capacitivas (SOUZA *et al.*, 2004). A Figura 17 B apresenta o voltamograma de onda quadrada teórico associado a um sistema reversível, com a separação observada das correntes direta, reversa e resultante. O pico voltamétrico resultante apresenta posição, largura e altura características do tipo de sistema redox avaliado.

4.3.4 Experimentos com o AFM

A microscopia de força atômica é um tipo de microscopia de varredura com sonda de alta resolução. O AFM foi inventado por Binnig, Quate e Gerber em 1986, e é uma das ferramentas mais utilizadas para imagem, medidas e manipulação de materiais em escala nano (BINNIG *et al.*, 1986).

A Figura 18 mostra a representação esquemática da microscopia de força atômica.

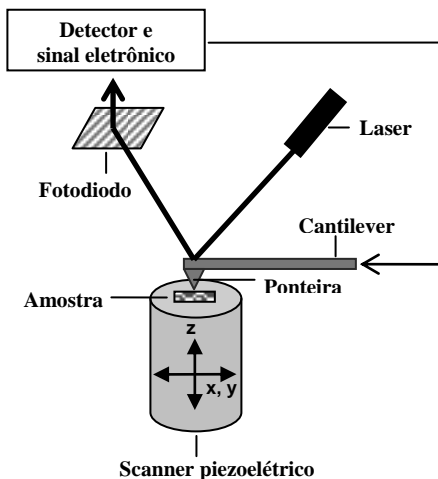


Figura 18 - Representação esquemática do sistema de microscopia de força atômica.

O princípio de funcionamento do AFM baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma ponta piramidal (ponteira) de alguns micra de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A sonda (ponteira + cantilever) é sempre o componente básico do AFM e, para alcançar resolução atômica, a ponta tem que terminar em um conjunto de átomos (HOWLAND & BENATAR, 1996). A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Um laser incide sobre o cantilever e é refletido para um conjunto de fotodetectores. O sinal elétrico obtido é realimentado para o computador mantendo constante a deflexão do cantilever (modo de contato) ou a amplitude de oscilação (modo contato intermitente ou não-contato). As correções na altura z são então gravadas juntamente com as respectivas posições x, y da amostra, gerando a imagem topográfica da amostra. A força mais comumente associada com AFM na deflexão do cantilever é a força de van der Waals (FERREIRA & YAMANAKA, 2006).

A técnica de AFM, conforme mencionado anteriormente, pode ser operada em três diferentes modos: contato, não-contato e contato intermitente (“tapping mode”) (CHICHESTER, 1998). Os diferentes modos estão representados na Figura 19.

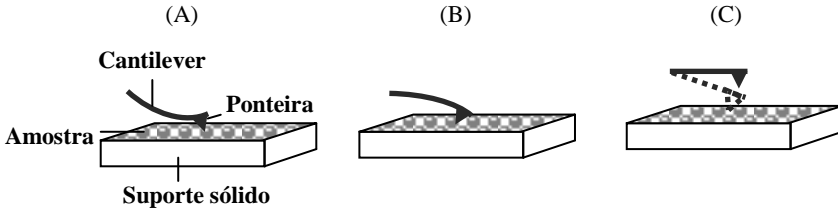


Figura 19 - Representação esquemática dos modos de operação em AFM: modo contato (A), modo não-contato (B), e modo intermitente (C).

No modo contato, o cantilever é mantido a poucos ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é repulsiva. Neste modo de operação, a ponta faz um leve “contato físico” com a amostra produzindo imagens com alta resolução, mas a compressão e as forças geradas, entre a ponta e a superfície, podem causar danos à amostra, o que é especialmente prejudicial às amostras biológicas que são sensíveis e nem sempre fortemente aderidas ao suporte sólido.

No modo de não-contato, o cantilever é mantido de dezenas a centenas de ângstroms da superfície da amostra e a força interatômica entre a ponta e a amostra é atrativa. Neste caso a ponta oscila em alta frequência (100 kHz a 1 MHz), a poucos nanômetros acima da superfície e a força total entre a ponta e a amostra é muito baixa, geralmente em torno de 10^{-12} N. Esta oscilação aumenta consideravelmente a sensibilidade do microscópio, o que faz com que forças de van der Waals e forças eletrostáticas possam ser detectadas. O modo de não-contato não sofre os efeitos do atrito sobre a amostra, causada pela ponta, conforme é observado no modo contato após diversas varreduras. Por outro lado, este modo não tem encontrado aplicabilidade geral, devido à instabilidade entre a ponta e as forças adesivas da superfície e à resolução reduzida pela distância ponta-amostra que é relativamente grande. Esta limitação tem sido contornada com a utilização do modo intermitente.

O modo contato intermitente é similar ao não-contato, exceto pelo fato de que a ponta vibrante fica mais próxima da amostra, de forma que tenha um contato intermitente e é utilizado para contornar as limitações impostas pelo modo contato. A comparação das imagens nos modos contato e intermitente mostra que as superfícies são menos modificadas no modo intermitente.

As imagens de AFM das nanopartículas de PU-PEG e do sistema enzima-bicamadas lipídicas foram obtidas em um microscópio de força atômica da Molecular Imaging PicoSPM (Arizona, EUA), no Laboratório de Filmes Finos e de Superfícies, Departamento de Física - UFSC. O microscópio foi operado *in situ* a temperatura ambiente com tampão HEPES 0,01 mol L⁻¹ e NaCl 0,9% m/v (pH 7,4) (MUNFORD *et al.*, 2005), e utilizando um tubo de varredura de 6 µm. As imagens foram obtidas no modo contato com pontas de nitreto de silício com cantilever de 196 µm de comprimento (Veeco NanoProbes - Califórnia, EUA), constante de mola de 0,12 N m⁻¹, raio de curvatura nominal da ponta de 10 nm e forças aplicadas entre 3 e 10 nN. A velocidade de varredura foi otimizada entre 1 e 3 Hz. As áreas de varreduras obtidas foram de 1 x 1 µm² e 5 x 5 µm² com resolução de 512 x 512 píxeis. O processamento das imagens foi realizado usando o programa VSxM 2.1 (Nanotec Electronica, Espanha).

4.3.5 Determinação dos compostos fenólicos empregando-se os sistemas propostos

Curvas analíticas dos compostos fenólicos dopamina, hesperidina e diosmina foram construídas pelo plote da intensidade do pico da corrente resultante (obtidos dos voltamogramas de onda quadrada) versus concentração dos compostos fenólicos adicionados.

O teor de dopamina, hesperidina e diosmina em produtos farmacêuticos foi determinado pelo método de adição múltipla de padrão. Este método consiste em adicionar um determinado volume da amostra em estudo, em 15 mL de tampão contendo peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente, com sucessivas adições de concentrações conhecidas das amostras padrões dos compostos fenólicos. Após cada adição, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos na faixa de potencial, amplitude e frequência previamente determinados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IMOBILIZAÇÃO DA HRP NAS BICAMADAS LIPÍDICAS SUPORTADAS EM OURO

5.1.1 Caracterização do suporte sólido de Au (111)

As camadas de Au depositadas sobre suportes como vidro, mica ou silício são policristalinas e compostas de uma camada contínua de ilhas ou grânulos do metal que variam de 10 a 1000 nm (LOVE *et al.*, 2005). A morfologia destes grânulos varia substancialmente dependendo do método experimental e das condições de preparação e posterior tratamento do suporte metálico. Empregando-se a técnica de “flame annealing”, o tamanho e forma dos grânulos mudam consideravelmente; de um conjunto de grânulos pequenos e coliformes (Figura 20 A), para um conjunto de grânulos de 2 a 3 μm que apresentam terraços atômica-mente lisos com orientação preferencial Au (111) (Figura 20 B).

A preferência pelo Au (111) se dá tanto nos casos em que se depositam espécies inorgânicas, como metais em condições de subpotencial (LORENZ *et al.*, 1996), ou para depósitos de monocamadas orgânicas, como as SAMs de alcanotióis. A face do Au (111) é a mais densamente empacotada e pode ser obtida com relativa facilidade. Isto permite realizar estudos sistemáticos com superfícies bem caracterizadas, para o desenvolvimento de biossensores e materiais biomiméticos (LOVE *et al.*, 2005).

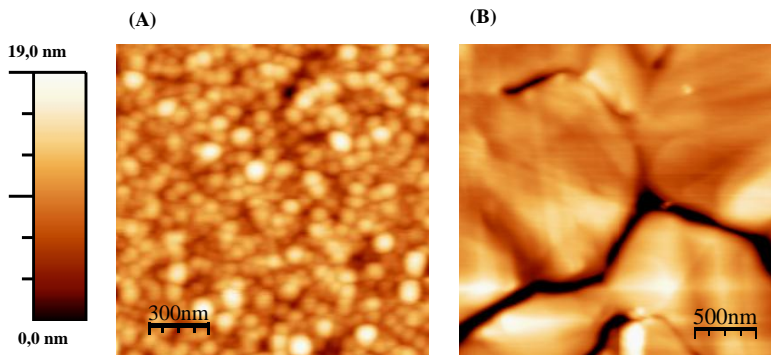


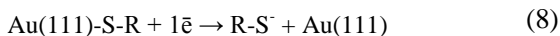
Figura 20 - Imagens topográficas do AFM no modo contato da superfície de Au antes (A) e após o processo do “flame annealing” com os terraços monoatômicos formados (B).

5.1.2 Curva de dessorção eletroquímica do DTT no suporte de Au (111)

Os tióis sofrem dessorção redutiva quando potenciais mais negativos são aplicados em eletrodos metálicos (FINKLEA, 1996). Para que ocorra a dessorção eletroquímica, as superfícies recobertas são imersas em solução aquosa ou etanólica ($\text{pH} > 7$) (MUNAKATA et al., 2004). O potencial no qual ocorre a dessorção dos tióis depende de vários fatores, incluindo o tamanho da cadeia, o grau de organização da SAM, a força das interações intermoleculares no filme orgânico e a cristalinidade dos suportes (KAWAGUCHI et al., 2000). Um potencial típico de dessorção para alcanotióis encontrado na literatura é de $-1,0$ V (vs. Eletrodo de Calomelano Saturado - ECS), mas este valor pode variar em torno de $\pm 0,25$ V conforme se altera a estrutura da cadeia carbônica.

Neste trabalho, foi obtido curvas de dessorção redutiva do DTT ligado covalentemente ao suporte de Au (111). Como já descrito no trabalho de Creczynski-Pasa e colaboradores (2009), o eletrólito utilizado para tal processo é o NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pois em $\text{pH } 7,0$ a corrente de pico relacionada à redução do tiol parcialmente sobrepõe com a reação de evolução de hidrogênio (REH).

A curva de polarização catódica mostrada na Figura 21 (A) corresponde ao suporte de Au (111) limpo (ausência de SAMs de DTT) obtida em uma faixa de potencial de $-0,4$ a $-1,4$ V. É possível observar apenas em potenciais bem negativos, uma corrente catódica relacionada à reação de evolução de hidrogênio. Já na Figura 21 (B), observa-se a curva de polarização catódica de monocamada auto-organizada de DTT em Au (111), o qual corresponde à dessorção redutiva do DTT de acordo com a reação (Equação 8):



O potencial de pico catódico (E_p^c) obtido para a dessorção de DTT da superfície de Au (111) foi de aproximadamente $-0,93$ V. Este valor é similar ao valor de potencial encontrado por Creczynski-Pasa e colaboradores (2009). Além disso, integrando a corrente de pico obtém-se a densidade de carga (q) correspondente à quantidade de espécies quimiosorbidas. Levando em consideração a reação representada na equação 8, em que cada elétron é correspondente a um átomo de enxofre quimiosorbido, e a área real do suporte de Au (fator em torno de 1,10; foi possível obter um q de aproximadamente $72,6 \mu\text{C}\cdot\text{cm}^{-2}$). Este valor é consistente para uma superfície de cobertura $\theta \approx 1/3$, ou seja, uma

monocamada de tiol completa assumindo uma estrutura de $\sqrt{3} \times \sqrt{3} - R$ 30° na superfície de Au (111).

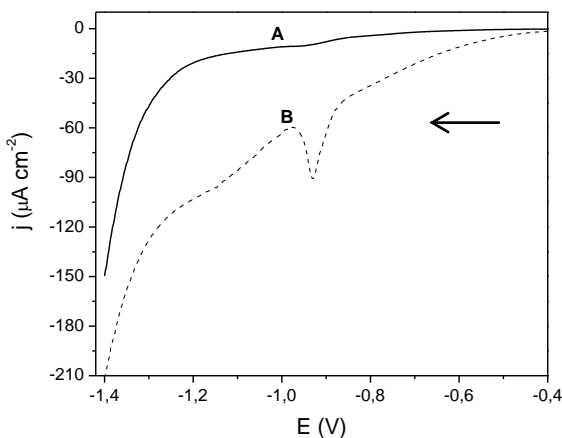


Figura 21 - Curvas de polarização catódica do Au (111) limpo (A) e do Au (111) imerso em uma solução de $50 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ DTT por 30 minutos a 60°C (B). As medidas foram feitas em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; velocidade de varredura $0,05 \text{ V s}^{-1}$.

5.1.3 Caracterização do sistema enzima-bicamadas lipídicas por AFM

As bicamadas lipídicas foram suportadas em ouro via SAMs de DTT, com ou sem a presença da peroxidase e as imagens foram adquiridas pelo modo contato. A obtenção de imagens pelo modo contato é menos recomendado para materiais delicados ou fracamente aderido na superfície do suporte sólido, uma vez que a ponta do AFM pode muitas vezes comprometer a amostra ou arrastá-la durante a varredura. Esta desvantagem do modo contato pode ser transposta pela aplicação de métodos intermitentes. Porém, estudos têm demonstrado que pelo ajuste da força de operação é possível utilizar o modo contato para obter imagens de materiais delicados tais como membranas lipídicas e sistemas coloidais (MUNFORD *et al.*, 2005).

A Figura 22 (A) mostra a imagem topográfica do AFM no modo contato obtida das bicamadas lipídicas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT. A Figura 22 (B) mostra o perfil da linha de varredura da bicamada na Figura 22 (A).

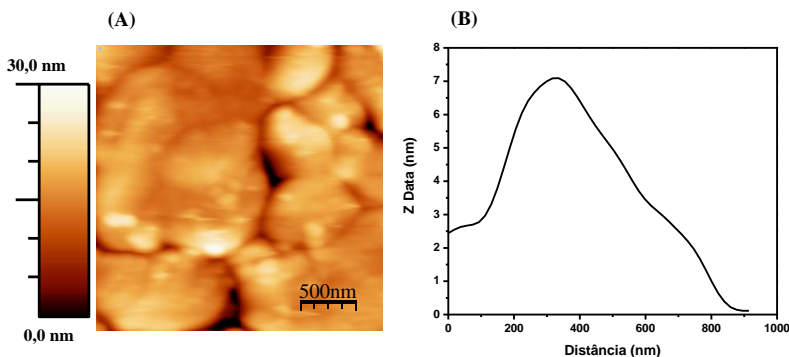


Figura 22 - Imagem topográfica do AFM no modo contato das bicamadas lipídicas de DMPC (10 mg mL^{-1}) suportadas em ouro via SAMs de DTT (A) e perfil da linha de varredura (B) mostra a altura das camadas formadas em (A). Tamanho da imagem: $2,5 \mu\text{m} \times 2,5 \mu\text{m}$.

É possível observar a formação das bicamadas lipídicas nos terraços monoatômicos do ouro com alturas aproximadas de $6 \pm 1 \text{ nm}$. Este valor está um pouco acima do esperado para uma bicamada de DMPC, que é de aproximadamente 5 nm , provavelmente devido à hidratação na interface DTT-DMPC. Entretanto, sugere-se que as bicamadas lipídicas foram formadas na superfície de ouro.

A Figura 23 (A) mostra a imagem topográfica do AFM no modo contato obtida da HRP imobilizada nas bicamadas lipídicas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT. A Figura 23 (B) mostra o perfil da linha de varredura camada de HRP formada sobre a bicamada lipídica na Figura 23 (A).

Os valores de alturas encontrados para este sistema foram de aproximadamente $10 \pm 2 \text{ nm}$. Este valor está acima do valor da altura de uma bicamada de DMPC e também foi possível observar que a superfície do ouro está completamente recoberta por uma camada densa. Pode-se dizer que ocorreu uma interação entre as moléculas da enzima e a bicamada lipídica, pois não foi possível observar somente as bicamadas lipídicas na superfície de ouro como na Figura 22. É possível observar também, que a distribuição da enzima na bicamada não é uniforme e protusões ocorrem na camada formada correspondendo provavelmente ao acúmulo de moléculas de HRP. Estas protusões não foram removidas com o enxágue do suporte de ouro com tampão HEPES $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e NaCl $0,9\% \text{ m/v}$ (pH 7,4), indicando que a HRP pode estar imobilizada na bicamada de DMPC.

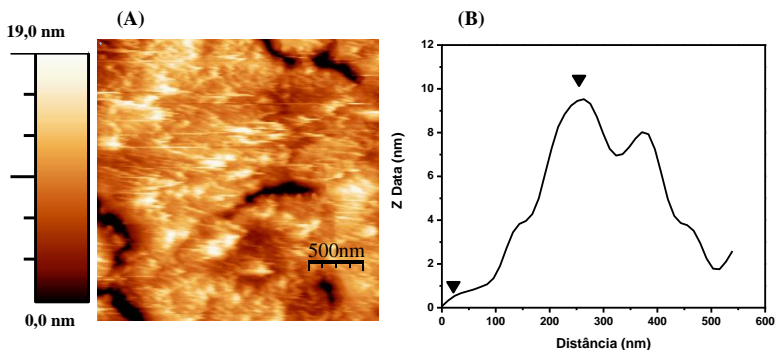


Figura 23 - Imagem topográfica do AFM no modo contato da HRP ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) imobilizada nas bicamadas lipídicas suportadas em ouro via SAMs de DTT (A) e perfil da linha de varredura (B) mostra a altura das camadas formadas em (A). Tamanho da imagem: $2,5 \text{ }\mu\text{m} \times 2,5 \text{ }\mu\text{m}$.

Estruturas similares foram observadas no trabalho de Tang e colaboradores (2002), em que o comportamento eletroquímico e a mudança conformacional da HRP em bicamadas de DMPC suportadas diretamente no eletrodo de carbono vítreo foram estudados. Estes autores sugerem que a HRP se adsorveu espontaneamente nas bicamadas de DMPC e se distribuíram de forma randômica nas bicamadas, mudando drasticamente a sua estrutura. Este fato indica que ocorreu uma forte interação entre a enzima e a bicamada fosfolipídica.

