



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE HEPATOPATIAS

Autora: SABRINA NUNES VIEIRA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO MARCOS MADURRO

Co-Orientadora: Profa. Dra. ANA GRACI BRITO-MADURRO

UBERLÂNDIA
- 2007 -



CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS PARA DETECÇÃO DE HEPATOPATIAS

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Autora: SABRINA NUNES VIEIRA

Orientador: Prof. Dr. JOÃO MARCOS MADURRO

Co-orientadora: Profa. Dra. ANA GRACI BRITO-MADURRO

Curso: QUÍMICA

Área de Concentração: QUÍMICA ORGÂNICA

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amor à vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que nos foi ensinado pelo tempo afora. Lembraria os erros que foram cometidos, como sinais para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável: alem do pão, o trabalho e a ação. E, quando tudo mais faltasse, para você eu deixaria, se pudesse, um segredo. O de buscar no interior de si mesmo a resposta para encontrar a saída."

(Mahatma Ghandi)

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ter sido finalizado sem prestar minha homenagem a algumas pessoas, às quais julgo terem contribuído de algum modo, para o êxito alcançado:

- ✓ *A Deus pelo Dom da vida e por sempre estar comigo nos momentos mais difíceis.*
- ✓ *Ao meu amado pai Nilson (in memorian) pelo exemplo de luta, força, coragem e determinação, minha eterna gratidão.*
- ✓ *A minha querida mãe Jalcira por sempre me incentivar, e por nunca ter me abandonado nesta longa estrada da vida, minha eterna gratidão.*
- ✓ *A minha irmã Simone e ao meu cunhado Arilson pelo apoio, confiança, dedicação que me fizeram resistir durante esses anos de luta.*
- ✓ *Aos meus sobrinhos Allan e Arthur que com toda inocência me ensinaram a ser uma pessoa melhor.*
- ✓ *À minha avó Maria Aparecida que sempre acreditou em mim.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. João Marcos Madurro, meu orientador, e à Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro, minha co-orientadora, pela orientação, oportunidades, apoio e companheirismo durante a execução deste trabalho.*
- ✓ *Ao Lucas meu colega de laboratório que durante todo tempo contribuiu para este trabalho me ensinando desde uma simples correção de formatação até a mais difícil arte da escolha.*
- ✓ *Em especial aos grandes amigos e colegas de laboratório: Carla, Daniel (Cabeça), Leandra, Tatiana (Pink), Tatiana Bessa, Diego, Cláudio, Wallans, André, Érika, Almir e Jardel, e demais amigos pelos quais não são reportados nestas linhas pela amizade e pelos momentos de descontração e alegria que me fizeram parar e tomar fôlego para seguir adiante.*
- ✓ *Aos meus primos, Márcia, Gilva, Egláia, Bruno, Juliana, Joel, Denise, Thiago, Helen, Elizama, Elienai, Maria Luiza, Tâmera, Davi e Daniel por serem mais que primos serem meus verdadeiros amigos.*
- ✓ *Aos meus tios, padrinhos e demais companheiros que sempre torceram, mesmo à distância, para minha formação, meu obrigado.*
- ✓ *À Marina, secretária do Curso de Pós-Graduação em Química, pela paciência, colaboração e grande demonstração de amizade.*
- ✓ *Aos membros da Banca pela aceitação e valiosas contribuições concedidas para o aprimoramento do trabalho desenvolvido.*
- ✓ *A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, meu muito obrigado.*
- ✓ *Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo espaço físico concedido.*

Sumário

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS.....	v
NOMENCLATURA.....	vi

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO 1

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. ELETRODOS MODIFICADOS	2
1.2. FILMES POLIMÉRICOS	4
1.3. BIOSSENSORES	6
1.3.1 - Biosensor enzimático:.....	7
1.3.2 - Imunossensor:	8
1.3.3 - Biosensor microbiológico:.....	8
1.3.4 - Biosensor baseado em DNA:.....	9
1.3.5 - Células animais e vegetais:	9
1.4 - PROCEDIMENTOS CONVENCIONAIS DE IMOBILIZAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS.....	10
1.4.1 - Adsorção física:.....	10
1.4.2 – Aprisionamento:	11
1.4.3 – Ligação cruzada.....	11
1.4.4 – Ligação Covalente:	11
1.5 – TIPOS DE TRANSDUTORES	12
1.5.1 - Transdutores eletroquímicos	12
1.5.2 - Transdutores Térmicos	14
1.5.3 - Transdutores ópticos	14
1.5.3 - Transdutores detectores de massa	14
1.6 - HEPATOPATIAS	15
1.6.1 - Cirrose hepática:.....	16
1.6.2 - Câncer de fígado:	16
1.6.3 - Hepatite:	16

1.6.4 - Encefalopatia hepática:	16
1.7. DIAGNÓSTICO DAS HEPATOPATIAS	17
1.7.1 – Reação da alanina aminotransferase (ALT)	17
1.8 OBJETIVOS.....	19

CAPÍTULO 2- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 21

2.1 - REAGENTES UTILIZADOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2.2 – SOLUÇÕES UTILIZADAS.....	21
2.3 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:.....	22
2.3.1 – Experimentos de eletropolimerização:	22
2.3.2 – Experimentos para caracterização dos filmes formados:	22
2.4 - PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO:.....	22
2.4.1 – Eletrodos de disco de grafite:	23
2.4.2 - Eletrodos de pasta de grafite:	23
2.4.3 - Sistema a base de tinta de grafite condutora:	24
2.4.3.1 - Eletrodos de prata/cloreto de prata:.....	24
2.4.4 - Eletrodos de ouro a partir de CD's:.....	25
2.4.5 – Eletrodos de ouro em barra:	25
2.5 - REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS:	25
2.5.1 – Células eletroquímicas utilizadas	25
2.5.2 - Limpeza da vidraria.....	26
2.5.3 - Ensaio sobre eletrodo de grafite:	26
2.5.4 - Ensaio sobre eletrodo de ouro:	28
2.5.5 - Ensaio sobre eletrodo de pasta de grafite:	29
2.5.6 - Ensaio sobre eletrodo de tinta condutora de grafite	29

CAPÍTULO 3:RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 31

3.1 - VARIAÇÃO ESTRUTURAL DO MONÔMERO 4-AMINOFENOL COM A VARIAÇÃO DE PH:	32
3.2 - ESTUDO DO FILME SOBRE ELETRODO DE DISCO DE GRAFITE:.....	34
3.2.1 - Estudo em diferentes valores de pH da solução monomérica:.....	34
3.2.2 - Estudo com diferentes potenciais anódicos limite:	42
3.2.3 Estudo com diferentes faixas de varredura de potencial em diferentes pH:..	45

3.2.4 - Estudo de incorporação dos substratos nas diferentes filmes formados:	47
3.3 ESTUDO DE DETECÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO ELETRODOS DE PASTA DE GRAFITE:	50
3.4 - ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO ELETRODOS DE OURO:	52
3.5 - ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO SISTEMA A BASE DE TINTA DE GRAFITE CONDUTORA:	52
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES	55
4.1. CONCLUSÕES	55
4.2. PROPOSTAS DE CONTINUIDADE.....	55
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

Eletrodos modificados podem ser usados em interações seletivas, pré-concentração, eletrocatalise, membranas permisseletivas e incorporação de biomoléculas, contribuindo desta forma para aumentar a sensibilidade e seletividade de uma medida analítica.

Filmes poliméricos representam uma alternativa na modificação de um eletrodo. Polímeros não condutores apresentam alta resistividade, o que torna o crescimento destes filmes limitado, oferecendo uma baixa barreira difusional. Estes polímeros são usados como membranas permisseletivas evitando a aproximação de uma espécie interferente da superfície eletródica. Polímeros condutores apresentam propriedades incomuns como condutividade elétrica, baixa energia de transmissão ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica. Estes polímeros são chamados de metais sintéticos, pois são polímeros com propriedades eletrônicas similar às dos metais. O uso de filmes poliméricos condutores e não condutores têm atraído considerável interesse no desenvolvimento de biossensores amperométricos, devido às suas propriedades únicas.

Biosensor é um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento biológico intimamente acoplado a um transdutor. Biossensores oferecem algumas vantagens como alta sensibilidade, resposta em tempo real, potencial para miniaturização, alta seletividade, possibilidade de monitoramento *in situ*, fácil manuseio, o que justifica seu emprego em medidas analíticas.

Biossensores representam uma ferramenta promissora na detecção de hepatopatias devido as suas características únicas como a possibilidade de construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento *on site* rápido. Desta forma o uso de biossensores possibilita o diagnóstico precoce de hepatopatias, que formam um grupo de doenças que ocasionam um grande número de óbitos.

Este trabalho se propõe a contribuir para o desenvolvimento de um biossensor para a detecção de doenças que afetam o fígado. Este biossensor será construído com base em um eletrodo modificado com filme polimérico derivado de 4-aminofenol depositado eletroquimicamente, ao qual serão incorporados *L*-alanina e α -cetoglutarato como elementos de reconhecimento de alanina aminotransferase (ALT), enzima presente em grande quantidade no sangue de humanos acometidos por algum tipo de lesão hepática.

ABSTRACT

Modified electrodes can be used in selective interactions, pre-concentration, electrocatalysis, permselective membranes and incorporation of biomolecules, contributing, in this way, to increase the sensibility and selectivity of an analytical measurement.

Polymeric films represent an alternative in the modification of an electrode. Non-conducting polymers presents high resistivity, which limits the films growing, offering a low diffusional barrier. These polymers are used as permselective membranes avoiding the approach of interferent species on the electrode surface. Conducting polymers presents unusual properties as electric conductivity, low energy of optical transmission, low ionization potential and high electronic affinity. These polymers are called synthetical metals because they have electronic properties similar to that one from metals. The use of conducting and non-conducting polymeric films has attracted considerable interest on the development of amperometric biosensors, due to its unique properties.

Biosensor is a device that employs a biological recognition element attached to a transducer. Biosensors offers some advantages as high sensibility and selectivity, response in real time, potential to be miniaturized, possibility to an *in situ* monitration, easily handed, which justify its employ in analytical measurements.

Biosensors represents a promising tool in the detection of hepatopathies due to its unique characteristics as the possibility of the construction of simple and portable devices to an fast *on site* monitration. In this way, the use of biosensors enables a precocious diagnosis of hepatopathies, belonging in a group of illnesses that causes a great number of deaths.

This work proposes to contribute to the development of a biosensor to the detection of diseases that attacks the liver. This biosensor will be constructed as a modified electrode with a polymeric film from 4-aminophenol, electrochemically deposited, in which will be incorporated L-alanine and α -ketoglutarate as recognition elements of alanine aminotransferase (ALT), enzyme presents in a great amount in human blood attacked by any kind of hepatic injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol	5
Figura 2: esquema representativo de um biossensor	6
Figura 3: reação de transaminação	17
Figura 4: eletrodo de disco de grafite	23
Figura 5: sistema eletroquímico para eletrodos de pasta de carbono	23
Figura 6: sistema eletroquímico a base de tinta de grafite condutora e eletrodo de Ag/AgCl	24
Figura 7: célula eletroquímica de três compartimentos	26
Figura 8: curva de titulação de 4-aminofenol com NaOH	32
Figura 9: espectro de UV de 4-aminofenol em solução aquosa em pH 0,4; 8,0; 12,0 ..	33
Figura 10: voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol, pH 0,4	34
Figura 11: voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol, pH 8,0	35
Figura 12: voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol, pH 12,0	36
Figura 13: voltamograma cíclico em solução aquosa contendo $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$ e KNO_3 , eletrodo de disco de grafite e eletrodos modificados com poli(4-aminofenol)	37
Figura 14: diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $Fe(CN)_6^{3-}$ / $Fe(CN)_6^{4-}$ e solução de KCl para os eletrodos de grafite com poli(4-aminofenol)	38
Figura 15: microscopia eletrônica de varredura de eletrodo de grafite descoberto e eletrodo modificado com poli(4-aminofenol)	41
Figura 16: voltamograma cíclico de eletrodo de grafite não-modificado, e modificados com poli(4-aminofenol) em solução de ácido perclórico 0,5	42
Figura 17: primeira varredura de potencial do 4-aminofenol em solução de ácido perclórico, pH 0,4	42
Figura 18: voltamogramas cíclicos obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol	43

Figura 19: voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite com e sem modificação em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KNO_3	44
Figura 20: voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite com e sem modificação em $HClO_4$	44
Figura 21: primeiras varreduras de potencial do 4-aminofenol em diferentes pH do meio reacional	45
Figura 22: voltamograma cíclico de eletrodos de grafite modificados e não-modificados em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KNO_3	46
Figura 23: voltamograma cíclico de eletrodos de grafite modificados e não-modificados em solução de $HClO_4$	46
Figura 24: voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite modificados com poli-4-aminofenol em diferentes condições, sensibilizados com os substratos separadamente, em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6/KNO_3$	48
Figura 25: estruturas de (A) L-alanina e (B) α -cetoglutarato.....	48
Figura 26: voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite modificados com poli-4-aminofenol, sensibilizados com os dois substratos, em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6/KNO_3$	49
Figura 27: voltamogramas de pulso diferencial em eletrodo de pasta de carbono de eletrodo sem amostra e eletrodos com os diferentes substratos.....	51
Figura 28: curva de titulação da L-alanina com $NaOH$	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais causas de morte por sexo da população total e de 35 a 59 anos no Estado de São Paulo .Triênio 2000 – 2002	15
Tabela 2: Valores de comprimento de onda do espectro de UV de 4-aminofenol em diferentes valores de pH.....	33
Tabela 3: Valores de resistência e capacidade para o sistema eletrodo/ polímero/ eletrólito.....	39

Nomenclatura

Letras Gregas

Ω – ohm – resistência elétrica

λ – comprimento de onda (nm)

μ – micro (10^{-6})

Abreviações

ALT – enzima alanina aminotransferase

VC – Voltametria cíclica

EQM – Eletrodo quimicamente modificado

PC – Polímero condutor

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

CAPÍTULO 1:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS DO TRABALHO

1. INTRODUÇÃO

1.1. ELETRODOS MODIFICADOS

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray e colaboradores em 1975, sendo que esta modificação da superfície objetiva pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações [1].