Existem poucos trabalhos na literatura que se dedicam ao estudo da interação entre a HRP e bicamadas lipídicas (SCHMIDT *et al.*, 2008). Apesar de esta enzima não ser propriamente uma proteína de membrana, nano estruturas proteo-lipídicas podem ser obtidas para o estudo da química de proteína redox, além de poder ser aplicadas na construção de biossensores.

5.1.4 Estudos eletroquímicos do sistema HRP-bicamadas lipídicas: otimização e aplicação

Para complementar as informações obtidas das imagens do AFM, estudos eletroquímicos foram realizados com o sistema HRP-bicamadas lipídicas para a determinação de dopamina. O que se encontra na literatura é a aplicação da HRP imobilizada em bicamadas lipídicas com diferentes composições utilizando outros suportes sólidos para a determinação de peróxido de hidrogênio (WU *et al.*, 2001; TANG

et al., 2002; HUANG *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2006; WANG *et al.*; 2008).

Apesar de não ter nenhum trabalho na literatura que utiliza o sistema HRP - bicamadas de DMPC para a determinação de dopamina, o nosso estudo visou verificar esta possível aplicação.

O desempenho analítico do sistema HRP-bicamadas DMPC foi avaliado pela resposta voltamétrica obtida em função da concentração de HRP no processo de imobilização, enquanto as concentrações dos outros componentes da solução permaneceram constantes. A Figura 24 mostra o efeito da concentração da HRP sobre a corrente resultante, em presença de peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e dopamina $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

É possível constatar que não houve aumento significativo na resposta, com a concentração da HRP maior que $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, e, portanto, esta foi a concentração selecionada para os outros experimentos.

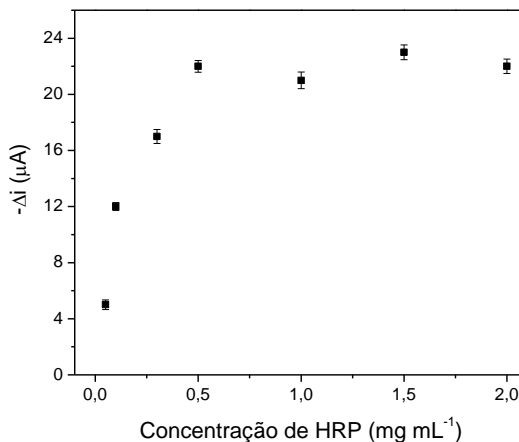


Figura 24 - Efeito da quantidade de HRP na resposta voltamétrica do sistema HRP-bicamadas DMPC em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de dopamina $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

As propriedades eletroquímicas da HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC, das bicamadas de DMPC suportadas em Au (111) via SAMs de DTT e Au (111) puro foram investigadas pelo método da voltametria cíclica na presença de peróxido de hidrogênio e dopamina,

conforme mostrado na Figura 25. O voltamograma cíclico do Au (111) puro (a) mostra um pico catódico e um pico anódico em aproximadamente +200 mV. Este par de picos corresponde ao processo de oxirredução da dopamina em solução tampão pH 6,5. Porém, o maior valor de picos anódico e catódico foi obtido pelo eletrodo (c), no qual a HRP está imobilizada nas bicamadas de DMPC (10 mg mL⁻¹) suportadas em ouro via SAMs de DTT. Estes resultados eram esperados uma vez que a peroxidase catalisa a oxidação da dopamina em *o*-dopaquinona na presença de peróxido de hidrogênio e, a *o*-dopaquinona produzida é eletroquimicamente reduzida à dopamina na superfície do eletrodo em um potencial de +150 mV, gerando correntes que são diretamente proporcionais às concentrações de dopamina.

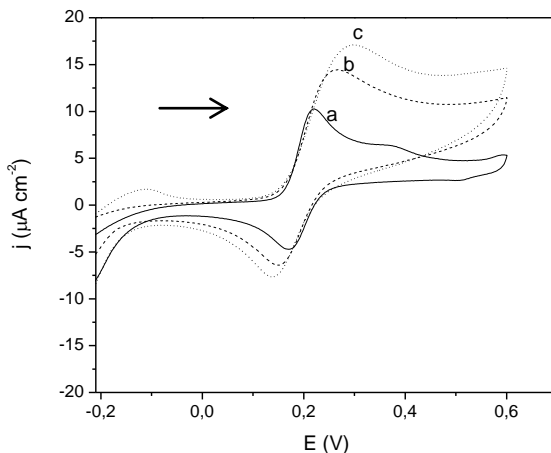


Figura 25 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando como eletrodos de trabalho: (a) suporte de ouro puro; (b) bicamadas de DMPC (10 mg mL⁻¹) suportadas em ouro via SAMs de DTT; (c) HRP (0,5 mg mL⁻¹) imobilizada nas bicamadas de DMPC (10 mg mL⁻¹) suportadas em ouro via SAMs de DTT. As medidas foram realizadas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e dopamina $1,6 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Para otimizar o biossensor proposto para a determinação de dopamina foram realizados experimentos utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. Os valores de frequência e amplitude utilizados nestes ensaios foram 30 Hz e 50 mV, respectivamente. Estes valores não foram otimizados pela SWV, pois conforme descrito na literatura, já foi observado que utilizando a HRP para a determinação de

dopamina, a resposta aumenta conforme o potencial é alterado para valores mais positivos, e alcança um máximo de intensidade de corrente em 50 mV (*vs.* Ag/AgCl). Isto ocorre, pois em potenciais mais negativos pode ocorrer a formação de uma forma inativa da HRP, pela redução do estado de (III) para (II) de ferro presente no sítio ativo da enzima (SANTOS *et al.*, 2007). Acima do potencial de 50 mV, a corrente diminui consideravelmente, pois pode ocorrer certa dificuldade de redução das espécies quinona.

A influência do pH na resposta voltamétrica do biossensor para dopamina foi examinada na faixa de pH entre 6,0 e 8,0 e os resultados estão apresentados na Figura 26.

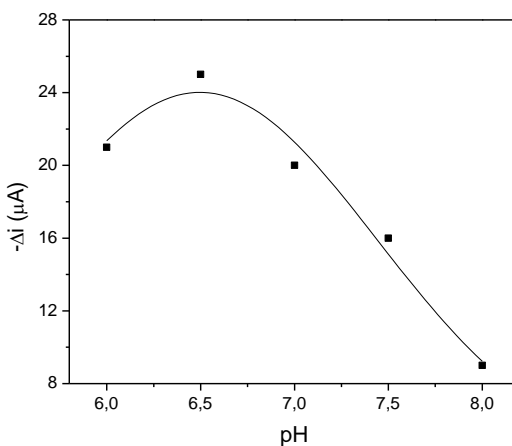


Figura 26 - Dependência do pH sobre a resposta analítica do sistema HRP-bicamadas de DMPC em peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e dopamina $1,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; 50 mV e 30 Hz.

Observa-se o aumento da corrente de redução com o aumento do pH até adquirir um valor máximo em pH igual a 6,5. A partir desta condição, a corrente diminui novamente. Por conseguinte, um pH de 6,5 foi adotado para os estudos posteriores e está condizente com os valores ótimos de pH para outros biossensores a base de HRP encontrados na literatura.

A Figura 27 mostra os voltamogramas obtidos da corrente resultante da oxirredução da dopamina na superfície do eletrodo contendo a HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC suportadas em Au (111) via SAMs de DTT. O sensor apresentou uma resposta linear às

diferentes concentrações de dopamina numa faixa de $3,3 \times 10^{-5}$ a $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ com $r = 0,9997$ (Figura 28), com limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. A equação de regressão obtida foi $\Delta i = 15,7 + 7,15 \times 10^5 [\text{dopamina}]$, sendo Δi o pico de corrente resultante (μA) e $[\text{dopamina}]$ a concentração de dopamina (mol L^{-1}).

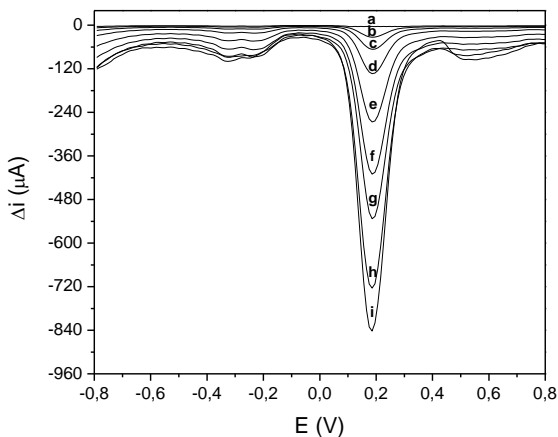


Figura 27 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando como eletrodo de trabalho a HRP ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) imobilizada nas bicamadas de DMPC (10 mg mL^{-1}) suportadas em ouro via SAMs de DTT (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de dopamina nas seguintes concentrações: (b) $3,3 \times 10^{-5}$; (c) $8,4 \times 10^{-5}$; (d) $1,6 \times 10^{-4}$; (e) $2,5 \times 10^{-4}$; (f) $3,3 \times 10^{-4}$; (g) $6,6 \times 10^{-4}$; (h) $9,8 \times 10^{-4}$; (i) $1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 50 mV, frequência de 30Hz e incremento de 2,0 mV.

A faixa de concentração encontrada para a determinação de dopamina padrão mostra a boa eficiência do sensor e os valores foram similares a faixa de concentração de dopamina obtida no sistema HRP-nanopartículas PU-PEG.

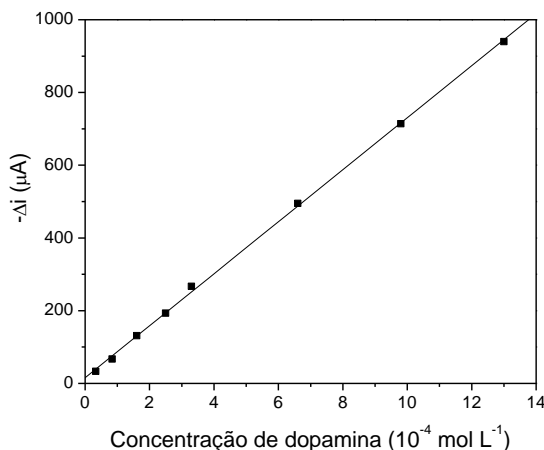


Figura 28 - Curva analítica do eletrodo de trabalho contendo HRP imobilizada nas bicamadas de DMPC suportadas em ouro via SAMs de DTT para a determinação de dopamina.

Embora possam ser encontrados na literatura muitos biossensores construídos a partir de eletrodos modificados com diferentes tipos de SAMs, bicamadas lipídicas e enzimas imobilizadas, o sistema desenvolvido neste estudo não apresentou uma boa estabilidade para a determinação de dopamina em produtos farmacêuticos. Sabe-se que o método escolhido para a imobilização do elemento de reconhecimento interfere em parâmetros de desempenho do biossensor, tais como sensibilidade, seletividade e, principalmente estabilidade, que nos biossensores em geral, pode ser um problema. Ao mesmo tempo em que manter a enzima ativa depois de imobilizada no eletrodo é crucial, o método de imobilização também influencia neste aspecto.

Analisando os dados obtidos, pode-se concluir que a HRP foi imobilizada com sucesso nas bicamadas de DMPC suportadas em SAMs de DTT em Au (111). No entanto, não foi possível realizar estudos de repetibilidade e reprodutibilidade do sistema desenvolvido, pois os eletrodos construídos não apresentaram estabilidade adequada no período de 60 dias, tempo em que os experimentos foram realizados. Supõe-se que a HRP, por não ser uma proteína de membrana, foi adsorvida na superfície das bicamadas de DMPC através de fracas interações e pode ter sido lixiviada para o meio reacional com o passar do tempo. Outra sugestão seria que as bicamadas de DMPC suportadas

em Au (111) via SAMs de DTT tenham perdido a sua estabilidade mecânica com o passar do tempo, impossibilitando as medidas eletroquímicas.

No intuito de buscar uma alternativa às bicamadas lipídicas para imobilizar a proteína e obter um sensor mais estável, optou-se na utilização de nanopartículas poliméricas cujas vantagens serão mostradas a seguir.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG POR AFM EM DIFERENTES SUPORTES SÓLIDOS

Primeiramente as nanopartículas de PU-PEG foram caracterizadas por microscopia de força atômica. Para esta caracterização as nanopartículas foram depositadas em mica muscovita, silício hidrofílico e silício hidrofóbico para avaliar o mais adequado suporte sólido para medidas de tamanho e formato por AFM. As imagens topográficas do AFM no modo contato dos diferentes suportes antes da deposição das nanopartículas estão apresentadas na Figura 29.

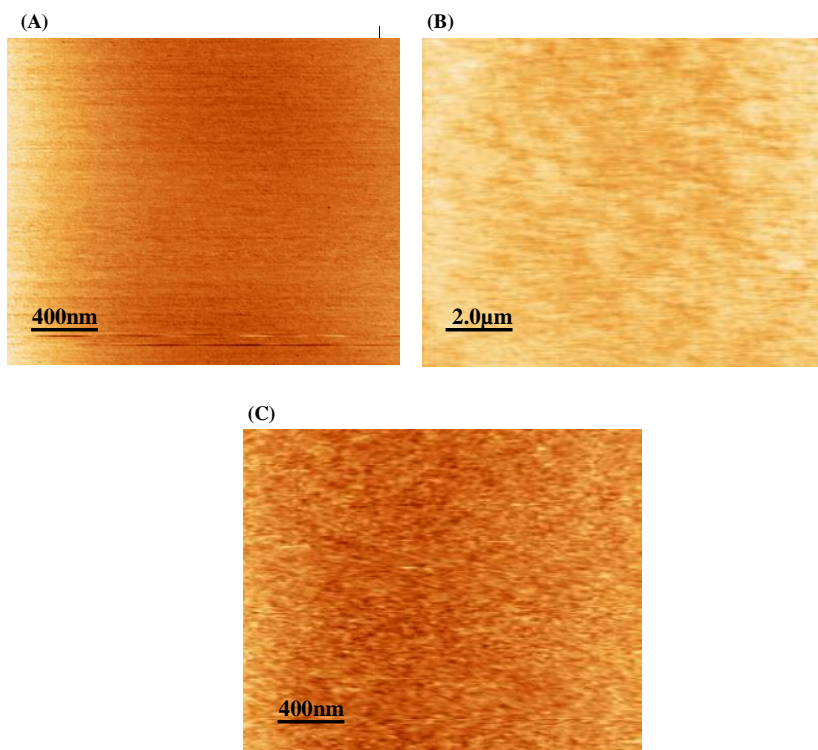


Figura 29 - Imagens topográficas do AFM no modo contato dos suportes sólidos utilizados: mica (A), silício hidrofílico (B), e silício hidrofóbico (C).

A Figura 30 mostra as imagens topográficas do AFM no modo contato obtidas das nanopartículas de PU-PEG depositadas em mica.

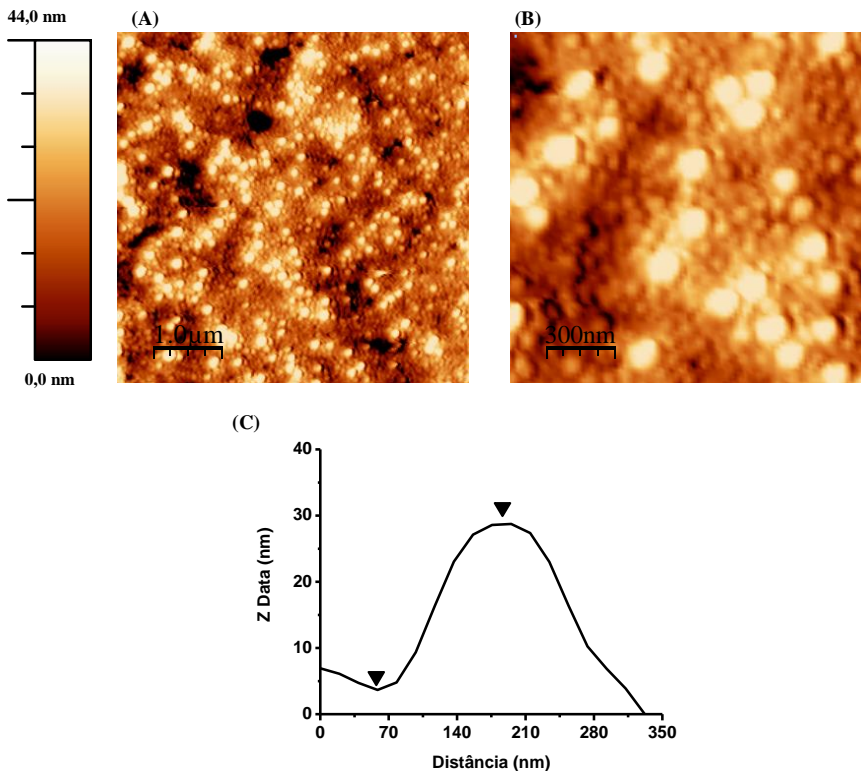


Figura 30 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG (1 mg mL^{-1}) depositadas em mica em uma faixa de varredura de $5 \text{ }\mu\text{m}$ (A); $1,5 \text{ }\mu\text{m}$ (B); e perfil da linha de varredura (C) da nanopartícula indicada em (B).

A Figura 30 (B) mostra a magnificação de uma área específica da Figura 30 (A), e a Figura 30 (C) o perfil da linha de varredura da nanopartícula indicada na Figura 30 (B). É possível observar duas populações distintas de nanopartículas, em relação ao tamanho. A população das partículas maiores pode ser claramente observada como objetos redondos com diâmetros de $180 \pm 28 \text{ nm}$ e alturas de $43 \pm 11 \text{ nm}$. Neste estudo foi também determinado o diâmetro e a altura de algumas nanopartículas ($n=15$) da população de tamanho menor. Os

valores de diâmetros obtidos foram de 73 ± 15 nm e de alturas de 15 ± 4 nm.

No trabalho de Zanetti-Ramos e colaboradores (2006), as medidas destas mesmas nanopartículas pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) mostraram uma distribuição monodispersa de tamanho, com um valor médio de diâmetro de 262 nm e um valor de 0,39 para o índice de polidispersidade, ao contrário da variabilidade encontrada no diâmetro destas nanopartículas pelas imagens do AFM. Esta aparente inconsistência pode ser justificada pelo alto valor do índice de polidispersidade obtido com DLS, uma técnica em que as partículas maiores espalham a maioria da luz incidente, e, portanto, a distribuição de intensidade obtida pode ser atribuída às partículas maiores mesmo que existam partículas menores em solução. Sabe-se que a comparação entre as técnicas de DLS e AFM é somente aceitável quando valores do índice de polidispersidade são menores do que 0,1 (MARTINEZ *et al.*, 2005).

A diferença entre os valores obtidos do diâmetro e altura das nanopartículas pode ser devida às cargas presentes na superfície da mica muscovita (aluminossilicato de potássio) as quais podem interagir com a parte hidrofílica das nanopartículas de poliuretano (cadeias de PEG) deformando o formato esférico das mesmas. Entretanto, no nosso estudo pode-se observar que os valores de altura obtidos foram muito baixos, uma vez que foi possível verificar que as nanopartículas mantiveram seu volume após o depósito na superfície do suporte sólido. Os baixos valores encontrados podem ser explicados pelo fato de que a ponta do AFM não penetra inteiramente no meio onde as nanopartículas estão depositadas, como pode ser visto na Figura 30, resultando em valor de altura subestimado.

As análises das imagens de AFM indicaram que estas nanopartículas possuem uma razão de diâmetro/altura (d/a) em torno de 4 (Tabela 1). Tal comportamento tem sido anteriormente observado por Montasser e colaboradores (2001) que estudaram nanopartículas de poliamida depositadas em mica muscovita clivada. Estes autores postularam a natureza estrutural de sistemas nano usando as análises obtidas das imagens de AFM. Conforme este estudo, se o valor do diâmetro for quase igual ao valor da altura ou se a razão d/a for ≤ 4 , as nanopartículas podem ser denominadas nanoestruturas sólidas. Entretanto, se o sistema for baseado em uma matriz contínua, o compartimento onde o líquido está encapsulado pela membrana polimérica pode colapsar, e a partícula achatará a uma altura de quase o dobro da espessura da parede polimérica. Baseando-se nestes fatos

pode-se dizer que as nanopartículas de PU-PEG são nanoestruturas sólidas e que as paredes duras do poliuretano podem ter sofrido uma pequena deformação quando depositadas em mica. Entretanto, a razão d/a obtida para as nanopartículas depositadas em mica foi superestimada pelo fato da ponta do AFM seguir somente o perfil da parte exposta das nanopartículas.

A Figura 31 mostra as imagens topográficas do AFM no modo contato obtidas das nanopartículas de PU-PEG depositadas em silício hidrofílico.

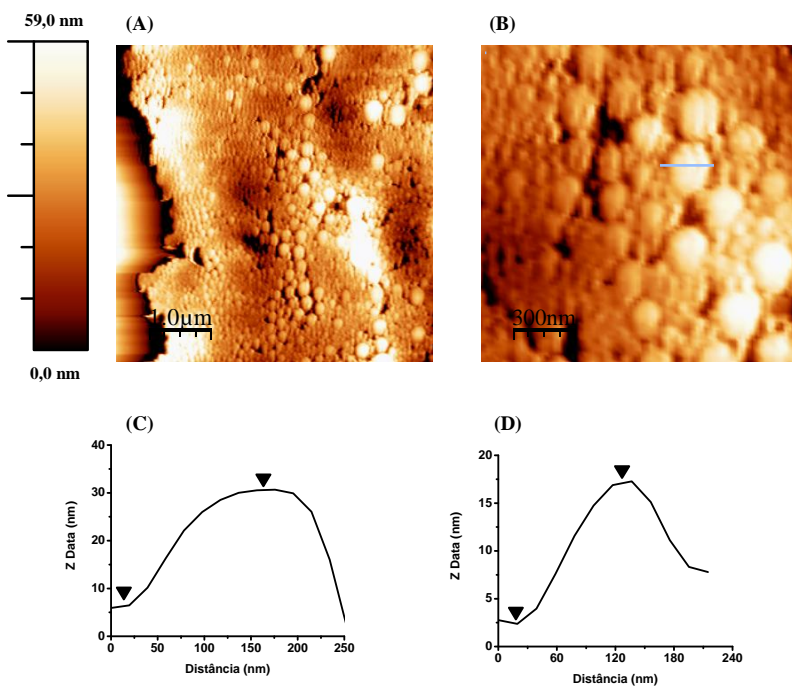


Figura 31 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG (1 mg mL^{-1}) depositadas em silício hidrofílico em uma faixa de varredura de $5 \mu\text{m}$ (A); $1,5 \mu\text{m}$ (B); e perfis da linha de varredura (C) e (D) das nanopartículas indicadas em (B).

A Figura 31 (B) mostra a magnificação de uma área específica da Figura 31 (A), e a Figura 31 (C) e (D) os perfis da linha de varredura das nanopartículas indicadas na Figura 31 (B).

Foram observadas duas populações distintas de nanopartículas com o formato esférico achatado com diâmetros de 218 ± 36 nm e 127 ± 26 nm, e alturas de 32 ± 7 nm e 19 ± 5 nm, respectivamente. Pelas análises das imagens do AFM, o valor do diâmetro das nanopartículas encontrado foi maior do que o valor da altura, com uma razão d/a de aproximadamente 6 para ambas as populações (Tabela 1).

Novamente é importante destacar que a ponta do AFM não penetra no meio onde as partículas estão depositadas. Apesar da razão d/a ser maior do que 4 (o qual sugere ser o limite para considerar as nanopartículas como nanoestruturas sólidas) ainda pode-se dizer que as nanopartículas de PU-PEG são nanoestruturas sólidas. Neste caso, as nanopartículas estão mais achatadas e melhor distribuídas em silício hidrofílico do que em mica muscovita. Uma vez que a suspensão polimérica tinha a mesma concentração em ambos os casos, o maior valor de diâmetro encontrado pode ser explicado pelo fato da superfície do silício hidrofílico ser mais carregada do que a superfície da mica muscovita, ou seja, a interação nanopartícula-suporte seria mais forte, resultando em nanopartículas mais achatadas e, conseqüentemente, aumentando a razão d/a.

A Figura 32 mostra as imagens topográficas do AFM das nanopartículas de PU-PEG depositadas em silício hidrofóbico. A Figura 32 (B) mostra a magnificação de uma área específica da Figura 32 (A), e a Figura 32 (C) mostra o perfil da linha de varredura da nanopartícula indicada na Figura 32 (B).

Neste caso, as nanopartículas de PU-PEG não cobrem uniformemente a superfície do suporte, resultando em um acúmulo das nanopartículas. Na superfície destes aglomerados, um número reduzido de nanopartículas é adequado para medidas de tamanho. Os valores obtidos de diâmetro foram de 363 ± 76 nm e altura de 120 ± 37 nm, para a população de nanopartículas grandes e, diâmetro de 115 ± 36 nm e altura de 32 ± 13 nm, para a população pequena (Tabela 1). Foi possível observar que a superfície do silício hidrofóbico repeliu a suspensão das nanopartículas de PU-PEG e que o material depositado teve pouca aderência. Não foi possível obter a razão d/a para este sistema uma vez que a maioria das nanopartículas estava aglomerada e isto poderia resultar em dados não confiáveis.

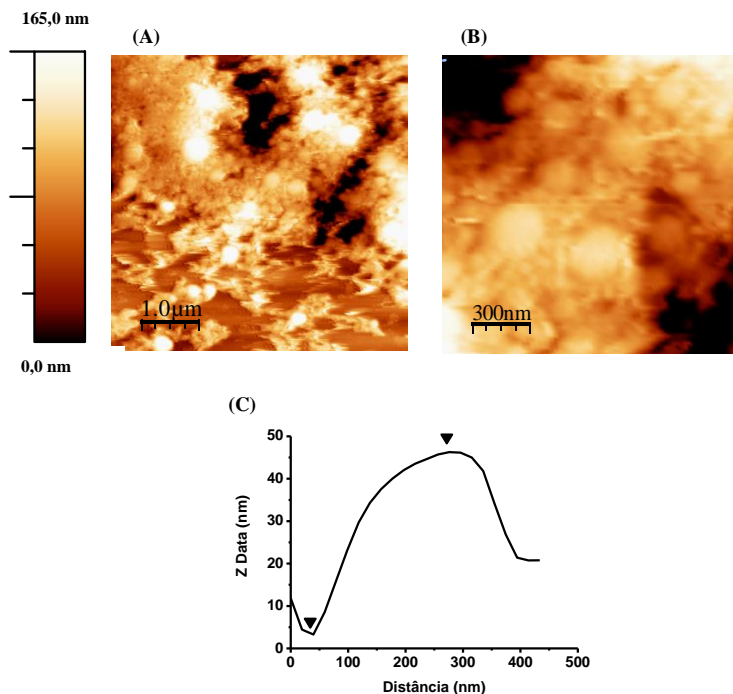


Figura 32 - Imagens topográficas do AFM no modo contato das nanopartículas de PU-PEG (1 mg mL^{-1}) depositadas em silício hidrofóbico em uma faixa de varredura de $5 \text{ }\mu\text{m}$ (A); $1,5 \text{ }\mu\text{m}$ (B); e perfil da linha de varredura (C) da nanopartícula indicada em (B).

A Tabela 1 resume os dados obtidos das imagens topográficas do AFM (Figuras 30, 31 e 32), em que os valores de diâmetro, altura e razão d/a das nanopartículas de PU-PEG depositadas em mica muscovita, silício hidrofílico e silício hidrofóbico são comparados.

Além da interação das nanopartículas em diferentes suportes sólidos, também se deve considerar se a preparação das amostras tem alguma influência nas medidas de tamanho e formato das nanopartículas. A preparação das amostras para o AFM foi realizada pela deposição de uma suspensão de nanopartículas nos suportes sólidos, seguido pelo processo de secagem no ar à temperatura ambiente, enquanto os experimentos de DLS foram realizados em solução aquosa (ZANETTI-RAMOS *et al.*, 2006). Por esta razão, neste

estudo pode-se sugerir que existe uma influência na etapa de secagem da amostra no processo de deposição das mesmas no suporte sólido, para conseqüentemente determinar o tamanho e formato das nanopartículas. Os valores de diâmetro obtidos por AFM foram um pouco menores do que os valores encontrados nos experimentos de DLS, especialmente para as nanopartículas de poliuretano peguadas depositadas em mica muscovita e silício hidrofílico. Esta diferença pode ter sido originada pela presença de solvente no caso dos experimentos de DLS, induzindo ao intumescimento das nanopartículas. Sugere-se que para resolver esta questão deve-se trabalhar com concentrações extremamente baixas de suspensões de nanopartículas na ordem de se obter valores de diâmetro e altura de nanopartículas isoladas no suporte sólido. No presente estudo, as nanopartículas de PU-PEG foram depositadas muito próximas umas das outras de forma que a ponta do AFM não penetrou inteiramente no meio onde as mesmas estavam depositadas, resultando em valores subestimados de altura.

Tabela 1 - Valores comparativos de diâmetro e altura das nanopartículas de PU-PEG depositadas em diferentes suportes sólidos. Os dados apresentados foram gerados pela análise das imagens topográficas do AFM.

	Diâmetro (nm)	Altura (nm)	Razão d/a
Mica muscovita			
População maior ^a	180 ± 28	43 ± 11	~ 4
População menor ^b	73 ± 15	15 ± 4	~ 4
Silício hidrofílico			
População maior ^a	218 ± 36	32 ± 7	~ 6
População menor ^b	127 ± 26	19 ± 5	~ 6
Silício hidrofóbico			
População maior ^a	363 ± 76	120 ± 37	-
População menor ^b	115 ± 36	32 ± 13	-

^a n = 50; ^b n = 15

Não existem trabalhos relacionados na literatura que utilizam a técnica do AFM para caracterizar especificamente nanopartículas de poliuretano. Entretanto, a utilização do AFM para este fim teve como vantagem a identificação de populações de nanopartículas de diferentes tamanhos, e o fato de serem nanoestruturas sólidas as tornam excelentes candidatas para a imobilização de enzimas em suas superfícies. Além disso, foi possível verificar que a natureza do suporte sólido possui um papel muito importante no recobrimento da superfície. Os dados obtidos

neste estudo sugerem que a mica e o silício hidrofílico são os suportes sólidos mais apropriados para a obtenção das imagens de AFM das nanopartículas de PU-PEG, uma vez que são suportes hidrofílicos e a interação com a superfície das nanopartículas peguadas é favorável.

5.3 ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE EXTRAÍDA DE TECIDO VEGETAL EM NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG

5.3.1 Fonte de peroxidase, atividade catalítica e estabilidade

A peroxidase presente em vários vegetais tem sido investigada com sucesso e utilizada no desenvolvimento de diferentes tipos de eletrodos (CARUSO et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006). Neste trabalho, diferentes vegetais foram investigados e a atividade enzimática (U mL^{-1}), proteína total (mg mL^{-1}) e atividade específica (U mg^{-1} proteína) foram determinadas utilizando-se os homogenatos, e os resultados estão mostrados na Tabela 2. Como pode ser observado, o homogenato do caqui (*Diospyros kaki* L.) apresentou a menor atividade específica enquanto o pinhão (*Araucaria Angustifolia*) apresentou o maior valor.

Tabela 2 - Valores de atividade enzimática, proteína total e atividade específica obtidas de diferentes vegetais.

Vegetais	Atividade enzimática (U mL^{-1})	Proteína total (mg mL^{-1})	Atividade específica (U mg^{-1} proteína)
Caqui (<i>Diospyros kaki</i> L.)	24,05	0,187	128
Carambola (<i>Averrhoa carambola</i> L.)	72,15	0,138	522
Inhame (<i>Dioscorea sp.</i>)	794	0,475	1671
Açafrão (<i>Crocus sativus</i> L.)	1010	1,033	977
Batata yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	1766	0,391	4516
Ervilha (<i>Pisum sativum</i> L.)	2428	0,345	7037
Pinhão (<i>Araucaria angustifolia</i>)	3246	0,350	9274

O pinhão, semente da araucária (*Araucaria angustifolia*), é rico em peroxidase e a enzima desta planta ainda não se encontra disponível comercialmente. Neste estudo, o homogenato do pinhão foi usado como

fonte de peroxidase e imobilizado em nanopartículas de PU-PEG. O valor de atividade obtido do pinhão foi similar aos valores de atividade obtidos de outros vegetais utilizados para a construção de biossensores (OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No intuito de manter a estabilidade da enzima, foi investigada a influência de aditivos na atividade da peroxidase extraída do pinhão durante 35 dias. Foram utilizados como aditivos os osmólitos, sacarose e glicerol; e os polímeros PEG, PVP e PCP. Os homogenatos contendo aditivos foram mantidos a 4 °C. A atividade foi medida periodicamente e os valores da atividade ($U\ mL^{-1}$) da peroxidase estão mostrados na Figura 33.

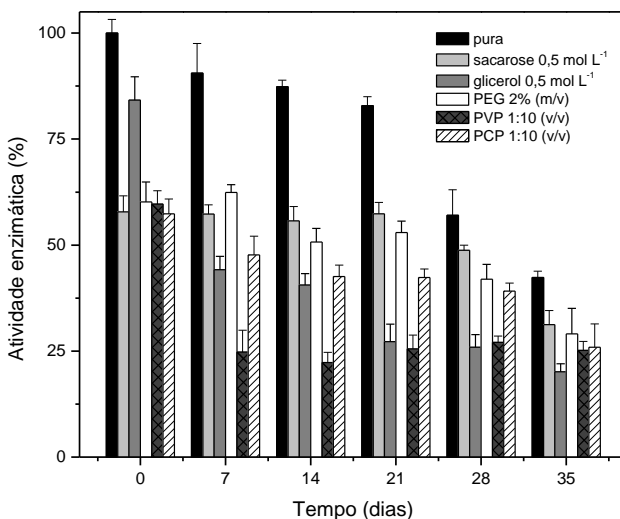


Figura 33 - Estudo da influência de aditivos na atividade da peroxidase extraída do pinhão.

No período de 21 dias de estocagem dos extratos de pinhão, não foram observadas mudanças significativas na atividade da enzima pura extraída somente com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Entretanto, as amostras de peroxidase extraída com os aditivos poliméricos PEG, PVP e PCP em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) apresentaram menor atividade, sendo que a amostra contendo PVP apresentou uma maior variação de atividade se comparado o primeiro dia de extração com os demais dias. A adição dos osmólitos sacarose 0,5 mol L⁻¹ e glicerol 0,5

mol L⁻¹ também provocaram uma diminuição da atividade enzimática, sendo que no final do período de análises (35 dias), a atividade da amostra contendo sacarose se aproxima do valor da atividade apresentada pelo extrato de pinhão puro.

Como pode ser observado na Figura 33, o homogenato obtido sem aditivos, ou seja, a peroxidase extraída do pinhão somente com tampão fosfato pH 7,0 apresentou maior atividade em todo o período investigado. Diversos trabalhos descrevem um melhoramento significativo na atividade e estabilidade de enzimas, quando o procedimento de extração é realizado em presença de aditivos (SOARES *et al.*, 2003; MACIEL *et al.*, 2006). Entretanto, o contato do aditivo com a enzima também pode apresentar comportamento antagonico, isto é, a interação pode apresentar um efeito negativo na reação de interesse. Nem todos os aditivos são eficientes como estabilizantes e a influência do aditivo na atividade enzimática ainda não está totalmente esclarecida. A seleção de possíveis aditivos protetores da atividade enzimática depende do tipo de enzima.

No caso de enzimas que exigem uma interface para sua total atividade catalítica, o uso de aditivos macromoleculares tem mostrado efeitos estabilizantes significativos, pois estes revestem a interface e impedem, desta forma, uma mudança da estrutura protéica. Outro parâmetro que também interfere na eficiência de um determinado aditivo é a forma de adição do mesmo no procedimento de extração enzimática, ou seja, em que etapa esta adição é mais indicada e qual a massa de aditivo necessária para promover uma estabilização satisfatória. Tem sido sugerido na literatura que a adição de aditivos seja efetuada antes da extração da enzima ou simultaneamente com a enzima. Neste trabalho os aditivos foram adicionados ao tampão antes da extração enzimática, uma vez que a adição de aditivos depois de a enzima ter sido extraída pode não apresentar efeito benéfico. Quanto à massa de aditivo, recomenda-se uma avaliação experimental em função do tipo de aditivo usado, tendo em vista que o efeito do aditivo depende de sua massa molecular (SOARES *et al.*, 2003).

Portanto, por não observar uma diferença significativa na atividade da enzima extraída empregando somente tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) comparados aos resultados obtidos usando tampão fosfato com diferentes aditivos, optou-se em não empregar aditivos na extração da peroxidase do homogenato do pinhão.

A estabilidade da peroxidase extraída do pinhão com tampão fosfato foi investigada e foi possível observar que a atividade específica

da peroxidase livre se manteve constante durante 21 dias e depois de um período de 60 dias, a atividade da enzima reduziu em apenas 30%.

5.3.2 Imobilização da peroxidase extraída do pinhão em nanopartículas de PU-PEG

A atividade catalítica de uma enzima é dependente dos reagentes e do material suporte utilizado para a sua imobilização. Neste estudo, a imobilização da enzima foi realizada em pH 6,5; pH ótimo para a peroxidase (SILVA *et al.*, 2007). Sob tais condições as nanopartículas de poliuretano estão negativamente carregadas, como evidenciado pelo valor do potencial zeta de $-22,1 \pm 0,1$ mV em pH 6,9 obtido no trabalho de Zanetti-Ramos e colaboradores (2008). O ponto isoelétrico da peroxidase é de 7,2 (SCHMIDT *et al.*, 2008) e portanto, em pH 6,5, as moléculas desta enzima possuem uma rede de carga positiva. Por esta razão, a peroxidase pode estar fisicamente adsorvida na superfície das nanopartículas de PU-PEG.