Há várias vantagens para os EQM's, entre estas se destacam as interações seletivas e pré-concentração de um analito na camada modificadora, eletrocatalise de reações redox de um analito com transferência lenta de elétrons sobre o eletrodo base, permesseletividade com uso de membranas para inibir interferentes eletroativos, detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox, incorporação de biomoléculas, particularmente enzimas, no desenvolvimento de biossensores, incorporação de monocamadas em grupamentos pré-definidos em eletrodos auto arranjados [2,3], bem como a incorporação de bicamadas lipídicas e monocamadas fosfolipídicas [4], explorando a permeabilidade destas membranas biológicas. Em termos analíticos, a sensibilidade ou seletividade de uma determinação deve aumentar com a utilização de um EQM para que seu emprego seja justificado [1].

Sabe-se que as informações obtidas com o uso de técnicas eletroanalíticas são dependentes da superfície eletródica, e devem apresentar elevada razão sinal-ruído e boa reproduzibilidade. Portanto o eletrodo de trabalho a ser utilizado depende de dois fatores: do comportamento redox do analito e das correntes residuais obtidas no intervalo de potencial avaliado. Também se deve considerar a janela de potencial de trabalho, condutividade elétrica, reproduzibilidade da superfície, propriedades mecânicas, custo de fabricação, disponibilidade e toxicidade [5].

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante para preparação de um EQM. Esta matriz deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais podemos citar ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono, pasta de

carbono, carbono grafite, carbono reticulado, material plástico condutor e vidros condutores [6].

A importância da escolha do material do eletrodo de trabalho também se deve ao fato de que as respostas obtidas estão relacionadas com reações redox que ocorrem na superfície ou interface eletrodo-solução. Desta forma, o analito de interesse pode interagir com a superfície eletródica, resultando numa transferência eletrônica. Entretanto, se a transferência for muito lenta, não ocorrer ou ocorrer em valores de potencial fora da janela de potencial do eletrodo, é possível realizar uma modificação na superfície eletródica a fim de melhorar a resposta final, onde o analito irá interagir diretamente com o agente modificador [5].

Esta grande variedade de materiais e possibilidades de combiná-los proporciona um grande campo de atuação destes dispositivos, sendo até mesmo utilizados em ambientes diversos, tais como o líquido intra-celular ou durante a aplicação de um ultramicroeletrodo em medidas clínicas [7,8].

A modificação dos eletrodos pode ser feita através de: ligação covalente [9], onde o modificador é ligado covalentemente ao substrato; adsorção [10], onde o eletrodo é exposto a uma solução contendo o agente modificador; imobilização por oclusão [11], imobilizando o agente modificador através da oclusão em gel; materiais compósitos [12], que são formados pela combinação de duas ou mais fases de diferentes naturezas; uso de filmes poliméricos, os quais são eletrogerados na superfície do eletrodo, e podem ter diferentes características [13].

Eletrodos preparados à base de pasta de carbono apresentam algumas vantagens sobre os demais eletrodos, como versatilidade, baixa corrente de fundo, baixo ruído, baixo custo, além de uma grande variedade de modificação da superfície bem como a facilidade na renovação da superfície [6].

A pasta de carbono é uma mistura composta de pó de grafite e um aglutinante. O pó de grafite deve apresentar 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, eletroinativo, imiscível com a solução do analito e deve preencher os interstícios entre as partículas de grafite e “isolar” o mesmo do contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa, com muitas possibilidades de interações. O desenvolvimento do eletrodo de pasta de carbono modificado com enzimas possui vantagens de diminuir o limite de detecção do analito

de interesse e aumentar a seletividade das determinações. Revisões sobre eletrodos de pasta de carbono e eletrodos modificados com peroxidase foram publicadas [14-15].

O primeiro eletrodo de pasta de carbono modificado com enzima (glicose oxidase) foi proposto apenas no final da década de 80 [16], e desde então vários biossensores foram desenvolvidos usando diversos materiais biológicos [17-18].

1.2. FILMES POLIMÉRICOS

Polímeros não condutores como polifenol e poli(*o*-fenilenodiamino) surgiram como uma nova classe de matriz de suporte para imobilização de biomoléculas [20-21]. Estes apresentam alta resistividade e são preparados por eletropolimerização. O crescimento de tais polímeros é limitado e o filme formado é muito mais fino que os típicos condutores. Devido à espessura limitada (cerca de 10-100 nm) substratos e produtos se difundem rapidamente, conferindo aos biossensores uma resposta mais rápida [22]. Esses filmes são permisseletivos e podem ser usados para evitar que espécies interferentes ou contaminantes cheguem na superfície do eletrodo. Rápida resposta e alta seletividade podem ser esperadas de um sensor baseado em polímeros não condutores [23].

Polímeros condutores (PCs) contém elétrons- π conjugados, responsáveis por suas propriedades incomuns tais como condutividade elétrica, baixa energia de transmissão ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica, propriedades até então só encontradas em materiais inorgânicos. Estes polímeros podem ser chamados de “metais sintéticos”, pois são polímeros policonjugados com propriedades eletrônicas (magnéticas, condutoras e óticas) similar às dos metais, mas mantêm as propriedades convencionais dos polímeros orgânicos. PCs exibem faixa de condutividade eletrônica intrínseca (cerca de 10^{-14} a 10^2 S.cm $^{-1}$) devido a diferentes mecanismos de extensão de conjugação do estado dopado [24]. Polímeros condutores foram descobertos a cerca de trinta anos, e suas propriedades eletroquímicas únicas tem atraído considerável interesse no desenvolvimento de biossensores amperométricos [25].

A eletropolimerização de polímeros condutores, tais como polipirrol, polianilina, poliacetileno, politiofeno entre outros, tem sido extensivamente estudada para o desenvolvimento de biossensores [13,24,26] visto que os mesmos apresentam alta

condutividade e estabilidade tanto no ar quanto em solução aquosa. A espessura do filme e a quantidade de biomoléculas imobilizadas podem ser facilmente controladas pela passagem de carga durante a eletropolimerização.

Aminofenóis têm-se apresentado como compostos promissores em estudos eletroquímicos, uma vez que esses compostos apresentam dois grupos substituintes diferentes no anel aromático, os quais são química e eletroquimicamente ativos ($-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$), e portanto podem apresentar comportamento eletroquímico semelhante ao da anilina ou do fenol [27-29]. Monômeros derivados de fenol, como 3-nitrofenol, são eletropolimerizados gerando filmes eletroinativos com maior caráter hidrofóbico, quando comparado a um polifenol regular [13].

Hawley e Adams [30] sugeriram que a eletrooxidação do 4-aminofenol envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo a quinoneimina, e num próximo passo ela sofre hidrólise produzindo a 4-benzoquinona. Os autores sugerem também que uma segunda reação química entre a 4-benzoquinona e 4-aminofenol se torna importante à medida que o valor de pH aumenta, fazendo possível a ocorrência de reação de acoplamento 1,4, e a geração de filme sobre a superfície do eletrodo [31].

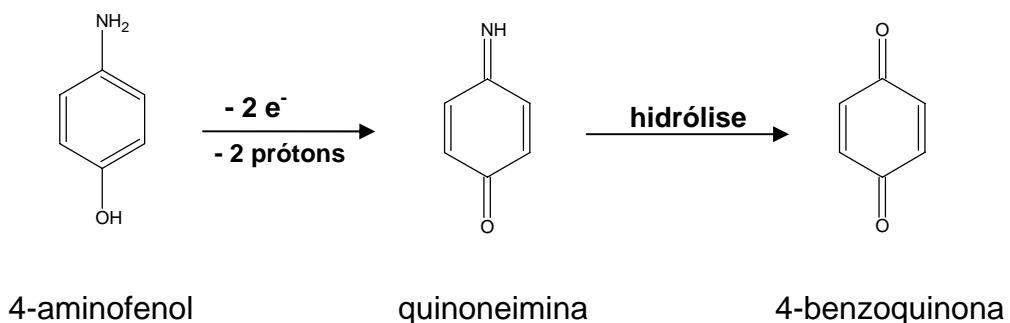


Figura 2: Reação de eletrooxidação do 4-aminofenol

Um fator interessante relatado sobre alguns polímeros eletroativos é a influência drástica do pH do meio em sua resposta eletroquímica. Devido a diferença na protonação dos grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}_2$ de acordo com o pH do meio, podem ser obtidos diferentes filmes poliméricos na superfície do eletrodo [32].

1.3. BIOSSENSORES

Os primeiros estudos sobre desenvolvimento de biosensores iniciaram-se no século passado. O primeiro biosensor, conhecido como “eletrodo enzimático”, foi demonstrado por Clark e Lions em 1962 [33]. A enzima glicose oxidase foi acoplada a um eletrodo para medida de P_{O_2} . Na reação enzimática de oxidação da glicose, há um consumo de oxigênio proporcional à concentração do substrato. Esta variação na P_{O_2} era reconhecida pelo eletrodo, o que determinava a quantidade de glicose no meio [34].

Dessa idéia, pode-se definir um biosensor como um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento intimamente acoplado a um transdutor (ver Figura 1). Este componente é responsável pela interação seletiva com o analito de interesse, sendo a parte crítica desses dispositivos. O transdutor tem como objetivo converter a energia do evento de reconhecimento em um sinal mensurável [35-37].

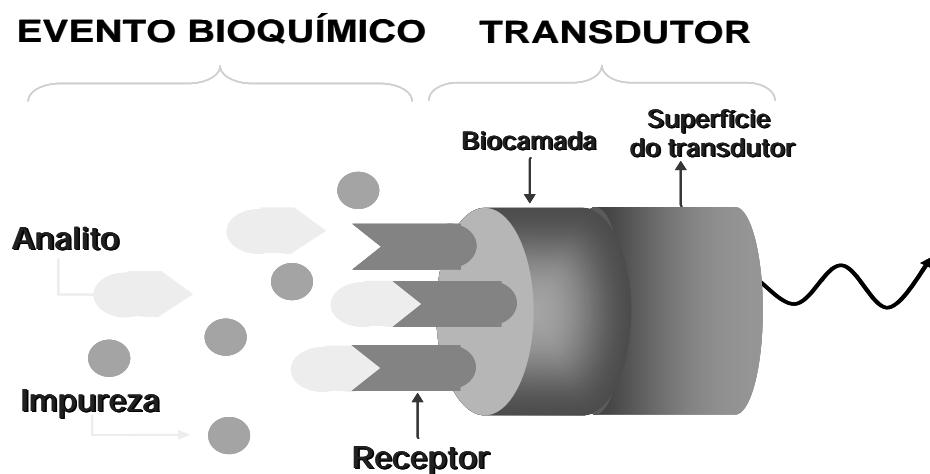


Figura 2: Esquema representativo de um biosensor.

Os materiais receptores bioativos usados como elementos de reconhecimento podem ser ácidos nucléicos [38], organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismos, lectina, células [39], enzimas, antígenos ou anticorpos [40].

De acordo com o transdutor utilizado, o biosensor pode ser classificado como eletroquímico, térmico, óptico e detector de massa [1,39,41].

Conforme o tipo de interação que ocorre entre as substâncias a serem detectadas e o material biológico, o biosensor é classificado como catalítico (quando uma enzima,

por exemplo, catalisa uma reação) ou de afinidade (quando há reconhecimento de um elemento, por exemplo fragmentos de DNA) [34].

A função de um biossensor depende da especificidade bioquímica do material biologicamente ativo. A escolha deste material vai depender de vários fatores visando à especificidade, estocagem e estabilidade operacional e ambiental. A seleção também depende do analito a ser detectado [42].

1.3.1 - Biossensor enzimático: é um dispositivo que combina sensibilidade e seletividade de uma enzima com um transdutor. As etapas fundamentais no desenvolvimento desse tipo de sensor são a imobilização e estabilização das enzimas sobre a superfície da matriz, no intuito de melhorar a estabilidade química destes materiais responsáveis pelo reconhecimento [1,43,44].

Sabe-se que enzimas são estruturas complexas, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes requerem cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar catálises bioquímicas [45]. Todas as enzimas possuem centros ativos. Neste local, processam-se as reações específicas com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de resíduos de aminoácidos de uma cadeia de proteína, e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica da enzima. Algumas enzimas dependem somente da sua própria estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos (metaloenzimas) ou moléculas orgânicas (coenzimas) ou ambos. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima [46-55].

Vários estudos para o desenvolvimento de biossensores utilizam extratos brutos e/ou tecidos de vegetais em substituição as enzimas purificadas, em procedimentos bioanalíticos. O uso de extratos brutos pode apresentar, em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico, mas por outro lado é extremamente econômico, simples, e geralmente possui um tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que essas enzimas naturalmente imobilizadas nas células desses materiais biológicos (seu “habitat” natural) são mais estáveis. Além dessas vantagens, esses procedimentos geralmente não necessitam de cofatores, pois os extratos brutos empregados normalmente já possuem cofatores naturais para a reação enzimática do analito de interesse [14].

1.3.2 - Imunossensor: é um tipo de biosensor baseado em uma reação imunológica específica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor [39/56]. Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominada imunoglobulinas. Estes são produzidos pelos animais em resposta à presença de substâncias estranhas, denominadas imunógenos ou antígenos [39].

No imunoensaio, o sítio combinatório do anticorpo interage especificamente com porções mais superficiais (determinantes antigênicos) do antígeno (substância não protética de baixo peso molecular que pode se ligar a sítios específicos de combinação de anticorpos), formando um complexo antígeno-anticorpo. Esta interação é caracterizada por uma constante de afinidade que é função das concentrações do complexo formado, do antígeno e do anticorpo livres no meio de reação. Essa interação é mantida por ligações de hidrogênio, forças eletrodinâmicas (Van der Waals) e hidrofóbicas, garantindo o fenômeno da especificidade antígeno-anticorpo [57-59].

Os imunoensaios são classificados como homogêneos, quando para a detecção não se faz necessária a separação entre espécies marcadas e livres, e heterogêneos quando se necessita para a quantificação precisa, de uma etapa adicional para separação das frações livres e ligadas da espécie marcada [60].

1.3.3 - Biosensor microbiológico: consiste de um transdutor em conjunto com uma célula microbiológica imobilizada [61]. Microrganismos têm um grande número de vantagens como componentes biológicos para construção de biosensores. O uso de células microbiológicas como biocatalisadores tem vantagem sobre células livres e sobre enzimas imobilizadas [62]. Esses componentes biológicos estão sempre presentes, sendo capazes de metabolizar uma larga escala de compostos químicos, além de terem uma ótima capacidade de se adaptar a condições adversas e desenvolver a habilidade de degradar novas moléculas com o tempo. Micróbios são também suscetíveis a modificações genéticas através da tecnologia do DNA recombinante. Esta técnica produz microrganismos com atividades enzimáticas alteradas e servem como uma fonte econômica de enzimas intracelulares [61,63].