Além disso, como já foi mencionado anteriormente, as cadeias de poli (etilenoglicol) (PEG) conferem uma superfície hidrofílica para as nanopartículas de poliuretano. Sabe-se que um alto nível de hidratação na superfície do material suporte possui um papel muito importante na preservação da conformação da enzima quando a mesma encontra-se adsorvida.

Lei e Bi (2007) observaram este comportamento para a pectinase imobilizada em partículas coloidais do copolímero poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA). Os grupos funcionais carboxila na superfície das partículas proporcionaram uma melhora nas estabilidades térmica e de armazenamento da pectinase imobilizada. De forma similar, Takahashi e colaboradores (2000) observaram que as moléculas de HRP não reduziram a sua atividade enzimática quando estas foram confinadas em partículas de sílica mesoporosa, as quais possuem uma superfície altamente hidrofílica.

Neste trabalho foi construído um eletrodo de pasta de carbono modificado com a peroxidase extraída do pinhão imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina em produtos farmacêuticos. A representação esquemática do biossensor proposto e o processo eletroquímico envolvido para a determinação de dopamina está sendo mostrada na Figura 34. Como pode ser observado, a peroxidase catalisa a oxidação da dopamina em *o*-dopaquinona na presença de peróxido de hidrogênio e, a *o*-dopaquinona produzida é eletroquimicamente reduzida à dopamina na superfície do eletrodo,

gerando correntes que são diretamente proporcionais às concentrações de dopamina. Este processo foi observado nos voltamogramas cíclicos e de onda-quadrada mostrados nas próximas seções.

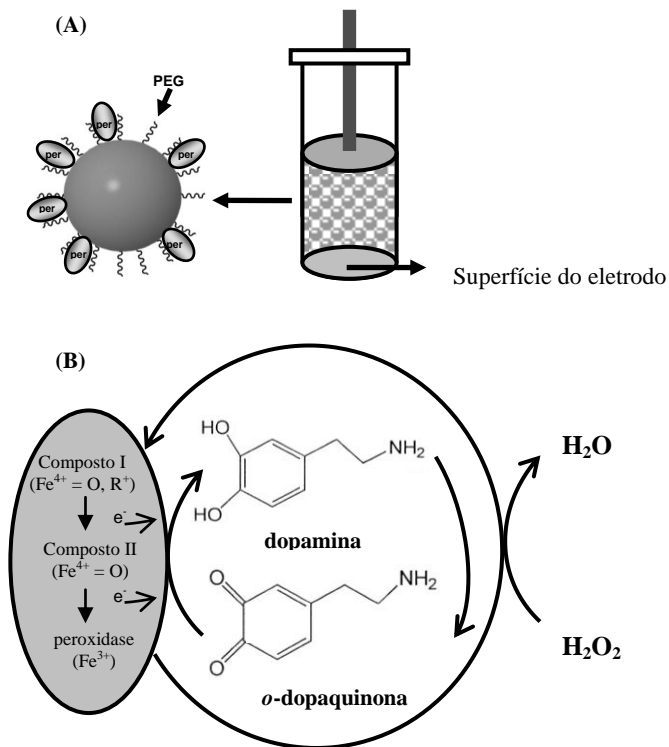


Figura 34 - Representação esquemática da imobilização da peroxidase extraída do pinhão (PER) nas nanopartículas de PU-PEG (A), e do processo enzimático com a dopamina na presença de peróxido de hidrogênio (B).

5.3.3 Otimização e estudo da eficiência do biossensor proposto

Para avaliar o desempenho do eletrodo de pasta de carbono modificado com peroxidase imobilizada em nanopartículas de PU-PEG, alguns parâmetros foram otimizados tais como concentração da enzima, pH, frequência e amplitude pela técnica SWV. Os melhores valores obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Otimização das variáveis experimentais.

Parâmetros	Faixa estudada	Melhor valor
Concentração da peroxidase ^a	100 - 2000	500
Concentração da peroxidase ^b	0,5 - 10	2,5
pH	6,0 - 8,0	6,5
Frequência (Hz)	10 - 100	60
Amplitude (mV)	10 - 100	80

^a U mL⁻¹; ^b U mg⁻¹ pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase imobilizada em nanopartículas de PU-PEG (2,5 U mg⁻¹ pasta de carbono) mostrou o melhor desempenho (Tabela 3) e foi utilizado para a determinação de dopamina em produtos farmacêuticos.

A eficiência da imobilização da peroxidase em nanopartículas de PU-PEG foi avaliada utilizando quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase; (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG (2,5 U mg⁻¹ pasta de carbono). A Figura 35 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para estes quatro eletrodos. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em uma faixa de potencial de -0,2 V a +0,5 V vs eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) para uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹.

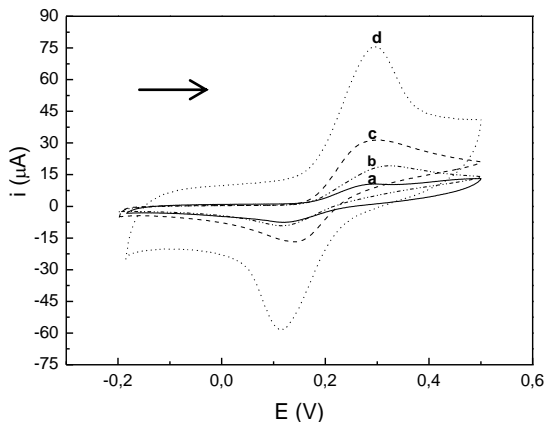


Figura 35 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase; (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo 500 unidades de peroxidase imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG ($2,5 \text{ U mg}^{-1}$ pasta de carbono). As medidas foram realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e dopamina $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Como pode ser observado, aplicando-se o potencial no sentido de $-0,2$ para $+0,5 \text{ V}$ observa-se um pico de oxidação da dopamina para *o*-dopaquinona e a redução eletroquímica da *o*-dopaquinona gerando novamente a dopamina aplicando o potencial no sentido contrário. O eletrodo (a) mostrou o menor sinal analítico (corrente catódica e anódica). A maior resposta foi observada no eletrodo (d), o qual resultou em um bom desempenho deste biossensor. Além disso, o eletrodo (b) contendo somente peroxidase na pasta de carbono mostrou menor resposta do que o eletrodo (d), que continha peroxidase imobilizada em nanopartículas de PU-PEG na pasta de carbono. Estes resultados eram esperados uma vez que a imobilização da enzima em um suporte polimérico melhora a sua atividade e estabilidade (LEI & BI, 2007; SILVA *et al.*, 2007).

5.3.4 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica

Os voltamogramas de onda quadrada do biossensor de pasta de carbono contendo peroxidase extraída do pinhão imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foram obtidos no intervalo de potencial de

+0,6 a -0,6 V, com sucessivas adições de dopamina e em condições previamente otimizadas (Tabela 3). A Figura 36 mostra os voltamogramas obtidos da corrente resultante, ou seja, o somatório em módulo do processo de oxirredução da dopamina usando o biossensor proposto.

A curva analítica obtida (Figura 37) apresentou uma faixa linear de $9,9 \times 10^{-5}$ a $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9995$) e a equação de regressão obtida foi $\Delta i = 7,3 + 1,6 \times 10^4 [\text{dopamina}]$, sendo Δi o pico de corrente resultante (μA) e $[\text{dopamina}]$ a concentração de dopamina (mol L^{-1}).

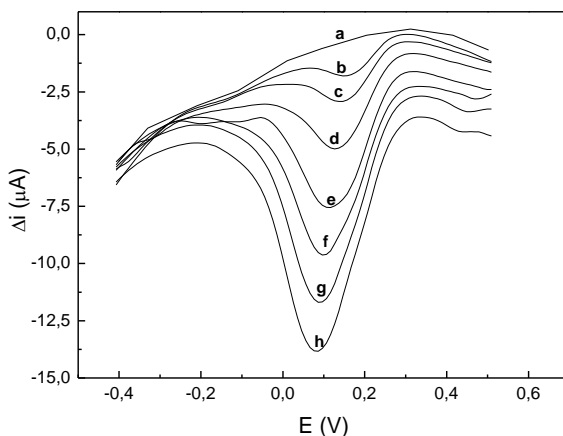


Figura 36 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de dopamina nas seguintes concentrações: (b) $9,9 \times 10^{-5}$; (c) $1,6 \times 10^{-4}$; (d) $3,3 \times 10^{-4}$; (e) $6,5 \times 10^{-4}$; (f) $9,8 \times 10^{-4}$; (g) $1,3 \times 10^{-3}$; (h) $1,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 80 mV, frequência de 60 Hz e incremento de 2,0 mV.

O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a fórmula $LD = 3 \times s/S$; s refere-se ao desvio padrão estimado do sinal do branco e S ao coeficiente angular da curva analítica. O LD encontrado foi de $9,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, portanto, o biossensor proposto apresentou bom desempenho na determinação de dopamina, pois o LD e a faixa de linearidade obtidos neste trabalho estão próximos ou maiores aos valores encontrados na literatura.

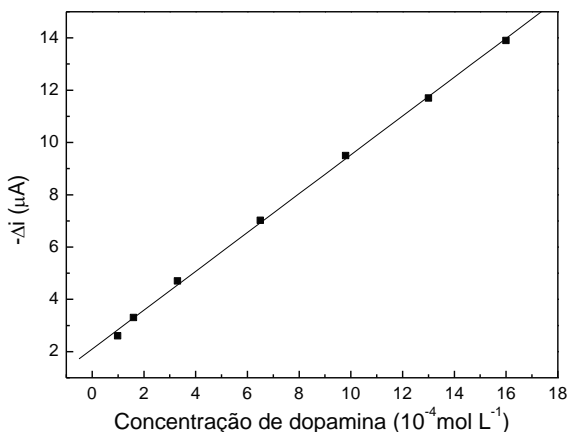


Figura 37 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo peroxidase extraída do pinhão e imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.

Caruso e colaboradores (1999) determinaram a dopamina utilizando um biossensor modificado com polifenol oxidase extraída da raiz do cará (*Discorea bulbifera*). Este biossensor apresentou uma resposta linear para concentrações de dopamina entre $2,0 \times 10^{-3}$ e $8,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, com limite de detecção de $7,5 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em pH 7,0. Lupetti e colaboradores (2005) desenvolveram um biossensor de pasta de carbono usando extrato bruto de abobrinha (*Curcubita pepo*) para determinação de dopamina em formulações farmacêuticas. O eletrodo enzimático apresentou um limite de detecção de $2,6 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e linearidade de $5,0 \times 10^{-4}$ a $3,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Ambos os estudos relatados não utilizaram suporte sólido para a imobilização das enzimas extraídas de vegetais, apenas a pasta de carbono. Sugere-se que a utilização das nanopartículas de PU-PEG como material suporte da peroxidase extraída do pinhão fez com que o sensor apresentasse uma melhora na eficiência da determinação de dopamina, pois as nanopartículas fornecem uma área superficial maior, levando a uma maior quantidade de enzima imobilizada por unidade de massa de partículas.

Oliveira e colaboradores (2006) desenvolveram um biossensor com diferentes métodos de imobilização da peroxidase de homogenato de vegetal em quitosana. A peroxidase do homogenato foi imobilizada na matriz de quitosana via ligação covalente cruzada com epiclоридrina e

glutaraldeído, e posteriormente incorporada em um eletrodo de pasta de carbono. O eletrodo mostrou resposta linear para hidroquinona em uma faixa de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ a $4,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Estes autores verificaram uma dependência do desempenho do biossensor com o tipo de imobilização utilizada, concluindo desta forma que a imobilização de enzimas em um suporte adequado pode melhorar significativamente a estabilidade e sensibilidade do biossensor.

5.3.5 Estudo de recuperação e aplicação analítica

O estudo de recuperação utilizando o biossensor de pasta de carbono contendo a peroxidase imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foi realizado adicionando três concentrações diferentes da solução de dopamina padrão ($3,3 \times 10^{-4}$; $6,6 \times 10^{-4}$ e $9,8 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) para cada amostra, seguido da determinação de dopamina em produtos farmacêuticos e cálculo da porcentagem de recuperação (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores da recuperação da solução padrão de dopamina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.

Amostra	Concentração de dopamina (mol L ⁻¹) x 10 ⁻⁴		
	Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)
A	3,30	3,40±0,04	103
	6,60	6,50±0,05	98,5
	9,80	9,70±0,03	99,0
B	3,30	3,20±0,02	97,0
	6,60	6,70±0,01	102
	9,80	9,90±0,02	101

A= Revivan[®]; B= Dopamina manipulada; n = 3

Este estudo de adição e recuperação foi realizado em triplicada para cada amostra adicionada. Os resultados variaram de 97,0 a 103 % para as amostras comerciais A (Revivan[®]) e B (Dopamina manipulada). Os valores obtidos confirmam que o biossensor não sofreu interferência da matriz nestas amostras.

O biossensor proposto foi validado pela determinação de dopamina em produtos farmacêuticos. A Tabela 5 apresenta a comparação entre a determinação de dopamina pelo biossensor proposto e pelo método oficial da Farmacopéia (1988). Resumidamente, o método

oficial consistiu em dissolver 30 mg da amostra de dopamina em 7 mL de ácido acético e 1 mL de solução de acetato de mercúrio. A solução foi misturada e titulada potenciométricamente com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹ até o ponto final de determinação. Cada mL de ácido perclórico consumido equivale á 18,96 mg de dopamina.

Tabela 5 - Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.

Amostra	Dopamina (mg mL ⁻¹)			Erro relativo (ER) %	
	Valor rotulado	Método oficial	Biossensor	ER ₁ ^a	ER ₂ ^b
A	5,00	5,08±0,01	4,80±0,01	-4,0	-5,5
B	5,00	5,12±0,02	5,10±0,01	+2,0	-0,4

^aER₁ = biossensor vs valor rotulado; ^bER₂ = biossensor vs valor do método oficial; A= Revivan[®]; B= Dopamina manipulada; n = 3

Foi aplicado o teste-t pareado aos resultados obtidos para cada método, e os valores estão de acordo com um nível de confiança de 95% e dentro do intervalo de erro aceitável. Baseados nestes resultados pode-se dizer que o biossensor de pasta de carbono contendo a peroxidase extraída do pinhão e imobilizada em nanopartículas de PU-PEG pode ser utilizado em técnicas eletroquímicas para a determinação de dopamina em produtos farmacêuticos.

5.3.6 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor proposto

A reprodutibilidade de eletrodo-a-eletrodo foi determinada para três biossensores de pasta de carbono contendo a peroxidase imobilizada em nanopartículas de PU-PEG em uma solução de dopamina 6,6 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Neste estudo o desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 2 %.

O estudo da estabilidade foi realizado durante um período de 200 dias (até 400 determinações). O biossensor foi mantido a 4 °C e as medidas foram feitas a cada 1-2 dias. Nenhuma mudança foi observada na resposta analítica de oito sucessivos ensaios para a concentração de

dopamina de $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O RSD obtido foi de 5 %.

O estudo da repetibilidade foi realizado utilizando o biossensor proposto e dez sucessivas medidas foram obtidas para a concentração de dopamina de $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). O RSD encontrado foi de 0,5%, mostrando uma boa repetibilidade.

O bom desempenho do biossensor proposto neste trabalho em termos de reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade pode estar relacionado à eficiência da imobilização da peroxidase nas nanopartículas de PU-PEG, as quais oferecem um ambiente favorável para a enzima. Resultados similares foram obtidos para eletrodos de pasta de carbono modificados com polímeros contendo enzimas extraídas de vegetais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

5.4 ESTUDO DA INTERAÇÃO DA HRP EM NANOPARTÍCULAS DE PU-PEG

Neste trabalho foi realizado um estudo sistemático da interação da enzima purificada HRP em nanopartículas de PU-PEG para se obter informações mais precisas a respeito do processo de adsorção da peroxidase nas nanopartículas, a influência da imobilização na sua atividade catalítica e a aplicação deste sistema na determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos.

5.4.1 Determinação do tempo de equilíbrio

A Figura 38 mostra o efeito do tempo de contato da solução contendo HRP 1 mg mL^{-1} em 20 mg de nanopartículas de PU-PEG. Pode-se observar que ocorre um rápido aumento nos primeiros 60 minutos (1 hora), seguidos de um patamar característico do equilíbrio de adsorção, que é atingido de forma constante apenas após 240 minutos (4 horas). Portanto, considerou-se que 4 horas consistem no tempo de equilíbrio da adsorção da HRP em nanopartículas de PU-PEG para os experimentos com as isotermas de adsorção e cinética enzimática da HRP adsorvida.

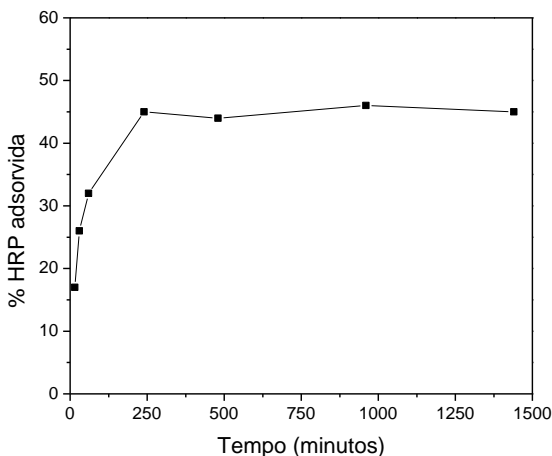


Figura 38 - Tempo de equilíbrio na adsorção de HRP 1 mg mL^{-1} em 20 mg de nanopartículas de PU-PEG em tampão fosfato pH 6,5.

O tempo de adsorção da HRP em nanopartículas de PU-PEG determinado neste estudo foi o mesmo encontrado por Silva e colaboradores (2007), no estudo da adsorção da HRP em partículas de PMMA/CMC. Já no trabalho de Wu e colaboradores (2005), a imobilização de tripsina em microesferas de PMMA ocorreu em 2 horas. Lei e Bi (2007) mostram que a pectinase foi imobilizada em copolímeros anfífilos de PS-*b*-PAA num período de 4 horas.

O tempo necessário para imobilizar uma enzima em suporte sólido pode variar de acordo com o tipo de enzima e do tipo de material suporte utilizado. Porém, a maioria dos estudos com partículas poliméricas mostra que em um tempo relativamente curto a enzima pode ser imobilizada. Isso mostra que a afinidade e eficiência da imobilização de uma enzima em partículas poliméricas dependem do tamanho e concentração da proteína, e principalmente da área superficial do material suporte.

5.4.2 Isoterma de adsorção

A isoterma de adsorção da HRP em nanopartículas de PU-PEG apresentada na Figura 39 pode ser dividida em duas regiões: (i) a primeira mostra um aumento inicial da quantidade adsorvida com o aumento da concentração de HRP e, (ii) a segunda mostra um plateau de adsorção com a máxima concentração de HRP adsorvida de $22,6 \pm 0,65 \mu\text{g mg}^{-1}$ nano PU-PEG.

Foram utilizados os modelos de adsorção de Langmuir, Freundlich e Temkin para os dados experimentais obtidos, porém a dependência da concentração de HRP adsorvida com a concentração da HRP livre em equilíbrio (Figura 39) melhor se ajustou ao modelo de adsorção de Langmuir (Equação 6, página 15).

A etapa inicial observada na isoterma está comumente associada a faixas de concentrações muito diluídas do adsorbato, neste caso, baixas concentrações de HRP. Portanto, na análise da isoterma, os pontos iniciais foram desconsiderados uma vez que a adsorção da enzima não é eficiente. A quantidade adsorvida aumenta até a saturação da superfície sólida (nanopartículas de PU-PEG) e o plateau de adsorção corresponde a formação de uma monocamada.

Em termos de $B_{\text{máx}}$, que é a máxima quantidade de HRP que pode ser adsorvida na superfície das nanopartículas de PU-PEG (expresso em μg de soluto em mg de material sólido), o valor encontrado pela análise da isoterma de Langmuir foi de $27,7 \mu\text{g HRP}$

mg^{-1} nano PU-PEG. A constante de Langmuir (K_L) encontrada foi de $3,45 \text{ mL mg}^{-1}$.

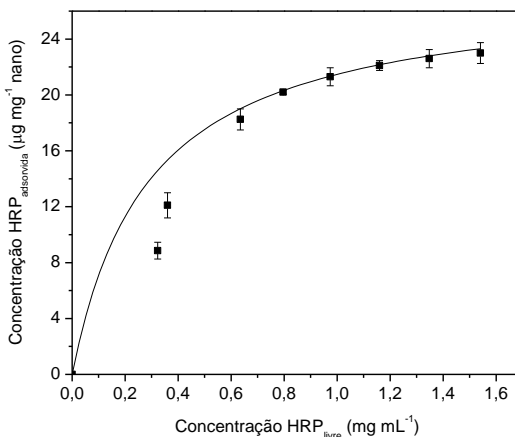


Figura 39 - Isoterma de adsorção de Langmuir obtida para diferentes concentrações de HRP em 20 mg de nanopartículas de PU-PEG durante 4 horas a 4°C ($n = 5$).

Existem vários trabalhos na literatura mostrando que os dados de adsorção de proteínas em partículas podem ser ajustados conforme o modelo da isoterma de Langmuir.

Yasuda e colaboradores (2009) estudaram a adsorção da lipase *Rhizopus delemar* em três diferentes partículas poliméricas anfífilas, constituídas de epóxi funcionalizadas com os grupos poli(alilamino) (PAA), guanidino (GA) e ambos (PAG). Os dados experimentais seguiram a equação de Langmuir e os valores da quantidade máxima adsorvida de lipase adsorvida nas partículas GAC, PA e PAG foram 241; 133 e 88,3 μg de proteína por mg de partícula, respectivamente.

A pectinase foi imobilizada em partículas coloidais do copolímero PS-*b*-PAA no trabalho de Lei e Bi (2007). A quantidade máxima de proteína imobilizada foi de 235,8 μg por mg de partículas, não apresentando efeito negativo na atividade enzimática. O valor de $B_{\text{máx}}$ encontrado por estes autores foi 10 vezes maior do que o valor encontrado no nosso estudo, porém a comparação não é válida pois trata-se de diferentes enzimas e nanopartículas.

Silva e colaboradores (2007) estudaram a adsorção e a atividade da HRP imobilizada em nanopartículas híbridas de PMMA/CMC com

diâmetro em torno de 145 ± 10 nm. As nanopartículas de PU-PEG utilizadas no nosso trabalho possuem características similares as nanopartículas de PMMA/CMC. Assim como as cadeias de PEG conferem uma superfície hidrofílica para as nanopartículas de poliuretano, as cadeias de CMC hidratam a superfície das partículas de PMMA. A quantidade máxima de HRP adsorvida nas nanopartículas de PMMA/CMC foi de $0,44 \mu\text{g}$ por mg de nanopartículas. Estes resultados sugerem que as nanopartículas de PU-PEG foram mais eficientes na imobilização da HRP do que as de PMMA/CMC.

Além da aquisição dos parâmetros das isotermas de Langmuir, é possível também estimar a quantidade de moléculas de HRP adsorvida em uma nanopartícula de PU-PEG. Sabendo-se que o valor da concentração máxima de HRP adsorvida foi de $22,6 \pm 0,65 \mu\text{g mg}^{-1}$ nano PU-PEG, a massa molar da HRP de $44.000 \text{ g mol}^{-1}$, o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas mol^{-1}), e a densidade numérica de partículas (N_p) de $1,41 \times 10^{15}$ nanopartículas L^{-1} , calcula-se que existam em torno de 4.400 moléculas de HRP adsorvidas em uma nanopartícula de PU-PEG.

A área superficial ($4\pi r^2$) de uma nanopartícula de PU-PEG pode ser estimada em um valor aproximado de 214.000 nm^2 . Conforme descrito por Laberge e colaboradores (2003), o raio de giro (R_g) de um monômero de HRP calculado por simulações dinâmicas é de $2,65 \text{ nm}$ ($26,545 \text{ \AA}$) e assumindo que as dimensões cristalográficas da peroxidase são de $4,0 \text{ nm} \times 6,7 \text{ nm} \times 11,7 \text{ nm}$ (<http://www.rcsb.org/pdb> ID: 1H58) e considerando a HRP como uma esfera sólida, pode-se estimar a área de uma molécula de HRP como sendo de 88 nm^2 . Portanto, a área de 4.400 moléculas de HRP corresponde a aproximadamente 388.000 nm^2 , a qual é da mesma ordem de magnitude da área de uma nanopartícula de PU-PEG. Porém, estas estimativas não são precisas, uma vez que a área real de uma nanopartícula de PU-PEG seja provavelmente maior do que a calculada, pois o tamanho das cadeias de PEG ao redor das nanopartículas não foi considerado, e a peroxidase também não pode ser considerada uma esfera perfeita. Entretanto, pode-se dizer que ocorreu a formação de uma monocamada no plateau de adsorção.

Como já foi descrito no trabalho de Zanetti-Ramos e colaboradores (2008), as nanopartículas de PU-PEG são negativamente carregadas. No presente trabalho foram obtidos valores de potencial zeta em pH 6,5 de $-(22,1 \pm 0,1) \text{ mV}$ para as nanopartículas de PU-PEG e $-(19,9 \pm 0,1) \text{ mV}$ para as nanopartículas de PU-PEG contendo a HRP adsorvida. O valor negativo obtido das nanopartículas contendo a HRP adsorvida já era esperado, uma vez que as moléculas da enzima são bem

menores do que as nanopartículas de PU-PEG. Mesmo observando a formação de uma monocamada de peroxidase nas nanopartículas e que a HRP possui uma carga residual positiva em pH 6,5, estes fatos não foram suficientes para aumentar o valor do potencial zeta.

Os estudos de dessorção mostraram que as moléculas de HRP se adsorveram irreversivelmente nas nanopartículas de PU-PEG. Após 24 horas em contato com tampão fosfato pH 6,5 a 4 °C, não foram observados valores significativos de HRP em solução. Apenas 8% da peroxidase foi dessorvida das nanopartículas de PU-PEG e este fato é provavelmente atribuído a algumas moléculas da HRP que não estavam fortemente adsorvidas à superfície do suporte sólido e acabaram sendo retiradas pelo solvente (tampão fosfato). Porém, este percentual de dessorção é pequeno o suficiente para que o processo de adsorção seja considerado irreversível (WOJCIECHOWISKI & BRASH, 1990).

Todos os experimentos de adsorção e dessorção foram realizados em pH 6,5, o qual é um pH ótimo para a HRP. Sob tais condições as nanopartículas de PU-PEG estão negativamente carregadas, devido aos grupamentos hidroxílicos terminais das cadeias de PEG expostas ao meio, e a HRP, como já foi mencionado anteriormente, apresenta ponto isoelétrico (pI) de 7,2 (CUI *et al.*, 2001), e portanto, possui carga positiva em pH 6,5. A Figura 40 representa um esquema da interação eletrostática entre as nanopartículas de PU-PEG e a HRP, onde ocorre as interações favoráveis entre as cadeias de PEG que estão expostas ao meio nas nanopartículas de PU e as cargas residuais positivas da HRP. Tais interações podem causar a adsorção irreversível.

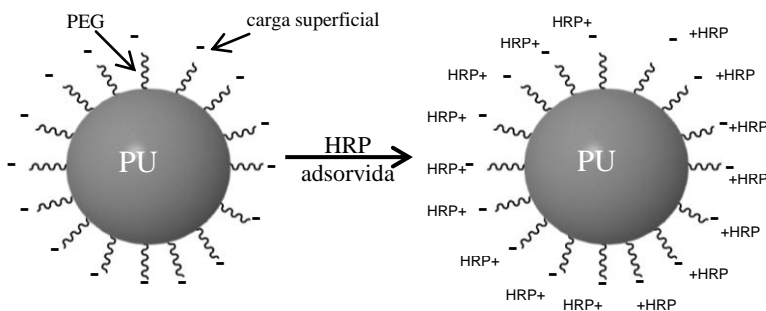


Figura 40 - Representação esquemática da interação eletrostática entre a HRP e as nanopartículas de PU-PEG.

5.4.3 Estabilidade da HRP livre e adsorvida em nanopartículas de PU-PEG

As enzimas de um modo geral não são estáveis em solução durante o armazenamento e suas atividades podem diminuir gradualmente em um determinado período de tempo. Neste trabalho, foi investigada a estabilidade da HRP livre em solução e adsorvida em nanopartículas de PU-PEG. A estabilidade no tempo de armazenamento foi investigada medindo-se as atividades da HRP livre e imobilizada por certo período e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 41.

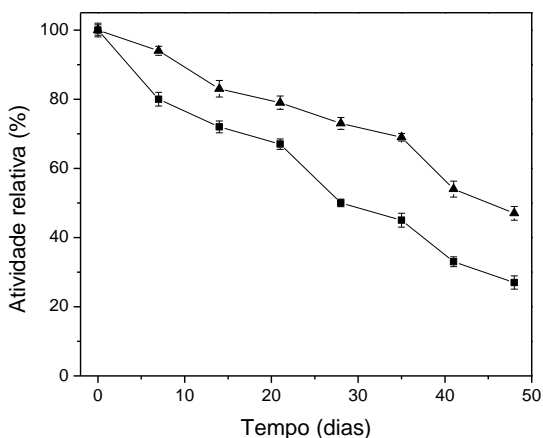


Figura 41 - Estabilidade no tempo de armazenamento da enzima livre (■) e imobilizada (▲). Medidas experimentais em triplicata (n = 3).

Podem ser observados que ambas as atividades relativas da enzima livre e imobilizada diminuíram com o tempo. Entretanto, a HRP livre perdeu a sua atividade mais rapidamente do que a forma imobilizada. Após 28 dias, a enzima livre manteve 50% da sua atividade inicial enquanto a forma imobilizada reteve aproximadamente 80%. Após 48 dias, a atividade relativa diminuiu para 25% para a HRP livre e 50% para a HRP imobilizada. Estes resultados sugerem que o processo de imobilização da HRP em nanopartículas de PU-PEG pode prolongar o período de armazenamento e conseqüentemente aumentar o tempo de reutilização desta enzima. Portanto, sugere-se que o armazenamento não causou mudanças na estrutura da enzima, que pudessem alterar sua atividade, e que a superfície das nanopartículas de PU-PEG forneceu um

bom ambiente para a adsorção da HRP, prevenindo mudanças conformacionais da enzima.

Na literatura pode-se encontrar vários estudos que investigam a estabilidade da enzima livre e imobilizada em um material suporte. A maioria dos resultados mostra que o processo de imobilização afeta pouco a atividade da enzima enquanto a enzima livre em solução perde a sua atividade catalítica mais rapidamente com passar do tempo.

Wu e colaboradores (2005) mostraram que num período de 8 dias a atividade da tripsina imobilizada em microesferas de PMMA era de aproximadamente 80% da atividade original enquanto a atividade relativa da tripsina em solução diminuiu cerca de 55%. No trabalho de Lei e Bi (2007), é mostrado que a pectinase imobilizada no copolímero PS-*b*-PAA apresentou o dobro da atividade quando comparada com a pectinase livre em solução no mesmo período de tempo.

5.4.4 Construção e otimização do biossensor de pasta de carbono modificado com HRP-nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina

A partir dos dados obtidos no estudo da interação da HRP com as nanopartículas de PU-PEG, foi construído um eletrodo de pasta de carbono modificado com a enzima imobilizada nas nanopartículas. A concentração de enzima utilizada para a construção do eletrodo modificado foi àquela determinada pelas isotermas de adsorção, cujo valor foi de 0,45 mg mL⁻¹ de HRP imobilizada em 20 mg de nanopartículas PU-PEG.

Os parâmetros pH, frequência e amplitude foram otimizados pela técnica SWV para a determinação de dopamina e os melhores valores obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Otimização das variáveis experimentais.

Parâmetros	Faixa estudada	Melhor valor
pH	6,0 - 8,0	6,5
Frequência (Hz)	10 - 100	30
Amplitude (mV)	10 - 100	50

A eficiência da imobilização da HRP em nanopartículas de PU-PEG foi avaliada da mesma forma como foi realizado no estudo do eletrodo de pasta de carbono contendo a peroxidase extraída do pinhão. Foram utilizados quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono

contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ de HRP; (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ de HRP imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG. Os voltamogramas cíclicos obtidos para estes quatro eletrodos estão apresentados na Figura 42. A faixa de potencial utilizada foi de $-0,2 \text{ V}$ a $+0,5 \text{ V}$ vs eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) para uma velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

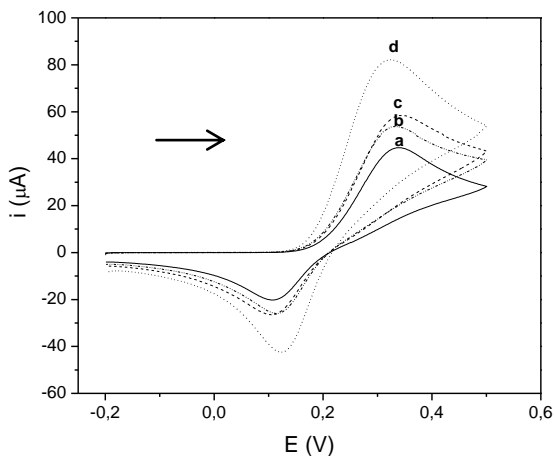


Figura 42 - Voltamogramas cíclicos obtidos usando quatro diferentes eletrodos: (a) pasta de carbono contendo nanopartículas de PU-PEG; (b) pasta de carbono contendo $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ de HRP (c) pasta de carbono; (d) pasta de carbono contendo $0,45 \text{ mg mL}^{-1}$ de HRP imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG. As medidas foram realizadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e dopamina $3,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Os resultados obtidos neste estudo foram similares aos resultados obtidos no estudo anterior com o eletrodo de pasta de carbono contendo peroxidase extraída do pinhão. O eletrodo (a) mostrou o menor sinal analítico e a melhor resposta foi observada no eletrodo (d), que continha a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG. Novamente o eletrodo (b), que continha somente a HRP na pasta de carbono, mostrou menor resposta do que o eletrodo (d), mostrando que a HRP pura apresenta uma melhora na atividade catalítica após o processo de imobilização em nanopartículas de PU-PEG resultando em um melhor desempenho do biossensor.

5.4.4.1 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica

Os voltamogramas de onda quadrada do eletrodo de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foram obtidos no intervalo de potencial de +0,6 a -0,6 V, com sucessivas adições de dopamina e em condições previamente otimizadas (Tabela 5). A Figura 43 mostra os voltamogramas obtidos da corrente resultante do processo de oxirredução da dopamina na superfície do eletrodo proposto.

A curva analítica obtida (Figura 44) apresentou uma faixa linear de $1,7 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9997$) e a equação de regressão obtida foi $\Delta i = 0,58 + 1,4 \times 10^4 [\text{dopamina}]$, onde Δi é o pico de corrente resultante em μA e $[\text{dopamina}]$ é a concentração de dopamina mol L^{-1} .

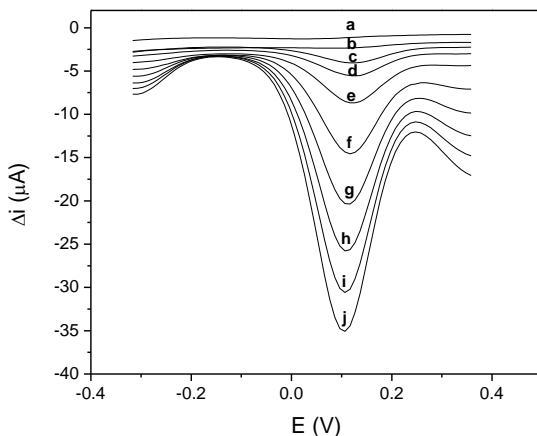


Figura 43 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de dopamina nas seguintes concentrações: (b) $1,7 \times 10^{-5}$; (c) $8,3 \times 10^{-5}$; (d) $1,7 \times 10^{-4}$; (e) $3,3 \times 10^{-4}$; (f) $6,6 \times 10^{-4}$; (g) $9,8 \times 10^{-4}$; (h) $1,3 \times 10^{-3}$; (i) $1,6 \times 10^{-3}$; (j) $1,9 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 50 mV, frequência de 30 Hz e incremento de 2,0 mV.

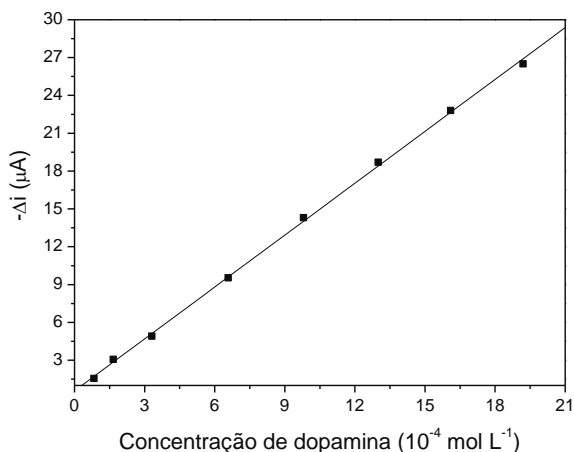


Figura 44 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.