A utilização de microorganismos evita as etapas de purificação e preserva a enzima em seu ambiente natural, protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos, tais como metais pesados [61,63].

O uso de células é limitado pela baixa especificidade quando comparado com os biosensores contendo a enzima pura, e pelo maior tempo de resposta. No entanto,

quando a célula é permeabilizada, a maioria dos cofatores de baixo peso molecular sai da célula, minimizando reações não desejadas [61,63]. No caso da enzima de interesse estar localizada no periplasma as células podem ser empregadas sem permeabilização [42].

1.3.4 - Biossensor baseado em DNA: são dispositivos constituídos de oligonucleotídeos, produtos de PCR ou DNA immobilizados na superfície e conectados a um transdutor. Esse tipo de biossensor pode detectar a presença de genes específicos ou genes mutantes associados a doenças humanas hereditárias [64].

A detecção eletroquímica de DNA se dá de duas formas: por oxidação direta ou catalisada, de bases de DNA; ou por resposta eletroquímica gerada por enzima ou outro marcador redox por uma reação específica com o alvo do DNA [65].

O recente mapeamento da seqüência do genoma de vários organismos, incluindo o genoma humano, possibilitou o desenvolvimento de novas metodologias para detecção de DNA e seus polimorfismos. A maioria dos métodos desenvolvidos até agora tem sido baseados na immobilização de pequenos fragmentos de oligodeoxinucleotídeos (ODN) em uma superfície sólida composta de metal, óxidos, carbono vítreo, ou polímeros [66-70]. A análise de segmentos desconhecidos de DNA consiste em colocar em contato estes seguimentos com sondas de seqüências conhecidas de DNA, as quais se ligarão complementarmente à seqüência contida no seguimento de análise [71].

A excepcional especificidade que surge da habilidade inerente das moléculas complementares de DNA em se duplicar ou hibridizar pelo pareamento de bases, oferece uma maneira simples de detectar seqüências marcadas de DNA em uma amostra. Novas tecnologias de biosensores têm sido intensivamente investigadas devido a sua promissora rapidez e baixo custo dos testes envolvendo DNA. Essas tecnologias baseiam-se na immobilização de um filamento de DNA em diferentes transdutores físico-químicos que convertem o evento da hibridização num sinal elétrico ou óptico. Aplicações para essa tecnologia incluem identificação de patógenos, monitoramento de expressão de genes e diagnóstico de desordens genéticas [42].

1.3.5 – Biosensor baseado em células animais e vegetais: a motivação para o desenvolvimento de biosensores baseados em células microbianas se origina do desejo de analisar alvos para detecção de efeitos fisiológicos. Ao usar células vivas intactas

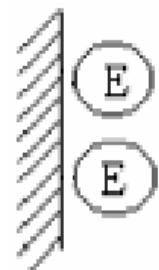
como sensores, agentes podem ser analisados pela atividade funcional, sem requerer conhecimento específico do agente químico. A análise funcional de agentes desconhecidos fornece benefícios em muitas aplicações, tais como farmacologia, biologia celular, toxicologia e monitoramento ambiental [72-74].

O ambiente que cerca as células exerce grande influência na sua atividade metabólica. Caso existam substâncias tóxicas na amostra analisada, causará um distúrbio no metabolismo e esse efeito pode ser transformado em sinais elétricos. Por exemplo, biossensores cujo material biológico são algas usam a fluorescência da clorofila como sinal a ser medido. A absorção de luz acontece nos pigmentos da membrana tilacóide. A energia é transferida para os centros de reação dos fotossistemas e é usada pelos organismos para produção de ATP. A maioria dos herbicidas inibe o transporte de elétrons do sistema fotoativo, fazendo com que a fluorescência da clorofila aumente significativamente. Esse aumento pode ser medido e correlacionado com a concentração de poluente [75].

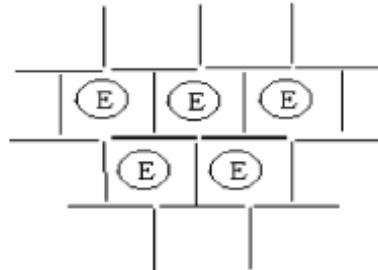
1.4 - PROCEDIMENTOS CONVENCIONAIS DE IMOBILIZAÇÃO DAS BIOMOLÉCULAS

Vários métodos de imobilização de biomoléculas têm sido usados para o desenvolvimento de um biosensor. As técnicas mais comumente usadas para imobilização e desenvolvimento de sensores específicos são: imobilização física (adsorção física e aprisionamento), ou imobilização química (ligação cruzada e ligação covalente) [63].

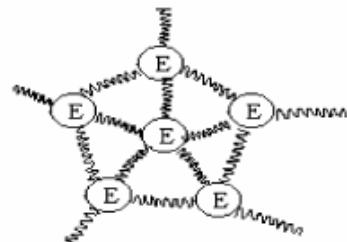
1.4.1 - Adsorção física: técnica que retém a biomolécula que se deseja imobilizar nas proximidades da superfície do transdutor, usando para isto membranas, tais como: sílica gel, celulose, polímeros, etc. As forças de ligação são principalmente devidas a pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e formação de sítios complexos de transferência de elétrons [62]. As vantagens desta técnica são: a ausência de modificação da biomolécula, baixo custo e possibilidade de regeneração da matriz, entretanto, as forças de ligação são susceptíveis a mudança de pH, temperatura e força iônica do meio [76-83].



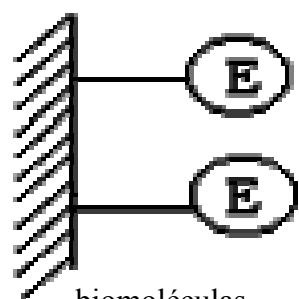
1.4.2 – Aprisionamento: este método envolve a aplicação de um potencial apropriado no eletrodo de trabalho, imerso em uma solução aquosa contendo moléculas do material biológico de interesse e do monômero. O material biológico presente nas vizinhanças da superfície do eletrodo é então incorporado durante o crescimento do polímero. Na adição, o “aprisionamento” ocorre sem reação química que possa afetar a atividade do material. A vantagem da polimerização eletroquímica é que o filme pode ser preparado facilmente em um rápido procedimento. Neste método é possível controlar a espessura da camada polimérica baseado na medida de carga elétrica durante a polimerização eletroquímica. A maior vantagem deste método sobre os outros convencionais é a possibilidade de eletrogerar um polímero cobrindo parte da superfície de um eletrodo de geometria complexa, apresentando um baixo custo. Como desvantagem, esta técnica apresenta uma alta barreira de difusão [84-86].



1.4.3 – Ligação cruzada: nesta técnica usa-se um reagente bifuncional, como glutaraldeído, ou multifuncional, como hexametileno di-isocianato, para imobilização da molécula em vários tipos de suportes sólidos [60]. Ao usar esta técnica é necessário que haja preocupação com a acessibilidade ao componente bioativo. A vantagem de seu uso é que a perda da atividade do componente biológico é mínima, e o custo envolvido é relativamente moderado [87-92].



1.4.4 – Ligação Covalente: esta técnica é efetuada através da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse, e uma matriz de suporte [62]. Como matriz de suporte é comum usar filmes poliméricos, os quais podem ser eletropolimerizados sob condições (solvante orgânico, altos valores de potenciais para o processo de polimerização) que normalmente causariam danos às biomoléculas. Além disso, a ligação covalente entre a biomolécula e o polímero funcionalizado pode ser feita em solução tampão aquosa contendo aditivos e estabilizadores, os quais



preservam a atividade catalítica e/ou as propriedades de reconhecimento das biomoléculas [84]. Esta técnica apresenta como vantagem a baixa resistência difusional, ao passo que a desvantagem vem do fato de que a matriz de suporte não é regenerável [26,93].

1. 5 – TIPOS DE TRANSDUTORES

O transdutor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico ou condutimétrico), térmico (calorimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência de cristais piezelétricos com variações na massa) [1,39,41].

1.5.1 - Transdutores eletroquímicos

1.5.1.1 - Transdutor amperométrico: emprega a medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensitiva, proporcional à concentração do analito [94]. No biossensor enzimático, a enzima adequada, imobilizada na superfície do eletrodo, catalisa a reação dos substratos, e o monitoramento da corrente elétrica gerada poderá ser efetuado, devido à formação dos produtos ou consumo de regente. Outras vezes, modifica-se a superfície do eletrodo com substância apropriada, denominada mediador, que oxidará um dos produtos e então monitora-se a corrente elétrica devida à reoxidação eletroquímica do mediador na superfície do eletrodo. O mediador, evidentemente, deve ser seletivo e diminuir o valor do potencial a ser aplicado reduzindo a participação de eventuais interferentes da reação [39].

Durante algum tempo uma das principais preocupações na construção de biossensores amperométricos centralizou-se na velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo [95-98]. Isto é evidenciado, quando se observa as transformações através das quais os biossensores têm passado, na procura de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Os biossensores de primeira geração, baseados na eletroatividade do substrato ou produto da reação enzimática, apresentavam problemas de interferências em virtude da

necessidade de aplicação de potenciais muito altos [99-101]. Na tentativa de diminuir estes potenciais, surgiram os biossensores de segunda geração, onde o emprego de mediadores de elétrons tinha como função o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo [101]. Entretanto, esta configuração pode apresentar problemas de interferências, uma vez que, este arranjo pode facilitar também a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato. Com o intuito de superar estes problemas, uma nova categoria de biossensores chamada de terceira geração tem sido proposta [102,103]. Esta proposta é baseada na transferência direta de elétrons entre enzima e eletrodo na ausência de mediadores, sendo esta uma característica que a torna bastante vantajosa, já que promove uma maior seletividade, à medida que eles operam em potenciais mais próximos ao da própria enzima, diminuindo, como consequência, as reações interferentes, assim como dispensando o uso de outros reagentes na seqüência das reações enzimáticas. Segundo Kubota [45] uma transferência de elétrons eficiente é conseguida através da diminuição ou remoção da camada protetora de proteínas ao redor do sítio ativo da enzima, sem perder a seletividade e ao mesmo tempo aumentando a sensibilidade oferecida pelos biossensores construídos desta forma.

1.5.1.2 - Transdutor potenciométrico: Neste tipo de transdutor o potencial é gerado pela diferença de potencial entre um eletrodo de referência e o eletrodo indicador (biosensor), o qual varia com a atividade (ou concentração) da espécie que está sendo analisada [104]. O dispositivo potenciométrico mede o potencial do eletrodo indicador sobre condições de equilíbrio onde não há ao longo da interface eletrodo/solução eletrólise e nem transporte de carga. A diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência é relacionada à concentração do analito de acordo com a equação de Nernst ou de Donnan [44]. Este tipo de transdutor raramente é usado em biossensores com enzimas imobilizadas em polímeros eletrodepositados [26].

1.5.1.3 - Transdutor condutométrico: os transdutores condutométricos são empregados quando o biorreconhecimento do substrato pela enzima produz mudanças na condutividade elétrica da solução, devido ao consumo ou produção de espécies iônicas [105]. As principais vantagens dos biossensores condutométricos são: simplicidade de operação e o baixo custo dos detectores. Como principais desvantagens, encontram-se a baixa sensibilidade e a dependência da condutividade com a temperatura [106].

1.5.2 - Transdutores Térmicos

1.5.2.1 - Transdutor calorimétrico: biosensores calorimétricos são usados quando a reação envolve importante conversão de entalpia. O calor leva a um aumento de temperatura proporcional a qual pode ser relacionada com a concentração do analito [44]. Para detecção, o sinal térmico gerado pela reação redox foi medido como oposto para a medida de sinal eletroquímico [26].

1.5.3 - Transdutores ópticos

1.5.3.1 Transdutores ópticos: biosensores ópticos são baseados em medidas de absorção ou emissão de luz como consequência de uma reação bioquímica. Neste tipo de biosensor, ondas de luz são guiadas por meio de fibras ópticas para um detector adequado [104].

Durante as duas últimas décadas houve um avanço significativo no desenvolvimento de sensores e biosensores ópticos para determinações de espécies de interesse químico e biológico. O primeiro sensor com transdução químico-óptico foi baseado na medida de mudanças no espectro de absorção e foi desenvolvido para determinações de CO₂ e O₂. Desde então, uma variedade de sistemas ópticos de detecção estão sendo utilizados em sensores e biosensores, incluindo, entre outros, elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, Raman), interferometria (interferometria de luz branca, interferometria modal) e, finalmente, a ressonância de plasma de superfície. Nestes sensores, a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas ou um meio de transdução químico-óptica [107,108].

1.5.3 - Transdutores detectores de massa

1.5.3.1 - Transdutor piezoeletrico: dispositivo piezoeletrico requer um cristal oscilante para alternar a freqüência (MHz). A oscilação mecânica do cristal varia de acordo com a mudança de massa. Os cristais são recobertos com biomoléculas exibindo alta

seletividade frente a substância a ser determinada. A principal desvantagem destes dispositivos depende da adsorção não seletiva [26].

1.6 - HEPATOPATIAS

Estudos sobre mortalidade enfatizam a importância das causas relacionadas às doenças do aparelho circulatório, às neoplasias malignas e às causas externas, entretanto, muito pouco se tem detido na análise das hepatopatias, que também formam um importante agrupamento de causas de morte [109].

Em pesquisa feita no estado de São Paulo [109] observa-se que as mortes por hepatopatias ocupam a sétima posição (tabela 1), quando analisado o número total de óbitos masculinos, oitava posição analisando um grupo feminino com idade de 35 a 59 anos e segundo lugar analisando o grupo masculino de mesma idade.

Tabela 1: Principais causas de morte por sexo da população total e de 35 a 59 anos no Estado de São Paulo, triênio 2000 – 2002

Homens								
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
Todas as Idades	Doenças Isquêmicas do Coração	Agressões	Doenças Cerebro-vasculares	Outras Doenças Cardíacas (1)	Pneumonia	Acidentes de Transporte	Hepatopatias	Outros Acidentes (2)
35-59 Anos	Doenças Isquêmicas do Coração	Hepatopatias	Agressões	Doenças Cerebro-vasculares	Acidentes de Transporte	Outras Doenças Cardíacas (1)	Aids	Outros Acidentes (2)
Mulheres								
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
Todas as Idades	Doenças Isquêmicas do Coração	Doenças Cerebro-vasculares	Outras Doenças Cardíacas (1)	Pneumonia	Diabetes	Doenças Hipertensivas	Câncer de Mama	Perinatais
35-59 Anos	Doenças Cerebro-vasculares	Doenças Isquêmicas do Coração	Câncer de Mama	Outras Doenças Cardíacas (1)	Diabetes		Doenças Hipertensivas	Hepatopatias

Fonte: Fundação Seade.