O limite de detecção (LD) encontrado para a determinação de dopamina foi de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o qual é um valor similar obtido empregando-se o biossensor de pasta de carbono contendo a peroxidase extraída do pinhão e imobilizada em nanopartículas de PU-PEG.

5.4.4.2 Estudo de recuperação e aplicação analítica

O estudo de recuperação utilizando o biossensor de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foi realizado adicionando três concentrações diferentes da solução de dopamina padrão ($3,3 \times 10^{-4}$; $6,6 \times 10^{-4}$ e $9,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) para cada amostra, seguido da determinação de dopamina em produtos farmacêuticos e cálculo da porcentagem de recuperação (Tabela 7).

Este estudo de adição e recuperação foi realizado em triplicada para cada amostra adicionada e os resultados variaram de 93,0 a 107 %. Os valores obtidos confirmam que o biossensor não sofreu interferência da matriz das amostras.

Tabela 7 - Valores da recuperação da solução padrão de dopamina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.

Amostra	Concentração de dopamina (mol L^{-1}) $\times 10^{-4}$		
	Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)
A	3,30	3,54 \pm 0,01	107
	6,60	6,11 \pm 0,05	93,0
	9,80	10,00 \pm 0,02	101
B	3,30	3,17 \pm 0,08	96,0
	6,60	6,50 \pm 0,05	98,8
	9,80	10,1 \pm 0,01	103

A= Revivan[®]; B= Dopamina manipulada; n = 3

O biossensor proposto foi validado pela determinação de dopamina em produtos farmacêuticos. Na Tabela 8 é apresentada uma comparação dos resultados obtidos dos teores de dopamina empregando-se o biossensor proposto e o método oficial da Farmacopéia (1988).

Tabela 8 - Determinação de dopamina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o eletrodo proposto.

Amostra	Dopamina (mg mL^{-1})			Erro relativo (ER) %	
	Valor rotulado	Método oficial	Biossensor	ER ₁ ^a	ER ₂ ^b
A	5,00	5,08 \pm 0,01	4,95 \pm 0,05	-1,0	-2,5
B	5,00	5,12 \pm 0,02	5,04 \pm 0,04	+0,8	-1,6

^aER₁ = biossensor vs valor rotulado; ^bER₂ = biossensor vs valor do método oficial; A= Revivan[®]; B= Dopamina manipulada; n = 3

Foi aplicado o teste-t pareado aos resultados obtidos para cada método, e os valores estão de acordo com um nível de confiança de 95% e dentro do intervalo de erro aceitável. Baseando-se nestes resultados, o eletrodo de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG pode ser utilizado para determinação de dopamina em fármacos.

5.4.4.3 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade

A reprodutibilidade de eletrodo-a-eletrodo foi determinada para três biossensores de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG em uma solução de dopamina $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Neste estudo o desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 2,8 %.

O estudo da estabilidade foi realizado durante um período de 200 dias (até 400 determinações). O biossensor foi mantido a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e as medidas foram feitas a cada 1-2 dias. Nenhuma mudança foi observada na resposta analítica de oito sucessivas medidas para a concentração de dopamina de $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5) e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; e o RSD encontrado foi de 3 %.

O estudo da repetibilidade foi realizado utilizando o mesmo eletrodo para dez sucessivos ensaios com a concentração de dopamina de $6,6 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,5). Foram obtidos os valores das correntes resultantes e o RSD encontrado foi de 2,2%, mostrando uma boa repetibilidade.

A Tabela 9 compara os resultados obtidos utilizando os biossensores de pasta de carbono modificado com a peroxidase extraída do pinhão (A) e com a HRP purificada (B) imobilizada nas nanopartículas de PU-PEG para a determinação de dopamina.

Observa-se uma boa eficiência de ambos os biossensores, com ótimos valores de coeficiente de correlação. A variação do percentual de recuperação nas amostras reais confirma a ausência de interferentes na determinação de dopamina. A faixa de linearidade e o limite de detecção obtidos utilizando os eletrodos propostos de pasta de carbono modificados são similares, porém, deve-se observar que a quantidade de peroxidase do pinhão utilizada na construção do biossensor foi dez vezes maior do que a quantidade de HRP purificada.

Esta diferença pode ser devida, principalmente, à metodologia empregada para a construção dos biossensores. Enquanto para a obtenção do biossensor (A) contendo $2,5 \text{ U mg}^{-1}$ pasta de carbono, foi estudado primeiramente a resposta de sensores utilizando diferentes unidades do homogenato do pinhão adicionadas diretamente nas nanopartículas de PU-PEG, o biossensor (B) foi obtido após um estudo sistemático da quantidade máxima de HRP purificada adsorvida na superfície das nanopartículas. Porém, ambos os biossensores desenvolvidos neste trabalho mostraram ser de fácil preparação e apresentaram bom desempenho na determinação de dopamina. Apesar do biossensor (A) ter sido desenvolvido com uma maior quantidade de

enzima em relação ao biossensor (B), o uso do homogenato do pinhão na construção de biossensores é viabilizado pelo fato de possuir um baixo custo e fácil aquisição, podendo substituir a peroxidase purificada.

Tabela 9 - Comparação das figuras de mérito usando os biossensores de pasta de carbono modificados com peroxidase do pinhão (A) e HRP purificada (B) imobilizadas em nanopartículas de PU-PEG para a determinação da dopamina.

	Biossensor (A) ^a	Biossensor (B) ^b
Concentração da peroxidase (U mg ⁻¹ pasta de carbono)	2,5	0,25
Linearidade (mol L ⁻¹)	9,9 x 10 ⁻⁵ - 1,6 x 10 ⁻³	1,7 x 10 ⁻⁵ - 1,9 x 10 ⁻³
Equação da reta	$\Delta i = 7,3 + 1,6 \times 10^4 [D]^c$ (r = 0,9995)	$\Delta i = 0,58 + 1,4 \times 10^4 [D]^c$ (r = 0,9997)
Limite de detecção (mol L ⁻¹)	9,0 x 10 ⁻⁶	2,0 x 10 ⁻⁶
Recuperação (%)	97 - 103	93 - 107

^aBiossensor (A) = pasta de carbono modificado com peroxidase do pinhão;

^bBiossensor (B) = pasta de carbono modificado com HRP purificada; ^c[D] = concentração de dopamina

5.4.5 Otimização do biossensor de pasta de carbono modificado com HRP-nanopartículas de PU-PEG para a determinação dos flavonóides: hesperidina e diosmina

A fim de verificar a influência do analito a ser determinado na resposta do biossensor, o eletrodo de pasta de carbono modificado com a HRP imobilizada nas nanopartículas de PU-PEG utilizado na determinação de dopamina, foi devidamente otimizado e empregado na determinação dos flavonóides hesperidina e diosmina. Os parâmetros pH, frequência e amplitude foram otimizados para a determinação dos flavonóides e os melhores valores obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Otimização das variáveis experimentais para a determinação de hesperidina e diosmina.

Parâmetros	Faixa estudada	Melhor valor	
		Hesperidina	Diosmina
pH	4,0 - 8,0	6,0	5,0
Frequência (Hz)	10 - 200	100	100
Amplitude (mV)	10 - 200	100	100

5.4.5.1 Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada dos flavonóides estudados

A Figura 45 apresenta os voltamogramas de onda quadrada da hesperidina (A) e da diosmina (B), com a separação observada das correntes direta, reversa e resultante (conforme indicado na figura).

Ambos os voltamogramas de onda quadrada da hesperidina (A) e da diosmina (B) apresentam um pico de corrente anódica referente a oxidação dos respectivos flavonóides nas correspondentes semiquinonas e um pico de corrente catódica referente a redução eletroquímica da semiquinona com transferência de um elétron (EL-SHAHAWI *et al.*, 2006; TIMBOLA *et al.*, 2006).

Estas reações são catalisadas pela peroxidase que se encontra na superfície do biossensor na presença do peróxido de hidrogênio (Figura 46). A reação de oxiredução da diosmina é similar ao da hesperidina, a diferença está na estrutura dos flavonóides, em que a hesperidina é composta por dois anéis aromáticos conectados por um anel dihidropirona e os anéis aromáticos da diosmina são conectados por um anel pirona.

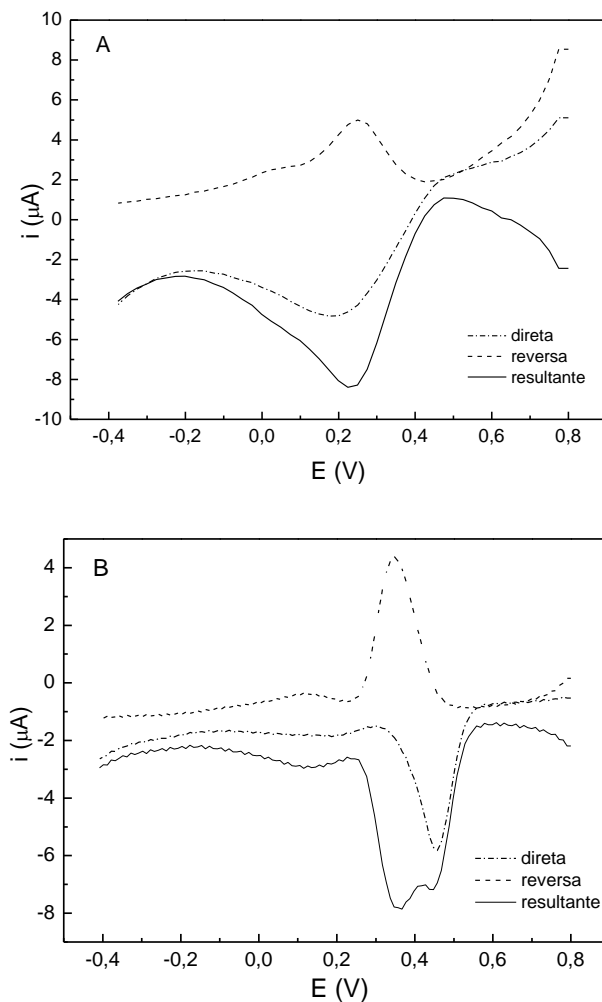


Figura 45 - Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada do biossensor proposto para a determinação de hesperidina na concentração de $8,52 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 6,0 (A), e de diosmina na concentração de $9,81 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato de sódio pH 5,0 (B). Condições: peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, amplitude de 100 mV, frequência de 100 Hz e incremento de 2,0 mV.

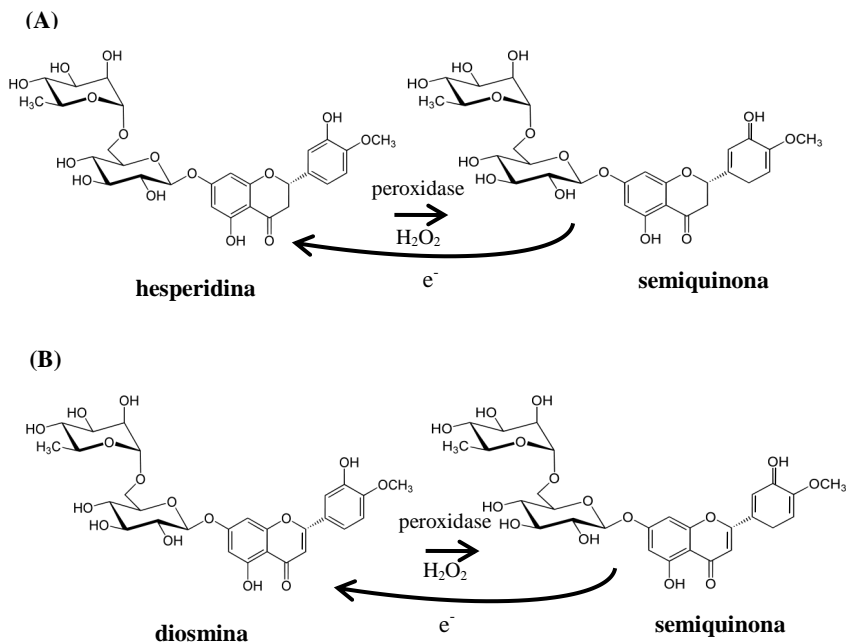


Figura 46 - Representação esquemática do processo enzimático da hesperidina (A) e diosmina (B) na presença de peróxido de hidrogênio e peroxidase.

Além disso, como pode ser observado na Figura 45 (B), a corrente resultante do voltamograma de onda quadrada da diosmina apresenta dois picos distintos, representado pelo somatório das correntes direta e inversa. Este fato dificulta a utilização da corrente resultante na construção da curva analítica afetando a linearidade da mesma, portanto, para este fim foi usada a intensidade do pico da corrente reversa (i_p^c), ou seja, corrente do pico catódico.

Nos voltamogramas obtidos para hesperidina (Figura 45 A), o potencial (E) do pico da corrente direta e reversa é o mesmo, portanto, não foi observada a separação dos picos no voltamograma resultante. O valor da intensidade do pico da resultante foi utilizado para a obtenção da curva analítica para a determinação de hesperidina.

5.4.5.2 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica da hesperidina

Os voltamogramas de onda quadrada do biossensor de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foram obtidos no intervalo de potencial de +0,8 a -0,4 V, com sucessivas adições de hesperidina e em condições previamente otimizadas (Tabela 10). A Figura 47 mostra os voltamogramas obtidos da corrente resultante do processo de oxirredução da hesperidina usando o eletrodo de pasta de carbono modificado.

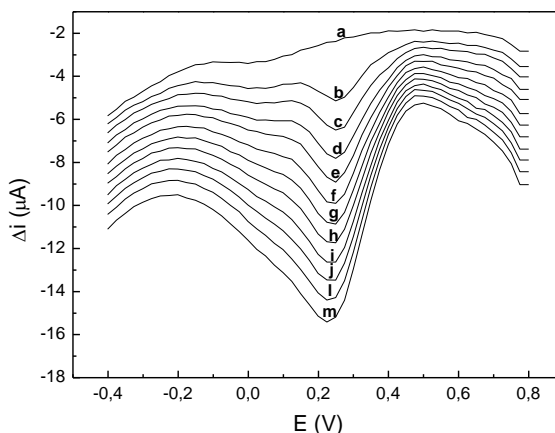


Figura 47 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,0) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de hesperidina nas seguintes concentrações: (b) $6,5 \times 10^{-6}$; (c) $1,1 \times 10^{-5}$; (d) $2,2 \times 10^{-5}$; (e) $3,2 \times 10^{-5}$; (f) $4,3 \times 10^{-5}$; (g) $5,4 \times 10^{-5}$; (h) $6,4 \times 10^{-5}$; (i) $7,5 \times 10^{-5}$; (j) $8,5 \times 10^{-5}$; (l) $9,5 \times 10^{-5}$; (m) $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 100 mV, frequência de 100 Hz e incremento de 2,0 mV.

A curva analítica obtida (Figura 48) apresentou uma faixa linear de $6,5 \times 10^{-6}$ a $1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ($r = 0,9946$) e a equação de regressão obtida foi $\Delta i = 2,60 + 5,87 \times 10^4 [\text{hesperidina}]$, em que Δi é o pico de corrente resultante em μA e $[\text{hesperidina}]$ é a concentração de hesperidina em mol L^{-1} .

O limite de detecção (LD) encontrado para a determinação de hesperidina foi de $7,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O valor encontrado neste trabalho é similar a valores apresentados na literatura.

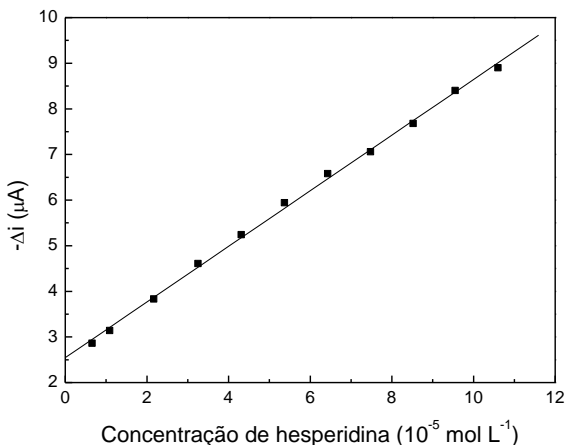


Figura 48 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de hesperidina.

Chen e colaboradores (2002) desenvolveram um método baseado na eletroforese capilar com detecção eletroquímica para a determinação de hesperidina e sinefrina em fármacos homeopáticos chineses compostos de casca de laranja. Foi observada uma excelente linearidade para concentrações de sinefrina entre $2,5 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ e entre $5,0 \times 10^{-6}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$ para a hesperidina. Os limites de detecção para a sinefrina e hesperidina foram $4,96 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$ e $6,54 \times 10^{-7}$ mol L $^{-1}$, respectivamente.

5.4.5.3 Estudo de recuperação e aplicação analítica da hesperidina

O estudo de recuperação utilizando o biossensor de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foi realizado adicionando três concentrações diferentes da solução de hesperidina padrão ($6,0$; 13 e $20 \mu g mL^{-1}$) para cada amostra, seguido da determinação de hesperidina em produtos farmacêuticos e cálculo da porcentagem de recuperação. Este estudo de adição e recuperação foi realizado em triplicada para cada amostra adicionada. Os resultados estão apresentados na Tabela 11 e variaram de $96,5$ a 110% para as amostras comerciais A e B (hesperidina manipulada). Os valores obtidos confirmam que o biossensor não sofreu interferência da matriz nestas amostras.

Tabela 11 - Valores da recuperação da solução padrão de hesperidina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.

Amostra	Concentração de hesperidina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)
A	6,00	6,50 \pm 0,36	108
	13,0	13,4 \pm 0,46	103
	20,0	19,5 \pm 0,47	98
B	6,00	6,90 \pm 0,35	110
	13,0	13,7 \pm 0,10	105
	20,0	19,3 \pm 0,30	96,5

A e B = Hesperidina manipulada; n = 3

O biossensor proposto foi validado pela determinação de hesperidina em produtos farmacêuticos. A Tabela 12 apresenta a comparação entre a determinação de hesperidina empregando-se o biossensor proposto e o método oficial adaptado da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995).

Tabela 12 - Determinação de hesperidina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.

Amostra	Hesperidina (mg)			Erro relativo (ER) %	
	Valor rotulado	Método oficial	Biossensor	ER ₁ ^a	ER ₂ ^b
A	20,0	20,1 \pm 0,1	19,3 \pm 0,3	-3,5	-4,0
B	50,0	51,8 \pm 0,1	50,2 \pm 0,9	+0,4	-3,1

^aER₁ = biossensor vs valor rotulado; ^bER₂ = biossensor vs valor do método oficial; A e B = Hesperidina manipulada; n = 3

Resumidamente, o método oficial consistiu na obtenção de uma curva analítica com diferentes concentrações de uma solução padrão de hesperidina pelo método espectrofotométrico ($\lambda = 330 \text{ nm}$). As amostras de hesperidina (cápsulas de 20 e 50 mg) foram dissolvidas em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e as soluções foram centrifugadas a 5.000

rpm por 10 minutos a 25 °C. As absorvâncias em $\lambda = 330$ nm dos sobrenadantes foram medidas e comparadas com a curva analítica obtida da amostra padrão para determinar a concentração do flavonóide.