(1) Referem-se às doenças cardíacas excetuando as reumáticas, hipertensivas e isquêmicas do coração.

(2) Referem-se aos acidentes excetuando os de transporte.

De modo geral, os termos hepatopatia ou hepatopatia crônica são usados como sinônimos para descrever a presença de doença crônica do fígado, independente da etiologia, com grau leve a moderado de fibrose, não chegando a estágio de cirrose, sendo que cirrose é o nome atribuído à patologia que pode afetar um órgão,

transformando o tecido formado pelas suas células originais em tecido fibroso, por um processo habitualmente chamado fibrose ou esclerose. Geralmente o termo cirrose é utilizado para designar a cirrose no fígado [110].

As principais doenças no fígado são descritas a seguir.

1.6.1 - Cirrose hepática: a cirrose hepática pode ser definida anatomicamente como um processo difuso de fibrose e formação de nódulos, acompanhando-se freqüentemente de necrose hepatocelular. Apesar das causas variarem, todas resultam no mesmo processo.

1.6.2 - Câncer de fígado: hepatocarcinoma é o câncer de fígado que surgiu de hepatócitos. A primeira descrição científica foi feita por Eggel em 1901, mostrando o resultado de mais de 200 autópsias. Hoje, 100 anos após, sabemos mais sobre o processo que leva ao seu surgimento, como ele cresce, as pessoas que tem maior risco de desenvolvê-lo, como fazer o diagnóstico precoce e – o mais importante – como tratá-lo. Apesar de raramente ocorrer em pessoas sadias expostas a certas toxinas, como a aflatoxina (encontrada em amendoins contaminados, por exemplo) em sua grande maioria o hepatocarcinoma acomete uma população bem definida: os portadores de cirrose hepática.

1.6.3 - Hepatite: o termo hepatite refere-se a toda inflamação no fígado. Esta inflamação pode ter diversas causas, como veremos a seguir. Com a inflamação, são destruídas células do fígado (hepatócitos e outros), com diversas consequências ao organismo.

1.6.4 - Encefalopatia hepática: a encefalopatia hepática é uma manifestação de doenças no fígado, onde há um excesso de produtos tóxicos provenientes da alimentação e do próprio fígado, que deveria eliminá-las. A encefalopatia surge quando o fígado torna-se incapaz de eliminar ou transformar essas substâncias tóxicas pela destruição das suas células e/ou porque o sangue que vem do sistema digestivo é desviado do seu caminho normal e vai direto para a circulação geral (incluindo a do cérebro) sem passar pelo fígado antes [111].

1.7. DIAGNÓSTICO DAS HEPATOPATIAS

O diagnóstico das hepatopatias é realizado com base no ensaio para quantificação da alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico pirúvica (ALT/GPT) em amostras de sangue. Esta medida é útil na avaliação da função hepática, sendo mais sensível na detecção de lesão hepatocelular que de obstrução biliar.

1.7.1 – Reação da alanina aminotransferase (ALT)

Na célula hepática, a ALT localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). A principal fonte de ALT é o fígado, o que levou à determinação da atividade da ALT para o diagnóstico de doenças hepáticas, pois esta é sensível e também bastante específica para o diagnóstico destas doenças. Observam-se níveis elevados de ALT no soro de pacientes com hepatites, cirrose, necrose hepática, colestase, isquemia hepática, tumor hepático, drogas hepatotóxicas, icterícia obstrutiva, miosite, pancreatite e abuso crônico do álcool. Embora tanto a aspartato aminotransferase (AST) como a ALT apresentem concentrações elevadas no soro sempre que os processos patológicos afetam a integridade da célula hepática. A ALT é a enzima mais específica do fígado. Para além disso, o aumento da atividade da ALT mantém-se durante mais tempo do que o aumento da atividade da AST. Em doentes com deficiência de vitamina B6, a atividade da aminotransferase sérica pode diminuir. A aparente redução da atividade da aminotransferase pode estar relacionada com a diminuição de piridoxal fosfato, o grupo protésico para as aminotransferases, o que dá origem a um aumento do rácio entre a apoenzima e a holoenzima [112].

A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o α -cetoglutarato com formação de piruvato e glutamato (Figura 2) [113].

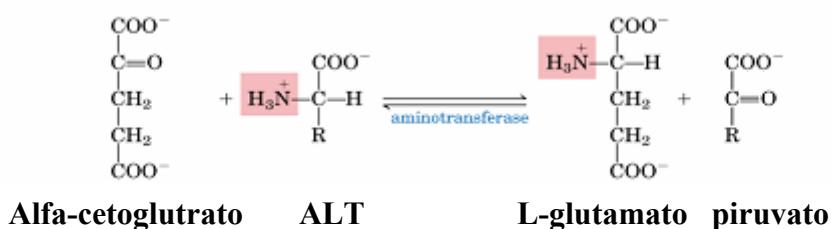


Figura 3: Reação de transaminação

As hepatopatias podem manifestar-se de diferentes modos. Ao realizar o diagnóstico de uma hepatopatia, o médico leva em consideração a descrição dos sintomas feita pelo paciente, bem com a realização de exame físico, exames laboratoriais e em certos casos usa também diagnóstico por imagens [114].

Baseado na necessidade de metodologias mais rápidas e simples para o diagnóstico precoce de hepatopatias, que formam um grupo de doenças que ocasionam grande número de óbitos, este trabalho se propõe a contribuir para o desenvolvimento de um biossensor para detecção de doenças que afetam o fígado.

Biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento "on site" rápido [115].

Neste trabalho foi investigado o uso de eletrodos não-modificados e modificados com *p*-aminofenol para imobilização de L-alanina e α -cetoglutarato sobre diferentes superfícies eletródicas, para construção futura de um biossensor, baseado na resposta amperométrica da alanina aminotransferase (ALT) no controle e detecção de hepatopatias.

1.8 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver eletrodos modificados com filmes poliméricos derivados de *p*-aminofenol, visando aplicação destes como transdutor amperométrico de um biossensor a base de L-alanina e α -cetoglutarato, para detecção de hepatopatias.

Os objetivos específicos consistiram em:

- ✓ Modificar diferentes superfícies eletródicas (pasta de carbono, disco de grafite, ouro e tinta de grafite) com filmes poliméricos derivados de *p*-aminofenol;
- ✓ Realizar ensaios de formação de filmes em diferentes faixas de potencial de varredura e diferentes valores de pH da solução monomérica;
- ✓ Realizar ensaios de imobilização de L-alanina e α -cetoglutarato nos eletrodos modificados;
- ✓ Verificar as respostas dos substratos (L-alanina e α -cetoglutarato) imobilizados nos eletrodos modificados.

CAPÍTULO 2:

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 – SOLUÇÕES UTILIZADAS

Todas as soluções estoque foram preparadas com água deionizada ($18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$, Milli-Q_{plus}). As soluções de monômeros e eletrólitos foram mantidas sob borbulhamento com N₂ durante quarenta minutos.

- ✓ ***Solução de ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio 5 mmol.L⁻¹***: a solução foi preparada a partir de 0,823 g de ferricianeto de potássio, 1,056 g de ferrocianeto de potássio e 5,055 g de nitrato de potássio. Os reagentes foram transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 500,0 mL e completado o volume.
- ✓ ***Solução monomérica 2,5 x 10⁻³ mol.L⁻¹***: a solução foi preparada a partir de 0,014 g de 4-aminofenol e o volume foi ajustado para 50,0 mL com solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹ ou ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹.
- ✓ ***Solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹***: transferiu-se 15,1 mL de ácido perclórico, para um balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o volume com água deionizada.
- ✓ ***Solução de ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹***: transferiu-se 13,3 mL de ácido sulfúrico, para um balão volumétrico de 500,0 mL e completou-se o volume com água deionizada.
- ✓ ***Solução de alanina 0,2 mol.L⁻¹***: pesou-se 0,018 g de alanina e completou-se para 1,0 mL com água deionizada.
- ✓ ***Solução de α-cetoglutarato 0,2 mol.L⁻¹***: pesou-se 0,045 g de α-cetoglutarato e completou-se para 1,0 mL com água deionizada.
- ✓ ***Solução estoque de cloreto de potássio 1 mol.L⁻¹***: transferiu-se 7,460 g para um balão volumétrico de 100,0 mL e o volume foi completado com água deionizada.

✓ **Solução de hidróxido de sódio 0,1 mol.L⁻¹:** pesou-se 0,200 g e ajustou o volume para 50,0 mL com água deionizada. Esta solução foi utilizada para ajuste de pH.

2.2 - EQUIPAMENTOS UTILIZADOS:

2.2.1 – Experimentos de eletropolimerização:

Para os experimentos de formação dos filmes foram utilizados os equipamentos Potenciómetro/Galvanostato PAR Modelo 273 A ou Potenciómetro CH Instruments Modelo 420 A.

2.2.2 – Experimentos para caracterização dos filmes formados:

Para caracterização dos filmes formados foram realizados os seguintes ensaios:

- ✓ Para as análises morfológicas da superfície foram feitas microscopias eletrônicas de varreduras (MEV) em um equipamento Marca ZEISS, modelo LEO 940 A. Estas análises foram conduzidas em diferentes ampliações de acordo com os objetivos dos estudos. Foram feitas ampliações de 200, 500, 1000, 2000 e 3000 vezes.
- ✓ As análises de impedância foram conduzidas em um potenciómetro/galvanostato marca AUTOLAB, modelo PGSTAT20. Essas medidas foram conduzidas em solução de K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆ / KNO₃.
- ✓ As análises espectroscópicas foram conduzidas em um espectrofotômetro marca SHIMADZU, modelo UV-1650PC. As medidas foram feitas de 290 a 1100 nm.

2.3 - PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO:

Foram utilizadas diferentes metodologias para a preparação e utilização dos diferentes eletrodos de trabalho, conforme descrito abaixo:

2.3.1 – Eletrodos de disco de grafite:

Os eletrodos de grafite foram preparados da seguinte forma: um disco de grafite com 6 mm de diâmetro e aproximadamente 2 mm de altura foi colado com cola de prata em base de latão revestida com teflon, para que estabelecesse o contato elétrico, após duas horas verificou-se a condutividade deste eletrodo com auxílio de um multímetro. A seguir, o espaço na base entre grafite e teflon foi preenchido com araldite 24h.



Figura 4: Eletrodo de disco de grafite.

2.3.2 - Eletrodos de pasta de grafite:

A pasta de grafite foi preparada a partir da mistura de 0,100 g de grafite em pó e 50 μ L de óleo mineral, em um almofariz de ágata até completa homogeneização. Como suporte para a pasta foi usado ponteira de pipeta automática. Esta ponteira foi cortada para que se tivesse o diâmetro desejado, e então preenchida com pasta de grafite. A seguir foi feito um polimento mecânico sobre papel manteiga até a obtenção de uma superfície homogênea. O contato elétrico foi feito com fio de platina, o qual foi preso ao eletrodo com auxílio de teflon.

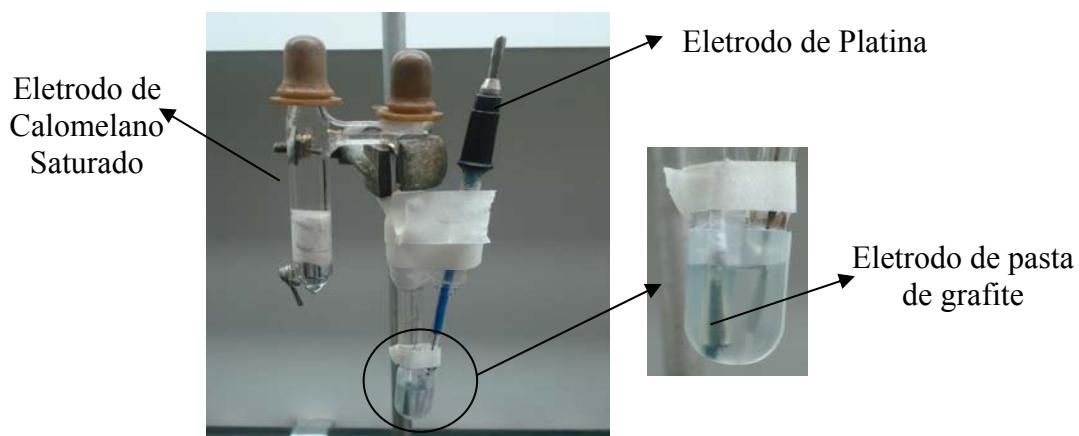


Figura 5: Sistema eletroquímico para eletrodos de pasta de carbono.

2.3.3 - Sistema a base de tinta de grafite condutora:

A base do eletrodo (policarbonato) foi feita a partir de CD's usados, previamente limpos com ácido nítrico PA. Após a remoção da película que recobre o CD, o mesmo foi lavado em água deionizada. Para a aplicação da tinta condutora de grafite usou-se um pincel fino, e para a delimitação da área a ser pintada, usou-se fita adesiva. Após a transferência da tinta para a superfície do eletrodo, deixou-o secar por vinte e quatro horas. O contato elétrico foi feito com clipe metálico, e a área do eletrodo de trabalho foi então demarcada com esmalte preto. Um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como contra-eletrodo e eletrodo de referência, o qual foi colado à superfície do sistema.

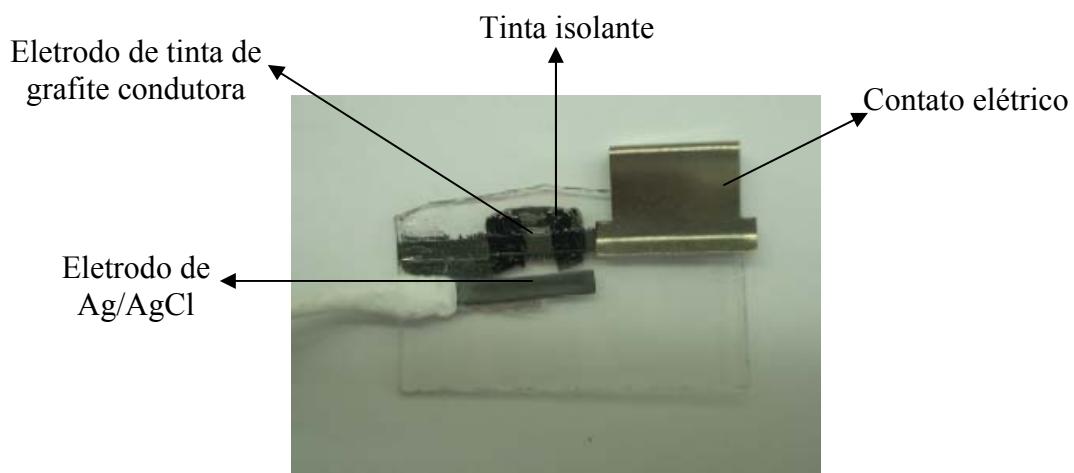


Figura 6: Sistema eletroquímico a base de tinta de grafite condutora e eletrodo de Ag/AgCl.