Foi aplicado o teste-t pareado aos resultados obtidos para cada método, e os valores estão de acordo com um nível de confiança de 95% e dentro do intervalo de erro aceitável.

5.4.5.4 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor na determinação da hesperidina

A reprodutibilidade de eletrodo-a-eletrodo foi determinada para três biossensores de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG em uma solução de hesperidina $4,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (20 µg mL⁻¹). Neste estudo o desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 2,5 %.

O estudo da estabilidade foi realizado durante um período de 120 dias (até 250 determinações). O biossensor foi mantido a 4 °C e as medidas foram feitas a cada 1-2 dias. Nenhuma mudança foi observada na resposta analítica de oito sucessivos ensaios para a concentração de hesperidina de $4,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (20 µg mL⁻¹) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0) e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. O RSD obtido foi de 1,5%.

O estudo da repetibilidade foi realizado utilizando dez sucessivas medidas para a mesma concentração de hesperidina utilizada nos estudos de reprodutibilidade e estabilidade. Foram obtidos os valores das correntes resultantes e o RSD encontrado foi de 3%, mostrando uma boa repetibilidade.

5.4.5.5 Voltamogramas de onda quadrada e curva analítica da diosmina

Os voltamogramas de onda quadrada do biossensor de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foram obtidos no intervalo de potencial de +0,8 a -0,4 V, com sucessivas adições de diosmina e em condições previamente otimizadas (Tabela 10). A Figura 49 mostra os voltamogramas da corrente reversa, que corresponde a corrente do pico catódico (i_p^c) em que a semiquinona produzida pela oxidação da diosmina é eletroquimicamente reduzida na superfície do eletrodo, gerando correntes que são diretamente proporcionais às concentrações de diosmina.

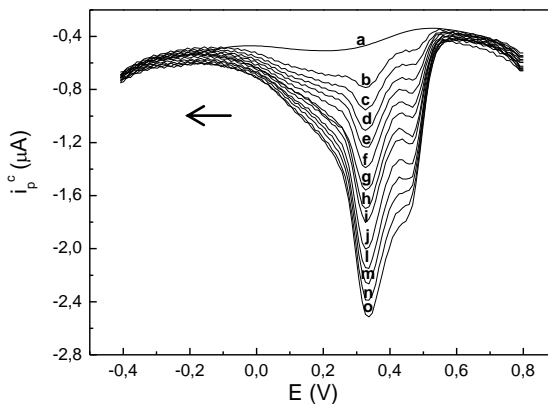


Figura 49 - Voltamogramas de onda quadrada obtidos usando o biossensor proposto em (a) solução tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) contendo peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e solução de diosmina nas seguintes concentrações: (b) $2,2 \times 10^{-8}$; (c) $3,3 \times 10^{-8}$; (d) $4,4 \times 10^{-8}$; (e) $5,5 \times 10^{-8}$; (f) $6,5 \times 10^{-8}$; (g) $7,6 \times 10^{-8}$; (h) $8,7 \times 10^{-8}$; (i) $9,8 \times 10^{-8}$; (j) $1,1 \times 10^{-7}$; (l) $1,3 \times 10^{-7}$; (m) $1,5 \times 10^{-7}$; (n) $1,7 \times 10^{-7}$; (o) $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; amplitude de 100 mV, frequência de 100 Hz e incremento de 2,0 mV.

A curva analítica para a determinação de diosmina apresentou duas faixas lineares, como mostrado na Figura 50. Na primeira faixa (a), foi obtida uma linearidade de $2,2 \times 10^{-8}$ a $1,1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($i_p^c = 0,12 + 1,30 \times 10^7$ [diosmina]; $r = 0,9995$) com limite de detecção de $1,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$. A segunda faixa (b) apresentou linearidade de $1,1 \times 10^{-7}$ a $1,9 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ($i_p^c = 1,02 + 5,20 \times 10^6$ [diosmina]; $r = 0,9992$).

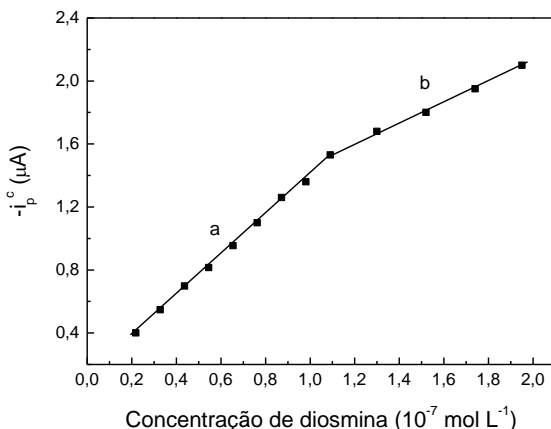


Figura 50 - Curva analítica do biossensor de pasta de carbono contendo HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG para a determinação de diosmina.

5.4.5.6 Estudo de recuperação e aplicação analítica da diosmina

O estudo de recuperação utilizando o biossensor de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foi realizado adicionando três concentrações diferentes da solução de diosmina padrão ($0,066$; $0,090$ e $0,120 \mu\text{g mL}^{-1}$) para cada amostra, seguido da determinação de diosmina em produtos farmacêuticos e cálculo da porcentagem de recuperação. Este estudo de adição e recuperação foi realizado em triplicada para cada amostra adicionada. Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e variaram de $91,8$ a $102,4 \%$ para as amostras comerciais A e B (diosmina manipulada). Os valores obtidos confirmam que o biossensor não sofreu interferência da matriz nestas amostras.

O biossensor proposto foi validado pela determinação de diosmina em produtos farmacêuticos. A Tabela 14 apresenta a comparação entre a determinação de diosmina pelo biossensor proposto e pelo método oficial adaptado da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995), conforme descrito na seção 5.4.5.3., porém amostras de diosmina foram utilizados ao invés de amostras de hesperidina.

Tabela 13 - Valores da recuperação da solução padrão de diosmina em produtos farmacêuticos utilizando o biossensor proposto.

Amostra	Concentração de diosmina ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Adicionado	Encontrado	Recuperado (%)
A	0,066	0,061 \pm 0,001	91,8
	0,093	0,094 \pm 0,002	102,4
	0,120	0,119 \pm 0,001	100,6
B	0,066	0,065 \pm 0,002	99,7
	0,093	0,094 \pm 0,001	102,2
	0,120	0,119 \pm 0,003	100,7

A e B = Diosmina manipulada; n = 3

Tabela 14 - Determinação de diosmina em produtos farmacêuticos usando o método oficial e o biossensor proposto.

Amostra	Diosmina (mg)			Erro relativo (ER) %	
	Valor rotulado	Método oficial	Biossensor	ER ₁ ^a	ER ₂ ^b
A	20,0	20,2 \pm 0,1	19,9 \pm 0,1	-0,5	-1,5
B	50,0	50,8 \pm 0,3	49,5 \pm 0,6	-1,0	-2,5

^aER₁ = biossensor vs valor rotulado; ^bER₂ = biossensor vs valor do método oficial; A e B = Diosmina manipulada; n = 3

Foi aplicado o teste-t pareado aos resultados obtidos para cada método, e os valores estão de acordo com um nível de confiança de 90% e dentro do intervalo de erro aceitável.

5.4.5.7 Reprodutibilidade, estabilidade e repetibilidade do biossensor na determinação da diosmina

A reprodutibilidade de eletrodo-a-eletrodo foi determinada para três biossensores de pasta de carbono contendo a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG em uma solução de diosmina $5,5 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ (0,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Neste estudo o desvio padrão relativo (RSD) obtido foi de 3,5 %.

O estudo da estabilidade foi realizado durante um período de 120 dias (até 250 determinações). O biossensor foi mantido a 4 °C e as medidas foram feitas a cada 1-2 dias. Nenhuma mudança foi observada na resposta analítica de oito sucessivos ensaios para a concentração de hesperidina de $5,5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ($0,03 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) em tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 5,0) e peróxido de hidrogênio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O RSD obtido foi de 2%.

O estudo da repetibilidade foi realizado utilizando dez sucessivas medidas para a mesma concentração de diosmina utilizada nos estudos de reprodutibilidade e estabilidade. Foram obtidos os valores das correntes resultantes e o RSD encontrado foi de 4%, mostrando uma boa repetibilidade.

O eletrodo de pasta de carbono modificado com a HRP imobilizada em nanopartículas de PU-PEG apresentou bons resultados na determinação de dopamina, hesperidina e diosmina em produtos farmacêuticos. Apresentou linearidade em amplas faixas de concentração e baixos limites de detecção e não sofreu influência da matriz da amostra. O eletrodo modificado respondeu em faixas de linearidade diferentes para cada analito, fator dependente de cada composto fenólico, mas apresentou bons resultados na aplicação de ambos. Portanto, sugere-se que o eletrodo proposto pode ser empregado na determinação de compostos fenólicos porém, cada sistema deverá ser devidamente otimizado.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As bicamadas lipídicas podem fornecer um ambiente natural para a imobilização de moléculas bioativas tais como enzimas, anticorpos e antígenos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a HRP imobilizada nas bicamadas lipídicas de DMPC pode catalisar a reação de oxirredução da dopamina eficientemente. Além disso, pelas imagens do AFM pode-se concluir que ocorreu uma interação entre as moléculas da enzima e a bicamada lipídica, indicando que a HRP pode estar imobilizada na bicamada de DMPC. O biosensor baseado em bicamadas lipídicas poderá ser útil em estudos fundamentais de interações entre diferentes micro e macromoléculas e as membranas lipídicas. Porém, para aplicações no desenvolvimento de dispositivos o sensor não apresentou estabilidade adequada.

Entretanto, muitos estudos ainda necessitam ser realizados a fim de se aprimorar os parâmetros analíticos obtidos com este sistema. Porém o objetivo mais importante do trabalho foi cumprido, uma vez que a verificação da resposta eletroquímica com a HRP imobilizada em bicamadas de DMPC foi avaliada. Além disso, com os resultados obtidos torna-se possível prever qual processo de imobilização de biomoléculas pode se tornar mais eficiente para determinado sistema.

Os resultados obtidos no estudo de caracterização das nanopartículas de PU-PEG indicaram que a técnica do AFM permitiu observar a forma, a distribuição das nanopartículas, assim como a interação das mesmas em diferentes suportes sólidos. Foram identificadas diferentes populações de nanopartículas de PU-PEG com tamanhos distintos, as quais nem sempre podem ser observadas por DLS. A natureza do suporte sólido possui um papel muito importante no recobrimento da superfície. Os dados obtidos neste estudo sugerem que a mica e o silício hidrofílico são os suportes sólidos mais apropriados para a obtenção das imagens de AFM das nanopartículas de PU-PEG, uma vez que as mesmas acomodam-se de forma homogênea nestes suportes. Por outro lado, o silício hidrofóbico não foi um suporte adequado, pois as nanopartículas aglomeraram-se na superfície do suporte.

Além disso, a análise das imagens de AFM mostrou que os valores do diâmetro das nanopartículas foram maiores do que os valores de altura, porém os dados sugerem que a ponta utilizada para a obtenção das imagens do AFM permitiu medir somente a topografia das nanopartículas expostas na superfície do suporte sólido. Desta forma,

pode-se presumir de que as nanopartículas de PU-PEG são sólidas e excelentes materiais nanoestruturados para a imobilização de enzimas.

Um eletrodo de pasta de carbono modificado com a peroxidase extraída do pinhão imobilizada em nanopartículas de PU-PEG foi construído. O pinhão, que é a semente da araucária (*Araucaria angustifolia*), mostrou ser um biocatalisador alternativo, até então não utilizado como fonte de peroxidase. As nanopartículas de PU-PEG foram suportes adequados para a imobilização da enzima, melhorando a sua estabilidade. A construção deste eletrodo de pasta de carbono modificado foi de fácil execução, apresentando baixo custo, rapidez nas análises, boa sensibilidade e estabilidade.

Foi realizado um estudo sistemático da interação da HRP purificada em nanopartículas de PU-PEG para a obtenção de informações sobre o processo de adsorção da peroxidase nas nanopartículas, bem como a influência da imobilização na sua atividade catalítica e a aplicação deste sistema na determinação de compostos fenólicos em produtos farmacêuticos. A adsorção de HRP em nanopartículas de PU-PEG seguiu o modelo da isoterma de Langmuir, em que uma monocamada é formada no plateau de adsorção. O processo de imobilização da HRP em nanopartículas de PU-PEG aumentou o tempo de reutilização da enzima, pois não foram observadas mudanças estruturais, uma vez que a forma imobilizada reteve aproximadamente 50% da sua atividade original após cerca de 50 dias de armazenagem.

O sistema HRP-nanopartículas de PU-PEG utilizado na construção do eletrodo de pasta de carbono modificado apresentou eficiência na determinação de compostos fenólicos. Dentre os resultados obtidos com o biossensor proposto, verificou-se que os limites de detecção encontrados para dopamina, hesperidina e diosmina possuem valores satisfatórios. São valores até menores que alguns outros limites de detecção encontrados na literatura, para os mesmos compostos, inclusive em casos nos quais se utilizam nanoestruturas para o desenvolvimento do biossensor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, V., et al. Utilizing square wave voltammetry to detect flavonoids in the presence of human urine. **Sensors**, v. 7, p. 2402-2418, 2007.

ADAMNISON, W. A. **Physical chemistry of surfaces**, Califórnia: 5 ed., 1990, 777 p.

ADAMS, R. N. Carbon paste electrodes. **Anal. Chem.**, v. 30, p. 1576-1576, 1958.

AHUJA, T., et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, p. 791-805, 2007.

AKIYAMA, T.; YAMADA, T.; MAITANI, T. Analysis of enzymatically glucosylated flavonoids by capillary electrophoresis. **J. Chromatogr., A**, v. 895, p. 279-283, 2000.

ALPAT, S.; ALPAT, S. K.; TELEFONCU, A. A sensitive determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using a nafion-coated clinoptilolite-modified carbon paste electrode. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 383, p. 695-700, 2005.

ARMSTRONG, F. A.; WILSON, G. S. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. **Electrochim. Acta**, v. 45, p. 2623-2645, 2000.

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 23, p. 1083-1100, 2008.

BAHAR, T.; ÇELEBI, S. S. Immobilization of glucoamylase on magnetic poly(styrene) particles. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 72, p. 69-73, 1999.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: Fundamentals and applications**. 2. ed., New York: John Wiley & Sons, 2001. 856 p.

BASSI, A. S.; McGRATH, C. Carbon paste biosensor based on crude soybean seed hull extracts for phenol detection. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 322-326, 1999.

- BICKERSTAFF, G. F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press, 1997. 367 p.
- BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Phys. Rev. Lett.**, v. 56, p. 930-933, 1986.
- BLUM, L. J.; COULET, P. R. **Biosensor Principles and Applications**. New York: CRC Press, 1991, 357 p.
- BUDEVSKI, E. B.; STAIKOV, G. T.; LORENZ, W. J. **Electrochemical phase formation and growth**. Germany: Wiley-VCH. 1996. 410 p.
- BUDRIENE, S., et al. β -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. **Cent. Eur. J. Chem.**, v. 3, p. 95–105, 2005.
- BUNACIU, A. et al., Determination of diosmin in pharmaceutical formulations using Fourier transform infrared spectrophotometry. **Saudi Pharm. J.**, v. 17, p. 323-326.
- CAMPUZANO, S., et al. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **J. Electroanal. Chem.**, v. 586, p. 112-121, 2006.
- CARUSO, C.S.; VIEIRA, I.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determination of epinefrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Discorea bulbifera*). **Anal. Lett.**, v. 32, p. 39-50, 1999.
- CASTILHO, T. J.; SOTOMAYOR, M. T.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensor based on horseradish peroxidase for biogenic amine determinations in biological samples. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 37, p. 785–791, 2005.
- CHATTOPADHYAY, K.; MAZUMDAR, S. Structural and conformation stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. **Biochemistry**, v. 39, p. 263-270, 2000.
- CHEN, G., et al. Determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations for health-caring purposes by capillary

electrophoresis with electrochemical detection. **Anal. Chim. Acta**, v. 408, p. 249–256, 2000.

CHEN, G., et al. Determination of hesperidin and synephrine in *Pericarpium Citri Reticulatae* by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, p. 169–173, 2002.

CHEN, D.; LI, J. Interfacial design and functionization on metal electrodes through self-assembled monolayers. **Surf. Sci. Rep.**, v. 61, p. 445–463, 2006.

CHICHESTER, B. L. **Procedures in scanning probe microscopies**. England: John Wiley & Sons, Inc. 1998. 672p.

CORNELL, B. A., et al. A biosensor that uses ion-channel switches. **Nature**, v. 387, p. 580–583, 1997.

CRECZYNSKI-PASA, T. B., et al. Characterization of nucleotide binding sites of the isolated H⁺-ATPase from spinach chloroplasts CF₀F₁. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 376, p. 141–148, 2000.

CRECZYNSKI-PASA, T. B., et al. Self- assembled dithiothreitol on Au surfaces for biological applications: phospholipid bilayer formation. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 11, p. 1077–1084, 2009.

CUI, A. L., et al. Preparation of catalytically active enzyme thin film by alternate deposition of horseradish peroxidase and bipolar quaternary ammonium on solid surface. **Mater. Chem. Phys.**, v. 71, p. 23–27, 2001.

CULLISON, J. K., et al. A study of cytochrome *c* oxidase in lipid bilayer membranes on electrode surfaces. **Langmuir**, v. 10, p. 877–882, 1994.

DAHMEN, A., et al. Surface functionalization of amorphous silicon and silicon suboxides for biological applications **Thin Solid Films**, v. 427, p. 201–207, 2003.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, 27, 623–630, 2004.

- DIAO, P., et al. Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and ac impedance. **J. Electroanal. Chem.**, v. 464, p. 61-67, 1999.
- DOUGHERTY, G. M., et al. The zeta potential of surface-functionalized metallic nanorod particles in aqueous solution. **Electrophoresis**, v. 29, p. 1131-1139, 2008.
- DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: John Wiley Sons, 1999. 507 p.
- DURÁN, N., et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasas) immobilized on different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 907-931, 2002.
- ELENDER, G.; KUHNER, M.; SACKMANN E Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers. **Biosens. Bioelectron.**, v. 11, p. 565-577, 1996.
- EL-SHAHAWI, M. S.; BASHAMMAKH, A. S.; EL-MOGY, T. Determination of trace levels of diosmin in a pharmaceutical preparation by adsorptive stripping voltammetry at a glassy carbon electrode. **Anal. Sci.**, v. 22, p. 1351-1354, 2006.
- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, 5 ed., 1988, p. 641.
- FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quim. Nova**, v. 15, p. 28-39, 1992.
- FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Quim. Nova**, v. 25, p. 455-464, 2002.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R., et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chem. Phys. Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.
- FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoenaios. **Quim. Nova**, v. 29, p. 137-142, 2006.