2.3.3.1 - Eletrodos de prata/cloreto de prata:

Uma placa de prata, 0,2 mm x 2 cm x 2mm, foi previamente limpa com esponja de aço e água deionizada, em abundância. Para aumentar a área superficial desta placa, foram feitos riscos com uma lâmina de estilete e a seguir, lavou-se com água deionizada. O contato elétrico foi feito usando um fio de cobre. O eletrodo de prata foi transferido para um recipiente contendo solução de cloreto de potássio 0,1 mol.L⁻¹. Um eletrodo de placa de platina foi utilizado como eletrodo de trabalho, e prata como

eletrodo auxiliar. O recobrimento do eletrodo de prata foi feito por processo galvanostático sob uma corrente de 0,5 mA por 1 hora e trinta minutos, sob agitação.

2.3.4 - Eletrodos de ouro a partir de CD's:

Para a preparação destes eletrodos foram utilizados CD's de ouro. Removeu-se a película que recobre o CD com ácido nítrico PA, e a superfície foi lavada abundantemente com água deionizada. O CD foi cortado no tamanho desejado e aplicado sobre ele o *layout*, que delimita a área de trabalho, com auxílio de uma prensa térmica. O *layout* foi realizado em software computacional da Corel Draw versão 12 e impresso em impressora a laser.

2.3.5 – Eletrodos de disco de ouro:

Estes eletrodos foram preparados como já descrito no item **2.3.1**, apenas substituindo disco de grafite por disco de ouro com 3 mm de diâmetro.

2.4 - REALIZAÇÃO DOS ENSAIOS:

2.4.1 – Células eletroquímicas utilizadas

2.4.1.1 – Experimentos realizados em eletrodos de disco de grafite ou de ouro

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em células de três compartimentos (Figura 7) utilizando-se eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência e placa de platina como contra-eletrodo.



Figura 7: Célula eletroquímica de três compartimentos

2.4.1.2 – Experimentos realizados em eletrodos de pasta de grafite ou tinta condutora de grafite

Para experimentos com eletrodos de pasta de grafite como eletrodo de trabalho, foi usado sistema eletroquímico de um compartimento como mostra a Figura 5, usando-se ECS como referência e platina como contra-eletrodo. Para experimentos com tinta condutora de grafite, o eletrodo referência e contra-eletrodo foi de Ag/AgCl, como mostra a Figura 6.

2.4.2 - Limpeza da vidraria

A vidraria utilizada foi colocada em ácido nítrico durante vinte e quatro horas, para remoção de material orgânico, e logo após foi lavada com água deionizada em abundância.

2.4.3 - Ensaio sobre eletrodo de grafite:

2.4.3.1 – Limpeza dos eletrodos:

Os eletrodos de grafite foram polidos mecanicamente utilizando-se alumina (granulometria 0,3 μm). Os eletrodos foram enxaguados exaustivamente com água deionizada e levados ao ultra-som por cerca de 10 minutos, imersos em água deionizada, para retirada de resíduos de alumina. Para o teste da superfície destes

eletrodos foram feitos voltamogramas cílicos em solução padrão contendo o par redox $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol.L⁻¹ contendo KNO_3 0,1 mol.L⁻¹, faixa de potencial de -0,1 – 0,5 V e velocidade de varredura 50 mV.s⁻¹. A qualidade do eletrodo de trabalho foi analisada pela diferença entre os picos do par redox. Em seguida o eletrodo foi lavado com água deionizada e transferido para uma solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹, 0,0 até +0,7 V, 50 mV.s⁻¹. Este último procedimento foi utilizado como linha de base para os respectivos eletrodos modificados com filmes poliméricos.

2.4.3.2 – Formação de filme polimérico sobre os eletrodos:

A solução monomérica, previamente preparada, foi transferida para a célula eletroquímica e deaerada com N_2 ultra-puro. Os eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo foram levados aos seus respectivos compartimentos. As varreduras de potencial foram feitas em diferentes condições:

- ✓ Mantendo-se o pH da solução monomérica constante, foram testadas diferentes faixas de potencial para a formação de filme, como: 0,0 e +0,49 V; 0,0 e +0,51 V; 0,0 e +0,64 V; 0,0 e +1,87 V.
- ✓ Variando-se o pH da solução monomérica (0,0 a 12,0), com faixa de potencial fixa de 0,0 até +1,0 V.
- ✓ Variando-se o pH da solução monomérica: pH 0,4; pH 8,0 e pH 12,0 e faixa de potencial de varredura de +0,44 até +0,62 V (pH 0,4); 0,11 até +0,56 V (pH 8,0) e -0,26 até -0,015 V (pH 12,0).

Os diferentes potenciais anódicos limites foram determinados pela primeira varredura de potencial do monômero. A velocidade de varredura de potencial constante em todos os experimentos foi de 50 mV.s⁻¹.

Após as eletropolimerizações, os eletrodos foram lavados com água deionizada em abundância e secos com nitrogênio analítico. Estas superfícies eletródicas modificadas foram submetidas a testes eletroquímicos em solução do par redox $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol.L⁻¹ contendo KNO_3 0,1 mol.L⁻¹, para verificar tanto a formação de filme como o caráter do filme formado. Após o teste na solução do par redox o eletrodo foi lavado e conduzido para uma célula contendo ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹, para verificação da existência de filme na superfície do eletrodo.

Os eletrodos modificados foram armazenados em um dessecador para trabalhos posteriores.

2.4.3.3 – Imobilização dos substratos:

Os eletrodos não-modificados e modificados com poli-4-aminofenol, eletropolimerizados em diferentes valores de pHs das soluções de monômeros, foram testados em soluções de: HClO_4 0,5 mol.L⁻¹; $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol.L⁻¹ contendo KNO_3 0,1mol.L⁻¹; solução de tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 7,4) afim de se testar diferentes soluções eletrolíticas, para determinação de linha base.

Para a imobilização dos substratos foi gotejado 30 μL da solução de alanina 0,2 mol.L⁻¹ e/ou 30 μL da solução de α -cetoglutarato 0,2 mol.L⁻¹ aos eletrodos sem filme e modificados com poli-4-aminofenol. A seguir, os eletrodos contendo os substratos foram levados para um dessecador, onde permaneceram por cerca de 24 horas sob vácuo.

As leituras dos eletrodos, sem filme e com filmes poliméricos, sensibilizados com as biomoléculas, foram feitas novamente nas soluções eletrolíticas mencionadas anteriormente para verificar a resposta das biomoléculas.

2.4.4 - Ensaio sobre eletrodo de ouro:

2.4.4.1 – Limpeza dos eletrodos:

A limpeza destes eletrodos foi realizada conforme descrito no item 2.4.3.1, diferenciando somente na linha de base que foi conduzida em uma solução de ácido sulfúrico 0,5 mol.L⁻¹.

2.4.4.2 – Formação de filme polimérico sobre os eletrodos:

A solução monomérica para eletrodos de ouro foi preparada em ácido sulfúrico como descrito no item 2.1. Após a solução ter sido deaerada, os eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo foram colocados em seus devidos compartimentos. A polimerização eletroquímica foi realizada de 0,0 -1,0 V e a 50 mV.s⁻¹.

Concluído o processo de varreduras de potencial, os eletrodos foram lavados com água deionizada e secos com nitrogênio analítico. Estas superfícies eletródicas

modificadas foram submetidas a testes eletroquímicos em solução do par redox $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ / KNO_3 , para verificar tanto a formação de filme como características de transferência de elétrons do filme formado. Após o teste na solução redox, o eletrodo foi lavado e colocado em uma célula contendo somente H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} , para verificação de alteração na superfície do eletrodo.

2.4.4.3 – Incorporação dos substratos:

A incorporação dos substratos nestas superfícies seguiu o mesmo procedimento citado no item **2.4.3.3**, substituindo $HClO_4$ 0,5 mol. L^{-1} e $K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$, por H_2SO_4 0,5 mol. L^{-1} como eletrólito.

2.4.5 - Ensaio sobre eletrodo de pasta de grafite:

Após preparo do eletrodo de pasta de grafite, item **2.3.2**, o eletrodo foi transferido para uma célula de um compartimento como mostrado na Figura 4. Os eletrodos de referência e contra-eletrodos devidamente limpos e secos também foram introduzidos na célula eletroquímica. Para a realização dos testes usou-se solução de ácido perclórico 0,5 mol. L^{-1} como eletrólito e ajustou-se o pH da solução usando-se solução de hidróxido de sódio 0,1 mol. L^{-1} . Os ensaios foram realizados em pH 0,5; pH 6,0 e pH 14,0.

Este sistema foi usado para testar a detecção dos substratos de interesse (alanina e α -cetoglutarato). Voltametria de pulso diferencial foi conduzida a velocidade de 5 mV. s^{-1} , e amplitude de pulso de 50 mV. As biomoléculas em estudo foram detectadas pela incorporação das mesmas na pasta de grafite numa proporção de 5% (m/m) de massa de substrato; pelo gotejamento sobre a superfície do eletrodo ou em solução eletrolítica.

2.4.6 - Ensaio sobre eletrodo de tinta condutora de grafite

Após o preparo do sistema eletroquímico descrito no item **2.3.3**, foram realizados testes de detecção dos substratos de interesse (alanina e α -cetoglutarato) dos eletrodos sem filme polimérico. Foi feito uma linha de base com a solução eletrolítica e

logo após gotejou-se na superfície do eletrodo de trabalho, de forma a cobrir também o eletrodo de Ag/AgCl, 30 μ L da solução recentemente preparadas do substrato e novamente fez-se a leitura a fim de verificar a resposta eletroquímica do substrato. Utilizou-se uma solução de KCl 1 mol.L⁻¹, pH 12,0 como eletrólito. Para a detecção, voltametria de pulso diferencial foi conduzida a 5 mV.s⁻¹, e amplitude de pulso 50 mV.

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 - VARIAÇÃO ESTRUTURAL DO MONÔMERO 4-AMINOFENOL COM A VARIAÇÃO DE pH:

Usando-se os valores de pK_a do 4-aminofenol [116] e um simulador de curvas de titulação CURTIPOT [117] foi possível determinar a variação estrutural do 4-aminofenol versus o pH do meio reacional (Figura 8).

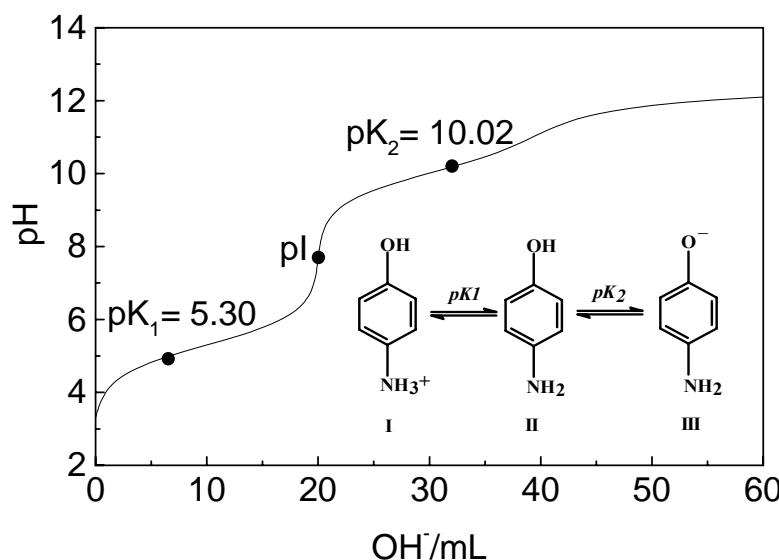


Figura 8: Curva de titulação de 20 mL de 4-aminofenol (50 mmol.L^{-1}) com NaOH (50 mmol.L^{-1}).

Em meio fortemente ácido ocorre a forma catiônica como uma única estrutura (I). Com o aumento de pH pela adição de NaOH ocorre a desprotonação do grupo $-\text{NH}_3^+$ (estrutura II). Quando o valor do pH se torna igual ao valor do pK_1 , a concentração das formas protonada e desprotonada é igual. Acima deste valor encontra-se o ponto isoeletroônico (7,66), onde se encontra presente somente a forma neutra (estrutura II). Com o aumento do pH ocorre a desprotonação do grupo $-\text{OH}$. Quando o pH do meio se iguala ao valor de pK_2 , há um equilíbrio equimolar fenol/fenóxido (estruturas II e III). Em meio fortemente básico, a concentração do íon fenóxido aumenta até total conversão (estrutura III).

A Figura 9 mostra o espectro de 4-aminofenol em diferentes valores de pH.

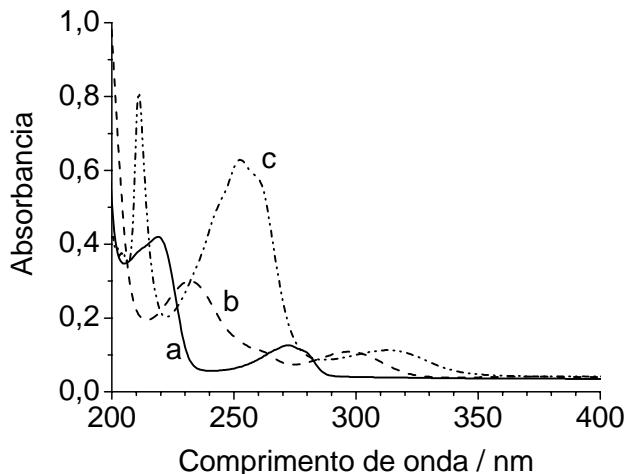


Figura 9: Espectro de UV de 4-aminofenol em solução aquosa em pH (a) 0,4; (b) 8,0; (c) 12,0.

Devido a presença de grupos $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ e OH/O^- (auxocromos) ligados ao benzeno, ocorrem alterações no comprimento de onda e intensidade do espectro de absorção. Os valores de comprimento de onda estão representados na tabela 2.

Tabela 2: Valores de comprimento de onda do espectro de UV de 4-aminofenol em diferentes valores de pH.

pH	Comprimento de onda (nm)		Estrutura
0,4	219	272	I
8,0	232	297	II
12,0	252	312	III

Quando 4-aminofenol é protonado (estrutura I, Figura 8), o par de elétrons livres do nitrogênio não está disponível para interação com elétrons π do anel e o espectro é quase idêntico do fenol, que absorve em 210,5 e 270,0 nm.

A conversão de 4-aminofenol (estrutura II) ao correspondente anion fenolato (estrutura III) resulta em um deslocamento batocrômico das bandas e um aumento no ϵ_{max} devido aos elétrons livres no anion estarem disponíveis para a interação com elétrons π do anel [118].

3.2 - ESTUDO DO FILME SOBRE ELETRODO DE DISCO DE GRAFITE:

3.2.1 - Estudo em diferentes valores de pH da solução monomérica:

Foi realizado estudo do filme em meio reacional com diferentes pH, objetivando encontrar a melhor condição de formação do filme para futura construção do biossensor.

Para este estudo foi estudada a polimerização eletroquímica em diferentes valores de pH: 0,4; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0 e 12,0. Os resultados mostrados abaixo referem-se a eletropolimerização a partir de monômeros preparados em pH 0,4 (Figura 10), pH 8,0 (Figura 11) e pH 12,0 (Figura 12).

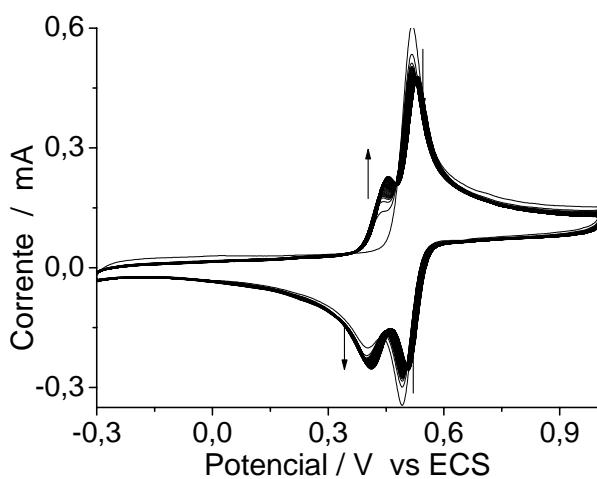


Figura 10: Voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), pH 0,4 e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . As setas indicam aumento no número de varreduras.

Em meio reacional ácido (pH 0,4), na primeira varredura de potencial observa-se uma onda de oxidação em torno de 0,51 V atribuída à oxidação do monômero, e a partir da segunda varredura de potencial observou-se o aparecimento de mais ondas de oxiredução entre cerca de $+0,3 - +0,5 \text{ V}$, após o primeiro ciclo, sugerindo a cobertura da superfície do eletrodo com filme polimérico eletroquimicamente ativo (Figura 10).

Com o aumento do pH do meio reacional observa-se um deslocamento de potencial de redução para potenciais mais catódicos (Figuras 11 e 12), evidenciando uma maior facilidade de oxidação.

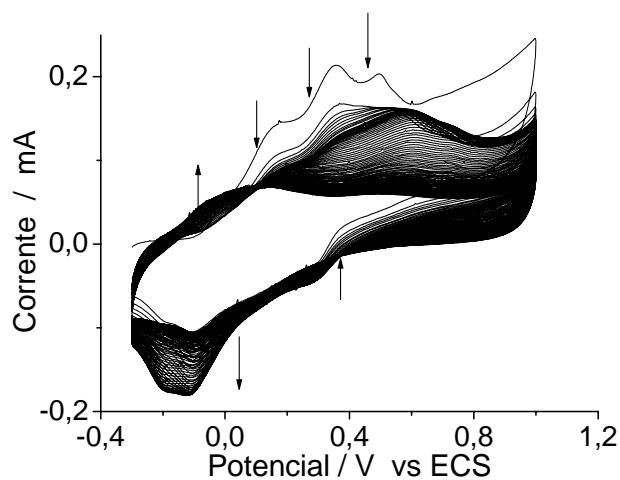


Figura 11: Voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), pH 8,0 e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . As setas indicam aumento no número de varreduras.

Em meio ligeiramente básico (pH 8,0, Figura 11) observa-se, na primeira varredura de potencial, a existência de três ondas de oxidação em $+0,17 \text{ V}$, $+0,36 \text{ V}$ e $+0,50 \text{ V}$. O valor de corrente dessas ondas decresce após sucessivas varreduras de potencial, indicando um consumo das espécies presentes inicialmente no meio reacional. O aumento do valor de corrente correspondente a onda em torno de $-0,11 \text{ V}$ sugere a formação de filme polimérico eletroquimicamente ativo.

No eletrodo modificado preparado em pH 12,0 (Figura 12), são observadas ondas de oxidação em $+0,26 \text{ V}$, $+0,48 \text{ V}$ e $+0,61 \text{ V}$, e ondas de redução em $0,0 \text{ V}$, $+0,23 \text{ V}$ e $+0,60 \text{ V}$. O decréscimo dos valores de corrente em meio básico pode estar associado com a formação de grupos fenólicos desprotonados em solução que tendem a formar filmes isolantes, conforme observado em outros filmes [119-121].

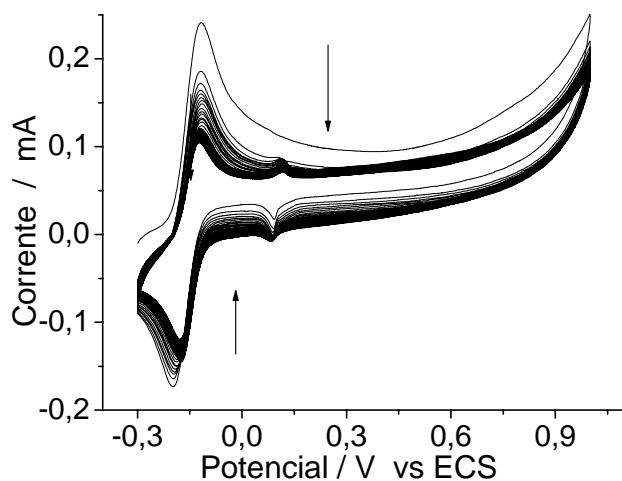


Figura 22: Voltamograma cíclico obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), pH 12,0 e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} . As setas indicam aumento no número de varreduras.

Na eletropolimerização utilizando-se solução do monômero em pH 12,0 observou-se pequena diminuição no valor de corrente de oxidação do monômero, ao longo de sucessivas varreduras de potencial e ausência de outras ondas de oxi-redução, indicativas de formação de filmes eletroativos, diferentemente do que foi observado nos estudos de eletropolimerização em pH 0,4 e pH 8,0. Este fato pode indicar a eletrodeposição de filme eletroinativo na superfície do eletrodo de grafite, com características passivantes. Esta observação é apoiada pelo voltamograma dos eletrodos preparados em diferentes pH em uma solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (Figura 13).

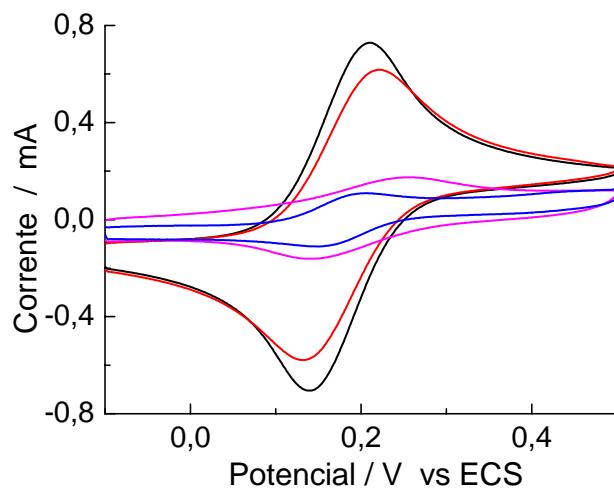


Figura 33: Voltamograma cíclico em solução aquosa contendo $K_3Fe(CN)_6$ (5 mmol.L⁻¹), $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol.L⁻¹) and KNO_3 (0.1 mol.L⁻¹), 100 mV.s⁻¹, (—) eletrodo de disco de grafite e eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) em (—) pH 0,4, (—) pH 8,0 e (—) pH 12.

Análises feitas em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ indicam que, com o aumento de pH, ocorre um decréscimo na transferência eletrônica para o eletrodo, indicando a formação de polímeros passivantes em meio básico.

Outro estudo realizado para verificar a velocidade de transferência de elétrons para o par redox, foi análise de impedância. A resistência de transferência de carga do eletrodo para o polímero (R_{ct}) foi analisada para filmes eletropolimerizados em diferentes valores de pH.

Análise de espectroscopia de impedância é um método efetivo para rastrear a velocidade de transferência de elétrons do eletrodo para a espécie ativa redox em solução [122]. Os estudos de impedância em eletrodos modificados com filmes poliméricos trazem informações a respeito deste material adsorvido sobre a superfície do material eletródico.

O resultados das medidas de impedância para os eletrodos de grafite modificados com filmes de poli 4-aminofenol formados em pH 0,40, 8,0 e 12,0 são apresentados na Figura 14.

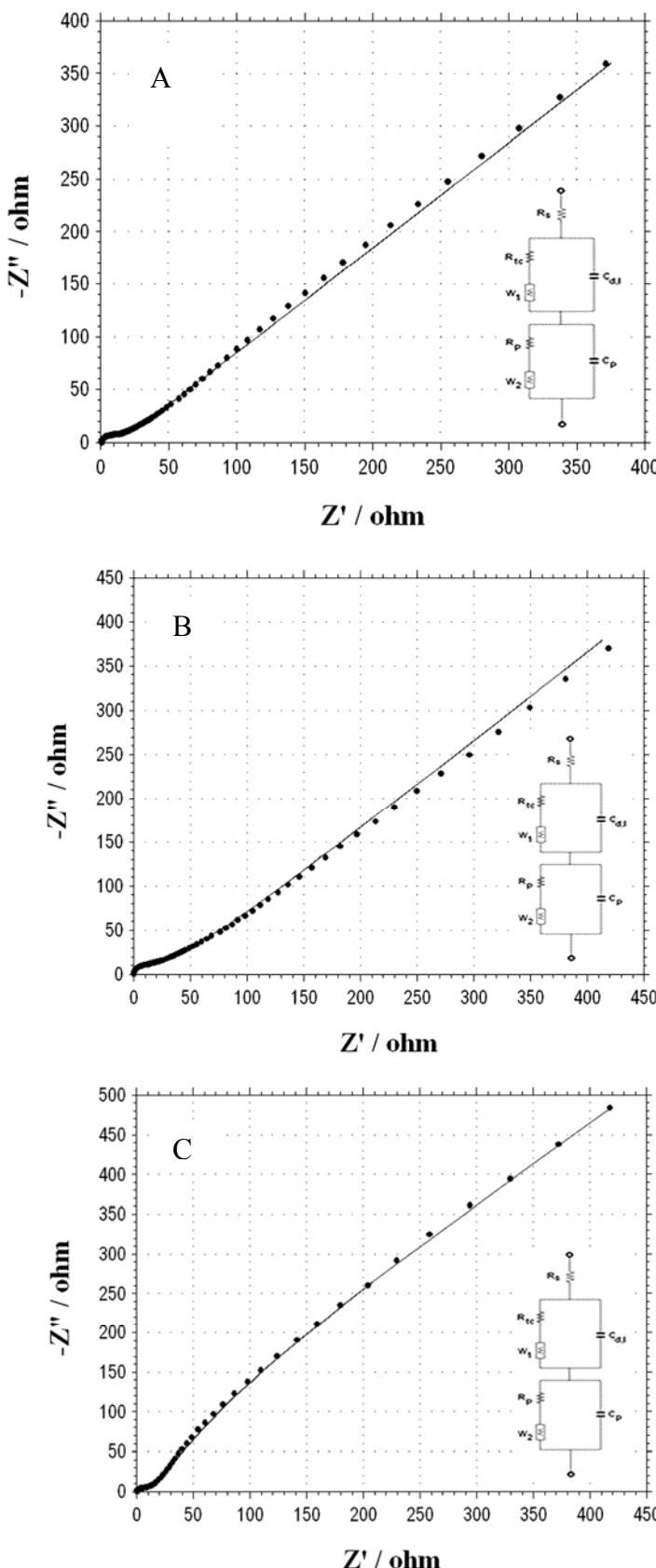


Figura 44: Diagrama de Nyquist (Z'' vs. Z') para medidas de impedância em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (0,05 mol.L⁻¹)/KCl (0,1 mol.L⁻¹) para os eletrodos de grafite com poli-4-aminofenol produzidos em diferentes valores de pH. (A) 0,4, (B) 8,0, (C) 12,0.

A obtenção de informações dos resultados de impedância é realizada mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A aplicação de circuitos equivalentes tem como fundamento as similaridades entre o comportamento da célula eletroquímica e um circuito elétrico de resistores, capacitores e indutores.

Desta forma, a representação mais comum para medidas de impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é representada através do Diagrama Nyquist, onde as componentes Z'' (componente imaginária da impedância) vs Z' (componente real da impedância) são gratificadas, fornecendo informações sobre as possíveis naturezas dos elementos que constituem a impedância total do sistema [123-124].

Nos diagramas de Nyquist, experimentalmente observa-se um semi-círculo na região de altas freqüências (região que representa o processo controlado pela cinética da reação redox), e uma variação linear nas regiões de médias e baixas freqüências (região dos processos representados pelo transporte de massa), e um elemento denominado “impedância Warburg” que pode ou não estar presente no sistema eletroquímico e é representada com o propósito de simular as características do sistema experimental, tanto em processos que sofrem difusão linear, esférica ou sob convecção forçada [125].

Deste modo, pela analise dos gráficos, através de seus respectivos circuitos equivalentes (ver Figura 14), foi possível obter os seguintes dados para os filmes poliméricos formados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Valores de resistência e capacitância para o sistema eletrodo/ polímero/ eletrólito.

pH	R _{tc} / Ω	R _p / Ω	C _{dL} / μF	C _p / μF
0,40	9,55	8,98	0,25	1,15
8,0	19,89	27,26	0,50	3,10
12,0	7,24	81,78	0,75	1,40x10 ⁴

É possível observar que os filmes formados em pH 8,0 apresentam maior resistência a transferência de carga, devido a formação de um material com caráter resistivo, conforme pode também ser observado nos voltamogramas cílicos em solução de $(\text{Fe}(\text{CN})_6)^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ para estes eletrodos na Figura 13.