FERREIRA, N. R.; VISSOCI, G.; PENHA-SILVA, N. Efeito da concentração de glicerol, sacarose, sarcosina e sorbitol sobre a extinção molar em 281,5 nm de N-acetil-D, L- triptofano etil éster e N-acetil-D, L- tirosina etil éster. **Biosci. J.**, v. 20, p. 83-91, 2004.

FINKLEA, H. O. In: **Electroanalytical Chemistry**. New York: A. J. BARD, I. RUBINSTEIN Eds. Marcel Dekker: 1996. v. 19, p. 109-335.

FLORIN, E. L.; GAUB, H. E. Painted supported lipid membranes. **Biophys. J.**, v. 64, p. 375-383, 1993.

FRITZEN-GARCIA et al. Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid substrates. **Mater. Sci. Eng., C**, v. 29, p. 405-409, 2009.

GAO, Q.; SUIB, S. L.; RUSLING, J. F. Colloids, helices, and patterned films made from heme proteins and manganese oxide. **Chem. Commun.**, v. 19, p. 2254-2255, 2002.

GARG, A., et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 655-669, 2001.

GARG, A.; KOKKOLI, E. Characterizing particulate drug-delivery carriers with atomic force microscopy. **IEEE Eng. Med. Biol. Mag.**, v. 24, p. 87-95, 2005.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GORTON, L. Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cells. **Electroanalysis**, v. 7, p. 23-45, 1995.

GRIESHABER, D., et al. Electrochemical Biosensors - Sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.

GU, Y., et al. Structural characterization and electron tunneling at n-Si/SiO₂/SAM/liquid interface. **J. Phys. Chem. B**, v. 103, p. 5220-5226, 1999.

HAMMER, D. A.; TIRRELL, M. Biological adhesion at interfaces. **Annu. Rev. Mater. Sci.**, v. 26, p. 651- 691, 1996.

- HEYSE, S., et al. Emerging techniques for investigating molecular interactions at lipid membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1376, p. 319-38, 1998.
- HORNYKIEWICZ, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 70, p. 9-15, 2006.
- HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy**. Park Scientific Instruments. 1996.
- HUANG, W., et al. Hydrogen peroxide biosensor based on microperoxidase-11 entrapped in lipid membrane. **Biosens. Bioelectron.**, v. 18, p. 1225-1230, 2003.
- HUI, S. W., et al. The structure and stability of phospholipid bilayers by atomic force microscopy. **Biophys. J.**, v. 68, p. 171-178, 1995.
- JACHIMSKA, B.; WASILEWSKA, M.; ADAMCZYK, Z. Characterization of globular protein solutions by dynamic light scattering, electrophoretic mobility, and viscosity measurements. **Langmuir**, v. 24, p. 6866-6872, 2008.
- JANSHOFF, A.; STEINEM, C. Transport across artificial membranes—an analytical perspective. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, p. 433-451, 2006.
- JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Vogel – Análise Química Qualitativa**, 5^o edição, LTC – Livros técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, 1992, p.322.
- JIA, H.; ZHU, G.; WANG, P. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 84, p. 406-414, 2003.
- KALCHER, K., et al. Sensors based on carbon-paste in electrochemical analysis - a review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v. 7, p. 5-22, 1995.
- KANAZE, F. I., et al. Simultaneous reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and

pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 33, p. 243-249, 2003.

KHAN, G.F.; WERNET, W. Design of enzyme electrodes for extended use and storage life. **Anal. Chem.**, v. 69, p. 2682-2687, 1997.

KIESSLING, V.; TAMM, L. K. Measuring distances in supported bilayers by fluorescence interference contrast microscopy: polymer supports an snare proteins. **Biophys. J.**, v. 84, p. 408-418, 2003.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chem. Eng. Sci.**, v. 61, p. 1017 – 1026, 2006.

KNOLL, W., et al. Functional tethered lipid bilayers. **Rev. Mol. Biotechnol.**, v. 74, p. 137-158, 2000.

KNOLL, W., et al. Tethered bimolecular lipid membranes-A novel model membrane platform. **Electrochim. Acta**, v. 53, p. 6680–6689, 2008.

KOUTSOPOULOS, S., et al. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. **Langmuir**, v. 23, p. 2000-2006, 2007.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, p. 126-139, 2004.

LABERGE, M., et al. The endogenous calcium ions of horseradish peroxidase C are required to maintain the functional nonplanarity of the heme. **Biophys. J.**, v. 84, p. 2542-2552, 2003.

LANG, H.; DUSCHL, C.; VOGEL, H. A new class of thiolipids for the attachment of lipid bilayers on gold surfaces. **Langmuir**, v. 10, p. 197-210, 1994.

LEADLAY, P. F. **An Introduction to Enzyme Chemistry**. Cambridge: Oxford University. 1993. 82 p.

LEI, Z.; BI, S. Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-b-PAA diblock copolymers. **J. Biotechnol.**, v. 128, p. 112-119, 2007.

LI, J. H., et al. The ion selectivity of monensin incorporated phospholipid/alkanethiol Bilayers. **J. Electroanal. Chem.**, v. 414, p. 17-21, 1996.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **BioSystems**, 77, p. 25-32, 2004.

LI, Q. W.; LUO, G. A.; FENG, J. Direct electron transfer for heme proteins assembled on nanocrystalline TiO₂ film. **Electroanalysis**, v.13, p. 359-363, 2001.

LIU, Y. L., et al. Nanosized flower-like ZnO synthesized by a simple hydrothermal method and an applied as matrix for horseradish peroxidase immobilization for electro-biosensing. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p. 2046-2053, 2005.

LIU, X., et al. Electron transfer reactivity and the catalytic activity of horseradish peroxidase incorporated in dipalmitoylphosphatidic acid films. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 98 -104, 2006.

LOVE, J. C., et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.

LOWE, C. R. Biosensors. **Trends Biotechnol.**, v. 2, p. 59–65, 1984.

LUPETTI, K. O.; RAMOS, L. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação enzimática de dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). **Quim. Nova**, v. 26, p. 197-201, 2003.

LUPETTI, K. O., et al. A zucchini-peroxidase biosensor applied to dopamine determination. **II Farmaco**, v. 60, p. 179-183, 2005.

LVOV, Y., et al. Films of manganese oxide nanoparticles with polycations or myoglobin from alternate-layer adsorption. **Langmuir**, v. 16, p. 8850-8857, 2000.

MA, W.; SUN, D.M. Simultaneous determination of epinephrine and dopamine with poly(L-arginine) modified electrode, **Chin. J. Anal. Chem.**, v. 35, p. 66-70, 2007.

MACDAIRMID, A. R.; GALLAGHER, M. C.; BANKS, J. T. Structure of dithiothreitol monolayers on Au(111). **J. Phys. Chem. B**, v. 107, p. 9789-9792, 2003.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de copaifeira *langsdorffii* desf. com alta atividade. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 735-739, 2006.

MANDLER, D.; TURYAN, I. Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanalysis**, v. 8, p. 207-213, 1996.

MARTÍNEZ, A., et al. Nano-sized latex particles obtained by emulsion polymerization using an amphiphilic block copolymer as surfactant. **Colloids Surf. A**, v. 270-271, p. 67-71, 2005.

MERINO, S., et al. Effects of ciprofloxacin on *Escherichia coli* lipid bilayers: an atomic force microscopy study. **Langmuir**, v. 19, p. 6922-6927, 2003.

MOLNÁR-PERL, I.; FUZFAI, Zs. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **J. Chromatogr., A**, v. 1073, p. 201-227, 2005.

MONTASSER, I.; FESSI, H.; COLEMAN, A. W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 54, p. 281-284, 2002.

MOU, J.; CZAJKOWSKY, D.; SHAO, Z. Gramicidin A aggregation in supported gel state phosphatidylcholine bilayers. **Biochemistry**, v. 35, p. 3222-3226, 1996.

MUNFORD, M. L., et al. AFM *in-situ* characterization of supported phospholipid layers formed by vesicle fusion. **Microsc. Microanal.**, v. 11, p. 90-93, 2005.

MUNRO, J. C.; FRANK, C. W. In situ formation and characterization of poly(ethylene glycol)-supported lipid bilayers on gold surfaces. **Langmuir**, v. 20, p. 10567-10575, 2004.

MURGIDA, D. H.; HILDEBRANDT, P. Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, p. 3773-3784, 2005.

NAUMANN, R., et al. Coupling of proton translocation through ATPase incorporated into supported lipid bilayers to an electrochemical process. **Bioelectrochem. Bioenergetics**, v. 42, p. 241-247, 1997.

OLIVEIRA, I. R. W. Z., et al. Biosensor based on chitosan biopolymer and crude extract of ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) for the determination of hydroquinone in wastewater of photographic process. **Anal. Lett.**, v. 15, p. 3111-3127, 2004.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Development of a biosensor based on gilo peroxidase immobilized on chitosan chemically crosslinked with epichlorohydrin for determination of rutin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 41, p. 366-372, 2006.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Quim. Nova**, v. 29, p. 932-939, 2006.

OLSON, F., et al. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 557, p. 9-23, 1979.

PANDEY, P. C.; ASTON, R. W.; WEETALL, H. H. Tetracyanoquinodimethane mediated glucose sensor based on a self-assembling alkanethiol/phospholipid bilayer. **Biosens. Bioelectron.**, v. 10, p. 669-674, 1995.

PEREIRA, A. C.; KUBOTA, L. T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. **Quim. Nova**, v. 27, p. 725-729, 2004.

PHADTARE, S., et al. Direct assembly of gold nanoparticle “shells” on polyurethane microsphere “cores” and their application as enzyme immobilization templates. **Chem. Mater.**, v. 15, p. 1944-1949, 2003.

PHONG, P. H., et al. Phase separation of ternary self-assembled monolayers into hydrophobic 1-dodecanethiol domains and electrostatically stabilized hydrophilic domains composed of 2-aminoethanethiol and 2-mercaptoethanesulfonic acid on Au (111). **Langmuir**, v. 21, p. 10581-10586, 2005.

PIERRAT, O., et al. Electrochemical and surface plasmon resonance characterization of the step-by-step self-assembly of a biomimetic structure onto an electrode surface. **Langmuir**, v. 13, p. 4112-4118, 1997.

PROUX-DELROUYRE, V., et al. Formation of tethered and streptavidin-supported lipid bilayers on a microporous electrode for the reconstitution of membranes of large surface area. **Langmuir**, v. 18, p. 3263-3272, 2002.

REGALADO, C.; GARCIA-ALMENDÁREZ, B. E.; DUARTE-VÁZQUEZ, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochem. Reviews**, v. 3, p. 243-256, 2004.

REMBBAUM, A.; DREYER, W. J. Immunomicrospheres: reagents for cell labeling and separation. **Science**, v. 208, p. 364-368, 1980.

ROMAŠKEVIČ, T., et al. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, v. 17, p. 74-89, 2006.

ROSATTO, S. S., et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quim. Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

RUZGAS, T., et al. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. **Anal. Chim. Acta**, v. 330, p. 123-138, 1996.

SACKMANN, E. Supported membranes: scientific and practical applications. **Science**, v. 271, p. 43-48, 1996.

SACKMANN, E.; TANAKA, M. Supported membranes on soft polymer cushions: fabrication, characterization and applications. **Trends Biotechnol.** v. 18, p. 58-64, 2000.

SANTOS, A. S., et al. Determination of phenolic compounds based on coimmobilization of methylene blue and HRP on multi-wall carbon nanotube. **Electroanalysis**, v. 19, p. 549-554, 2007.

SAWAGUCHI, T.; SATO, Y.; MIZUTANI, F. Ordered structures of self-assembled monolayers of 3-mercaptopropionic acid on Au(111): *in situ* scanning tunneling microscopy study. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 3, p. 3399-3404, 2001.

SCHMIDT, T. F., et al. Enhanced activity of horseradish peroxidase in Langmuir–Blodgett films of phospholipids. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1778, p. 2291–2297, 2008.

SHAO, Z., et al. Biological atomic force microscopy: what is achieved & what is needed. **Adv. Phys.**, v. 45, p. 1-86, 1996.

SIGL, H., et al. Assembly of polymer/lipid composite films on solids based on hairy rod LB-films. **Eur. Biophys. J.**, v. 25, p. 249-259, 1997.

SIGNORI, C. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Quim. Nova**, v.17, p. 38-42, 1994.

SILVA, R. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior and activity of horseradish peroxidase onto polysaccharide-decorated particles. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 404-409, 2007.

SOARES, C. M. F., et al. Effect of poly (ethylene) glycol and albumin on the immobilization of microbial lipase and catalysis and catalysis in organic media. **Quim. Nova**, v. 26, p. 832-838, 2003.

SOLANKI, P. R., et al. Application of self-assembled monolayer of 10-carboxy-1-decanethiol for cholesterol biossensor. **J. Biomed. Pharm. Eng.**, v. 2, p. 7-13, 2008.

SOTIROPOULOU, S., et al. Novel carbon materials in biossensor systems. **Biosens. Bioelectron.**, v. 18, p. 211-215, 2003.

SOUZA, D., et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. **Quim. Nova**, v. 27, p. 790-797, 2004.

SUDOL, E.D.; EL-AASSER, M.S. **Emulsion polymerization and emulsion polymers**. Chichester. 1997. 699 p.

TAKAHASHI, H., et al. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. **Chem. Mater.**, v. 12, p. 3301-3305, 2000.

TAMM, L. K.; McCONNELL, H. M. Supported phospholipid bilayers. **Biophys. J.**, v. 47, p. 105-113, 1985.

TAMM, L. K., et al. Nanostructure of supported phospholipid monolayers and bilayers by scanning probe microscopy. **Thin Solid Films**, v. 284, p. 813-816, 1996.

TANG, J., et al. Conformation change of horseradish peroxidase in lipid membranes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 120, p. 119-129, 2002.

TIEN, H. T.; OTTOVA, A. L. Supported planar lipid bilayers (s-BLMs) as electrochemical biosensors. **Electrochim. Acta**, v. 43, p. 3587-3610, 1998.

TIMBOLA, A. K., et al. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 139-148, 2006.

TISCHER, W.; WEDEKIND, F. Immobilized enzymes: methods and applications. **Top. Curr. Chem.**, v. 200, p. 95-126, 1999.

TOKUMASU, F.; JIN, A.; DVORAK, J. A. Lipid membrane phase behaviour elucidated in real time by controlled environment atomic force microscopy. **J. Electron Microsc.**, v. 51, p. 1-9, 2002.

UCHIYAMA, S., et al. A catechol electrode based on spinach leaves. **Anal. Chim. Acta**, v. 208, p. 291-294, 1988.

VAN DE VELDE, F., et al. Carrageenan: A food-grade and biocompatible support for immobilisation techniques. **Adv. Synth. Catal.**, v. 344, p. 815-835, 2002.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, p. 249-259, 2004.

VELA, M. E., et al. Electrodesorption kinetics and molecular interactions in well-ordered thiol adlayers on Au(111). **J. Phys. Chem. B**, v. 104, p. 11878-11882, 2000.

VERICAT, C.; VELA, M. E.; SALVAREZZA, R. C. Self-assembled monolayers of alkanethiols on Au(111): surface structures, defects and dynamics. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 7, p. 3258-3268, 2005.

VESELOVA, I. A.; SHEKHOVTSOVA, T. N. Visual determination of lead (II) by inhibition of alkaline phosphatase immobilized on polyurethane foam. **Anal. Chim. Acta.**, v. 413, p. 95-101, 2000.

VIEIRA, I. C.; FATIBELLO-FILHO O.; AGNES, L. Zucchini crude extract palladium-modified carbon paste electrode for the determination of hydroquinone in photographic developers. **Anal. Chim. Acta**, v. 398, p. 145-151, 1999.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Quim. Nova**, v. 26, p. 39-43, 2003.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 1 ed. New York: John Wiley & Sons. 1990. 1242 p.

XU, G. et al. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. **Food Chem.**, v. 106, p. 545-551, 2008.

XU, Z.; CHEN, X.; DONG, S. Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices. **Trends Anal. Chem.**, v. 25, p. 899-908, 2006.

WAGNER, M. L.; TAMM, L. K. Tethered polymer-supported planar lipid bilayers for reconstitution of integral membrane proteins: silane-polyethyleneglycol-lipid as a cushion and covalent linker. **Biophys. J.**, v. 79, p. 1400-1414, 2000.

WANG, J., et al. Electrochemical surface plasmon resonance detection of enzymatic reaction in bilayer lipid membranes. **Talanta**, v. 75, p. 666-670, 2008.

WELINDER, K. G. Covalent structure of glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7). **Febs Lett.**, v. 72, p. 19-23, 1976.

WIEGAND, G., et al. Studies of structure and local wetting properties on heterogeneous, micropatterned solid surfaces by microinterferometry. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 196, p. 299–312, 1997.

WOJCIECHOWSKI, P. W.; BRASH, J. L. A computer simulation for the study of macromolecular adsorption with special applications to single-component protein adsorption. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 140, p. 239–252, 1990.

WU, S.; LIU, B.; LI, S. Behaviors of enzyme immobilization onto functional microspheres. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 37, p. 263-267, 2005.

WU, Z., et al. A facile approach to immobilize protein for biosensor: self-assembled supported bilayer lipid membranes on glassy carbon electrode. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, p. 47-52, 2001

YASUDA, M., et al. Enzyme immobilization on amphiphilic polymer particles having grafted polyionic polymer chains. **Biochem. Eng. J.**, v. 48, p. 6-12, 2009.

YOSHITAKE, T., et al. High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin, noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex, **J. Neurosci. Methods**, v. 140, p. 163-168, 2004.

ZANETTI-RAMOS, B. G., et al. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. **Polymer**, v. 47, p. 8080-8087, 2006.

ZANETTI-RAMOS, B. G., et al. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane nanoparticles. **Mater. Sci. Eng., C**, v. 28, p. 526–531, 2008.

ZANETTI-RAMOS, B. G., et al. Dynamic light scattering and atomic force microscopy techniques for size determination of polyurethane nanoparticles, **Mater. Sci. Eng., C**, v. 29, p. 638-640, 2009.

ZASADZINSKI, J. A. N., et al. Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. **Biophys. J.**, v. 69, p. 755–760, 1991.

ZHOU, Y. L., et al. Heme protein-clay films: direct electrochemistry and electrochemical catalysis. **Langmuir**, 18, 211-219, 2002.