A resistência do polímero tende a aumentar devido ao aumento do pH, isto pode ser explicado devido a formação do filme ser realizada por espécies carregadas negativamente em pH 8,0 e 12, onde são observadas a presença do íon fenolato (ver Figura 8), o que gera consequentemente um possível polímero aniónico, o qual tende a aumentar a repulsão entre os íons ferro/ferri da solução aumentando consequentemente a R_p nas medidas eletroquímicas.

Propriedades morfológicas

A morfologia de poli-4-aminofenol, em diferentes valores de pH, observada por meio da microscopia eletrônica de varredura (Figura 15) mostra um filme polimérico irregular. No recobrimento do eletrodo observa-se uma estrutura globular randomicamente distribuída na superfície do eletrodo.

Para todos os pH estudados a cobertura não é capaz de preencher as cavidades do grafite,

Para pH 8,0 foi observado aumento da cobertura da área do eletrodo modificado em relação aos outros valores de pH estudados, o que é compatível com o aumento de corrente mostrado em solução de HClO_4 (Figura 16)

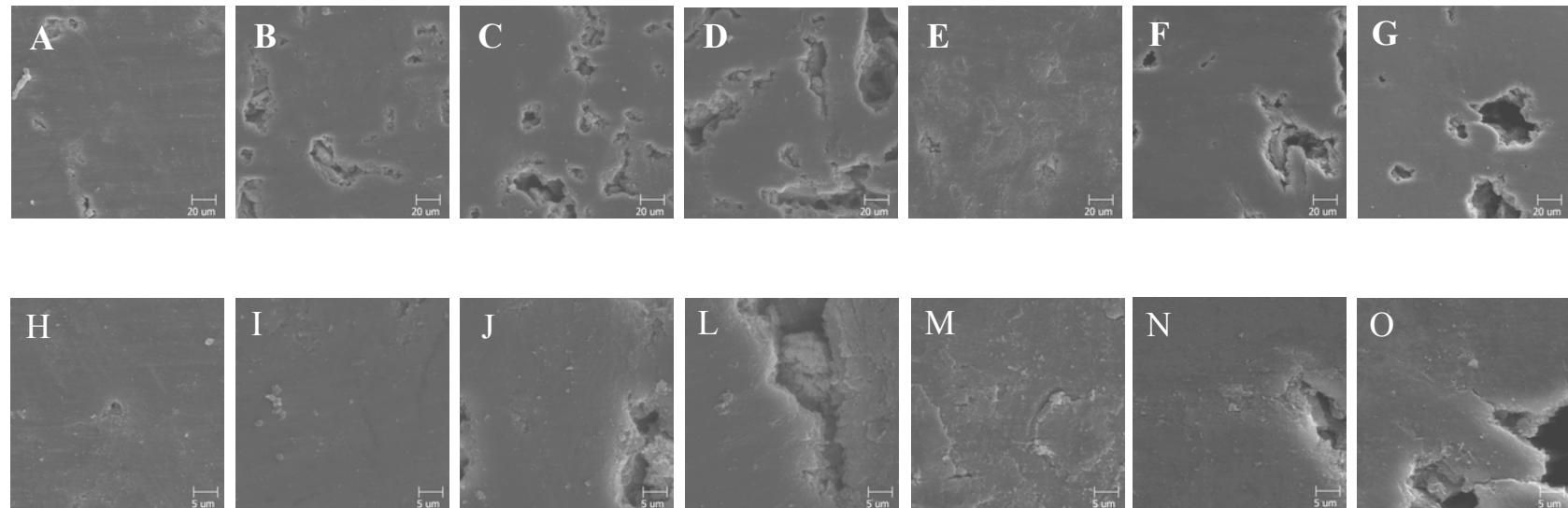


Figura 55: Microscrografias eletrônica de varredura de eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol), ampliação de 500x de A a G e ampliação de 2000x de H a O. (A e H) pH 0,4; (B e I) pH 2,0; (C e J) pH 6,0; (D e L) pH 7,0 (E e M) pH 8,0 (F e N) pH 10,0; (G e O) pH 12,0.

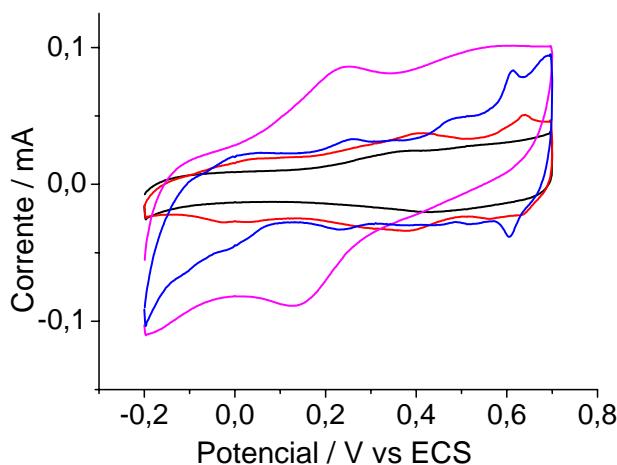


Figura 66: Voltamograma cíclico de eletrodo de grafite não-modificado (—), e modificados com poli(4-aminofenol) em (—) pH 0,4, (—) pH 8,0 e (—) pH 12,0 lidos em solução de ácido perclórico 0,5 mol.L⁻¹.

3.2.2 - Estudo com diferentes potenciais anódicos limite:

Foram realizados estudos em diferentes faixas de potenciais anódicos limite mantendo-se o pH do meio reacional constante e igual ao pH da solução de ácido perclórico (0,5 mol.L⁻¹).

Com base na primeira varredura de potencial (Figura 17) delimitaram-se as faixas de trabalho.

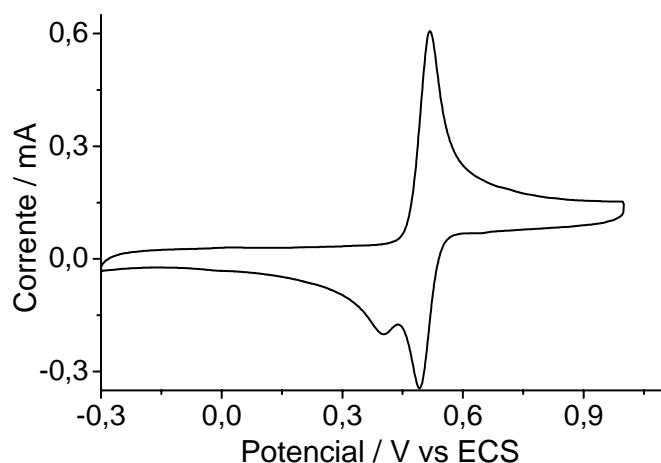


Figura 77: Primeira varredura de potencial do 4-aminofenol (2,5 mmol.L⁻¹) em solução de ácido perclórico (0,5 mol.L⁻¹), pH 0,4. Velocidade de varredura 50 mV.s⁻¹.

Os potenciais anódicos limite escolhidos para o estudo foram: +0,49 V (1/3 da onda de oxidação do monômero), +0,51 V (2/3 da onda de oxidação do monômero), +0,54 (no pico de oxidação do monômero) e em 0,64 V. Outra faixa escolhida foi de 0,0 até +1,87V.

O filme formado na faixa de potencial entre 0,0 até +1,87V apresenta características condutoras. A onda de oxidação do polímero teve um aumento de corrente ao longo de sucessivas varreduras de potencial, como mostrado na Figura 18.

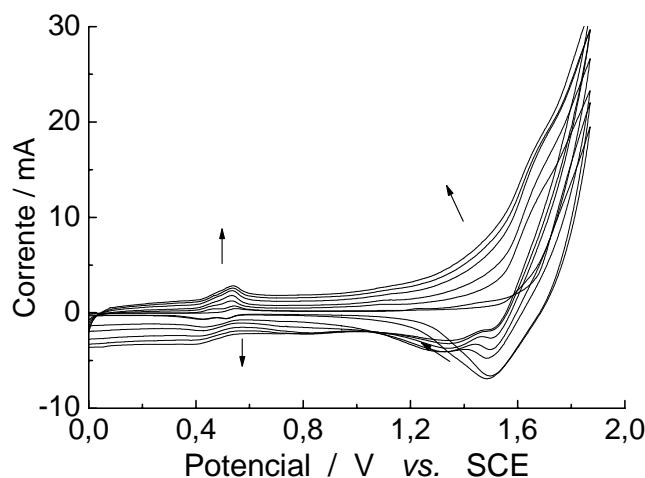


Figura 88: Voltamogramas cílicos obtido durante a oxidação eletroquímica de 4-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) e velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

O voltamograma típico da eletrodeposição de 4-aminofenol em uma faixa de potencial que varia de 0,0 a +1,87 V é mostrado na Figura 18, onde se observa na primeira varredura de potencial uma onda de oxidação em aproximadamente +0,54 V, que é atribuída a oxidação do monômero. A partir da segunda varredura surge uma nova onda de oxidação em aproximadamente +0,47V que é atribuída a oxidação do filme polimérico.

Observa-se também um aumento de corrente com sucessivas varreduras de potencial, indicando a formação de um material na superfície do eletrodo (Figura 19) onde se observa um aumento de corrente nas medidas em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

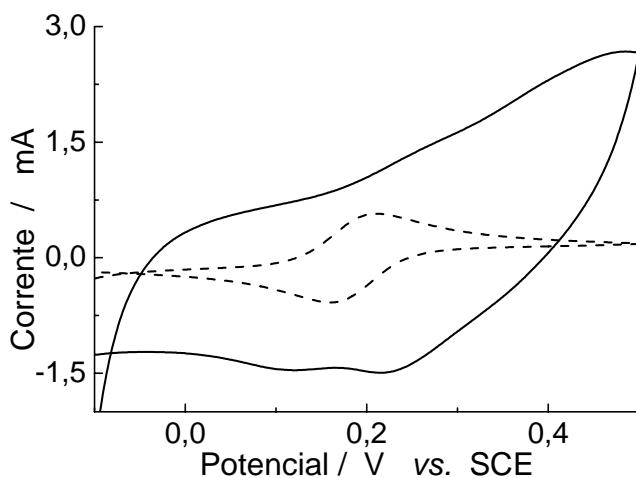


Figura 99: Voltamogramas cíclicos de um eletrodo de grafite em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KNO_3 . Eletrodo de grafite sem filme (---) e com poli(4-aminofenol) (—) 100 varreduras de potencial, 100 mV.s^{-1} .

A resposta de aumento de corrente após a formação de filme também foi observada em solução de ácido perclórico ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), como mostra a Figura 20.

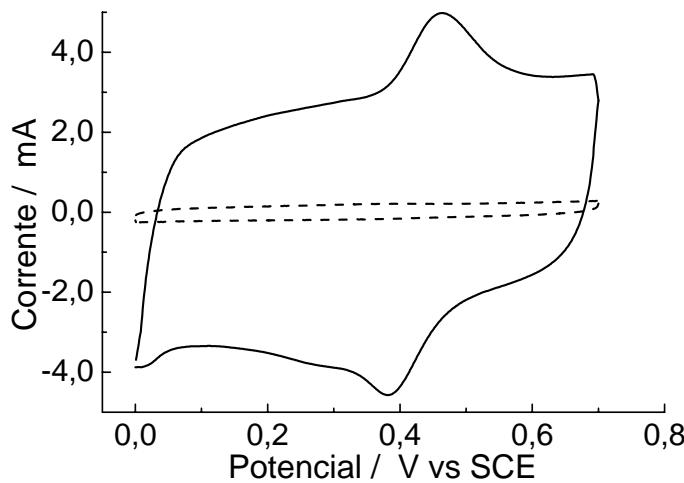


Figura 20: Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em $HClO_4$. Eletrodo de grafite sem filme (---) e com poli(4-aminofenol), 100 varreduras de potencial, 100 mV.s^{-1} .

Após análise da onda de oxidação obtida na Figura 18, estudos foram feitos nas faixas de potencial mencionadas acima (0,0 a +0,49 V, 0,0 a +0,51 V, 0,0 a +0,54 V e 0,0 a +0,64 V). Foi possível observar, para todas as faixas de potencial estudadas, a formação de filme polimérico na superfície do eletrodo, no ensaios de voltametria cíclica em solução do par redox $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, solução de ácido perclórico, e também por análise morfológica da superfície dos eletrodos.

3.2.3 Estudo com diferentes faixas de varredura de potencial em diferentes pH:

Baseado nos estudos anteriores foi realizado um estudo de formação de filme variando a faixa de potencial de formação do filme de acordo com o pH do meio reacional. Para escolha desta faixa de potencial, tomou-se como referência o primeiro voltamograma cíclico de formação do poli(4-aminofenol), em cada pH de interesse, e foi selecionada a faixa de potencial referente a onda de oxidação e redução do monômero, como mostra a Figura 21.

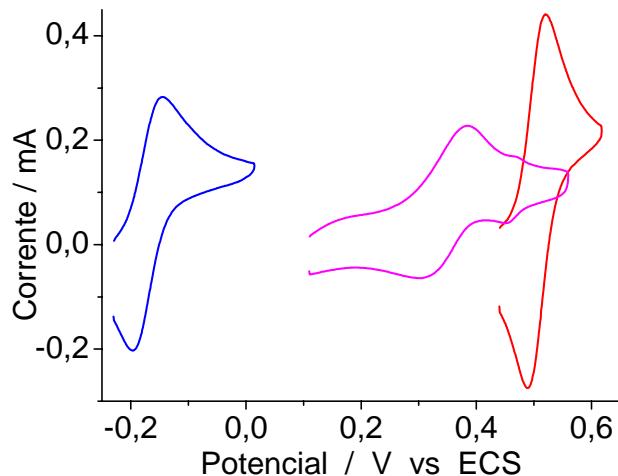


Figura 101: Primeiras varreduras de potencial do 4-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$) em diferentes pH do meio reacional, (—) pH 0,4, (—) pH 8,0 e (—) pH 12,0. $V = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Os eletrodos recobertos com os filmes formados nestas diferentes condições foram analisados em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, como mostra a Figura 22.

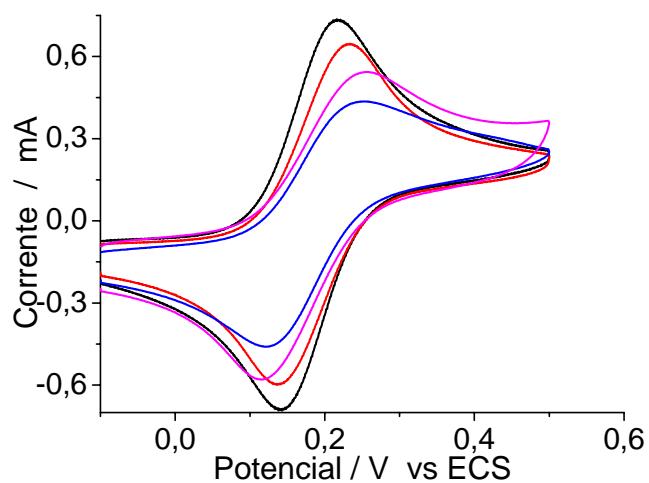


Figura 112: Voltamograma cíclico de eletrodos de grafite em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ em KNO_3 . Eletrodo de grafite sem filme (—) e eletrodo de grafite com poli(4-aminofenol), (—) pH 0,4, (—) pH 8,0 e (—) pH 12,0. 100 varreduras de potencial, 100 mV.s^{-1} .

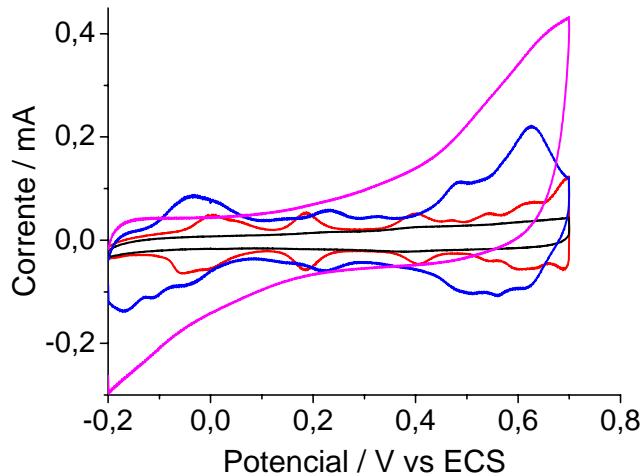


Figura 123: Voltamograma cíclico de eletrodos de grafite em solução de $HClO_4$ ($0,5\text{ mol.L}^{-1}$). Eletrodo de grafite (—) sem e com poli(4-aminofenol), (—) pH 0,4, (—) pH 8,0 e (—) pH 12,0. 100 varreduras de potencial, 100 mV.s^{-1} .

Com base nas Figuras 22 e 23 observou-se uma modificação na superfície do eletrodo, sugerindo a formação de filme polimérico derivado de 4-aminofenol.

Os eletrodos modificados em diferentes condições foram utilizados para testes de incorporação dos substratos de interesse.

3.2.4 - Estudo de incorporação dos substratos nas diferentes filmes formados:

Os filmes formados foram utilizados com intuito de incorporar os substratos de interesse (L-alanina e α -cetoglutarato) para futura construção de um biossensor para detecção de hepatopatias.

Sobre os filmes formados na superfície dos eletrodos de grafite foram feitos testes de incorporação em diferentes condições, começando pelos filmes formados em faixa de potencial de 0,0 a +1,87 V e usando como soluções eletrolíticas tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 7,4). Nestas condições não foi possível observar ondas de oxidação referentes ao substrato.

A seguir realizou-se um experimento onde foi feito a leitura do eletrodo em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ após a incorporação dos substratos. Observou-se na Figura 24 uma diminuição na transferência de carga na presença dos substratos L-alanina e α -cetoglutarato.

Para realização destes experimentos foram utilizados os filmes formados como descrito no item 3.2.3. Observando-se a Figura 24 podemos notar que na presença de L-alanina ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), há uma diminuição na transferência de carga, diminuição esta que é mais evidenciada quando se usa como substrato o α -cetoglutarato. Este fato pode ser explicado pela passivação da superfície eletródica, pela adição de uma substância não condutora como L-alanina e α -cetoglutarato (Figura 25).

Observou-se que o filme formado em pH 8,0 produziu maior variação nos voltamogramas obtidos em solução contendo $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ após ensaio de incorporação de L-alanina e α -cetoglutarato. Sabendo-se que o filme polimérico que se forma em cada pH tem estrutura diferente, o filme formado em pH 8,0 deve possuir estrutura mais apropriada para a detecção destes substratos em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

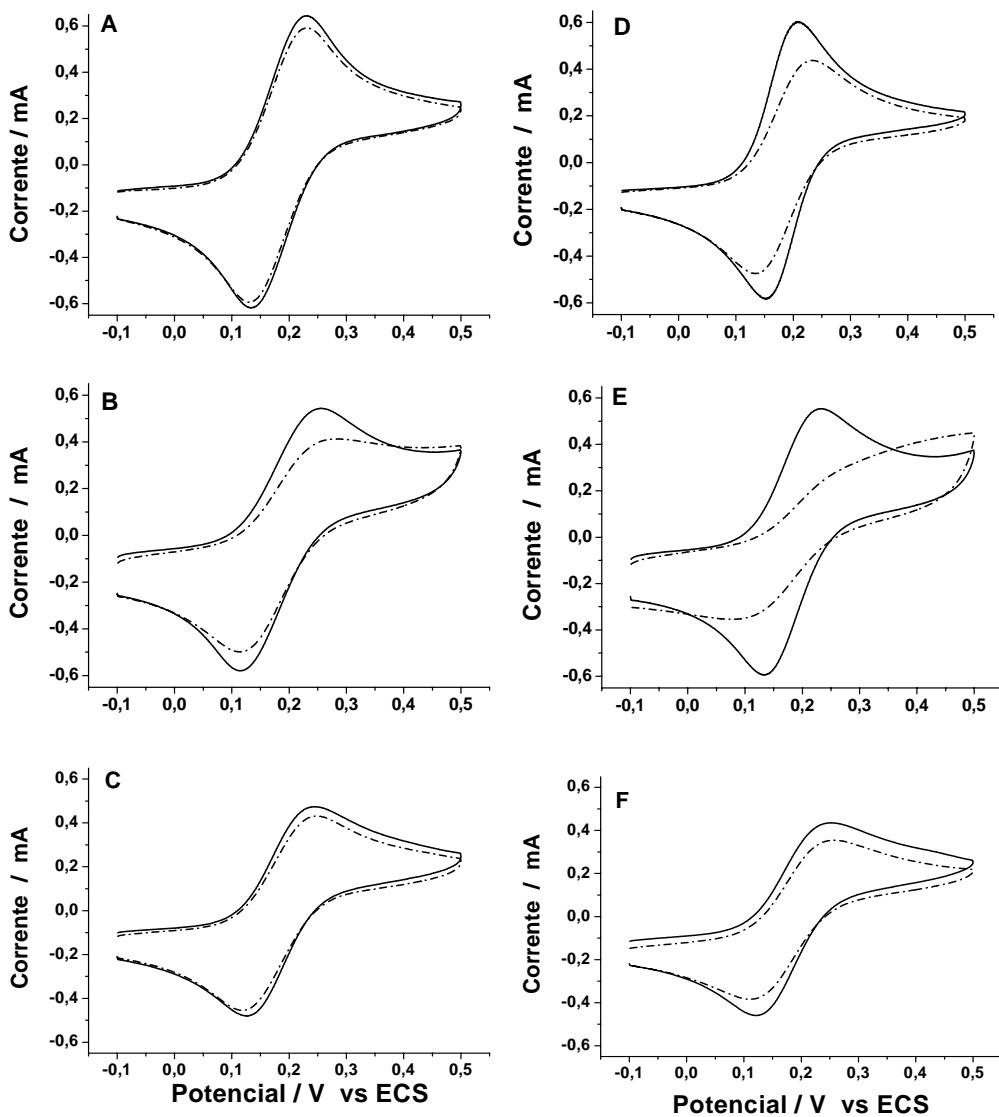
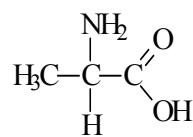
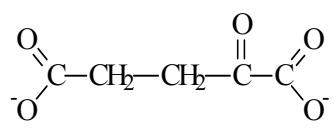


Figura 134: Voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite modificados com poli-4-aminofenol, sensibilizados com os substratos, em solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6/KNO_3$. (A) (B) e (C): (—) filmes formados em pH 0,4; 8,0 e 12,0, respectivamente, (---) sensibilizados com 30 μL de solução aquosa de L-alanina ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$). (D) (E) e (F) - (—) filmes formados em pH 0,4; 8,0 e 12,0, respectivamente, (---) sensibilizados com 30 μL de solução aquosa de α -cetoglutarato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$).



(A)



(B)

Figura 145: Estruturas de (A) L-alanina e (B) α -cetoglutarato.

A Figura 26 ilustra a imobilização simultânea dos substratos sobre a superfície dos eletrodos e a detecção frente ao par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.

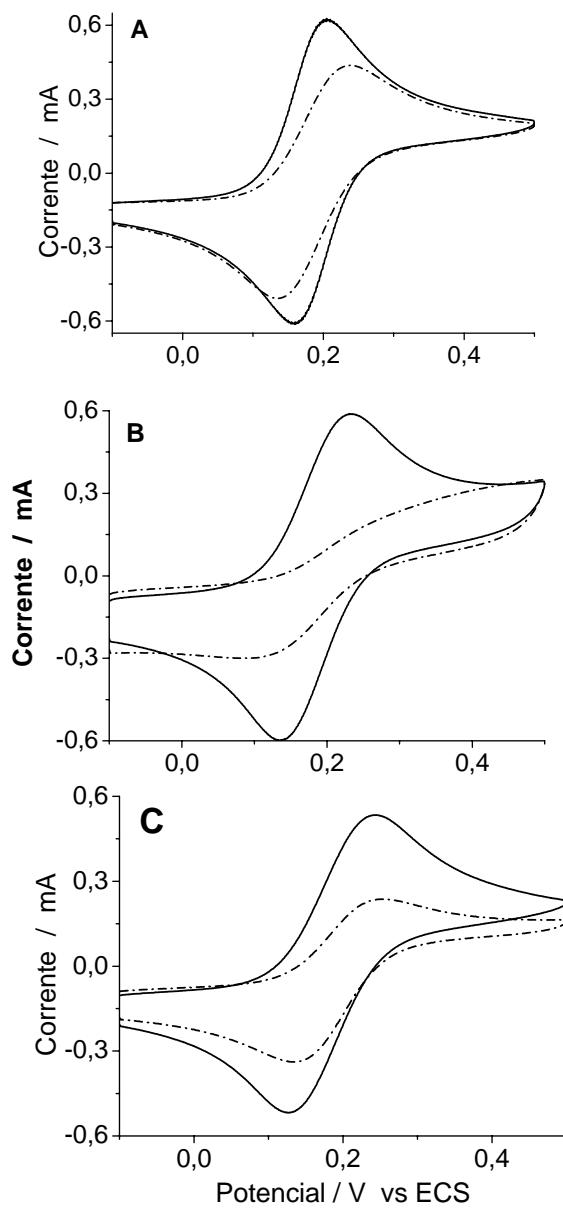


Figura 156: Voltamogramas cílicos de eletrodos de grafite modificados com poli-4-aminofenol, sensibilizados com os substratos, em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{KNO}_3$. (A) (B) e (C) (—)filmes formados em pH 0,4; 8,0 e 12,0, respectivamente, (---)sensibilizados com 30 μL de L-alanina ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$) e α -cetoglutarato ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$).

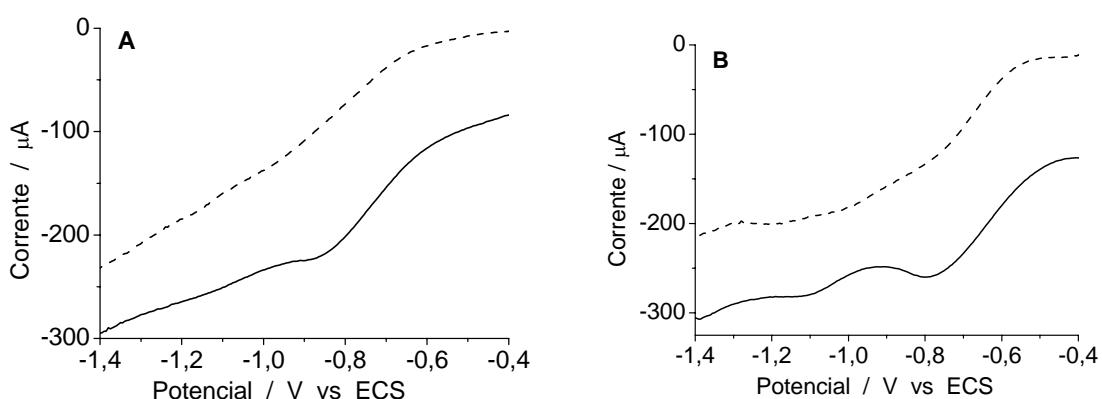
A partir dos resultados obtidos, observou-se mais uma vez melhor resposta na detecção dos substratos incorporados em eletrodos modificados com filmes polimérico formado a partir do monômero preparado em pH 8,0, detecção esta feita em solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$.

Na Figura 26 observou-se que ao adicionar uma solução contendo os dois substratos, a resposta de transferência de carga é menor em relação a imobilização isolada dos mesmos. Isto pode ser explicado pelo fato de que a solução está mais concentrada, portanto pode ocorrer passivação da superfície do eletrodo modificado.

3.3 ESTUDO DE DETECÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO ELETRODOS DE PASTA DE GRAFITE:

Os experimentos de detecção de L-alanina e α -cetoglutarato foram conduzidos em soluções de pH 0,50; 6,0 e 14,0, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (5mV.s^{-1} , amplitude de pulso de 50 ms, faixa de potencial analisada -0,4 a -1,4V) para detecção dos substratos.

Em pH ácido (0,50), não foi possível observar a redução da L-alanina ou α -cetoglutarato, pois ocorre um processo competitivo de redução de hidrogênio na região de detecção deste aminoácido, sendo que, em pH muito ácido este último processo é predominante. Em pH 6,0 e 14,0, foi observada a formação de uma onda de redução sendo que em pH 14,0 esta onda é mais nítida. A Figura 27 apresenta os resultados da detecção de L-alanina e α -cetoglutarato em pH 6,00 e pH 14,0.



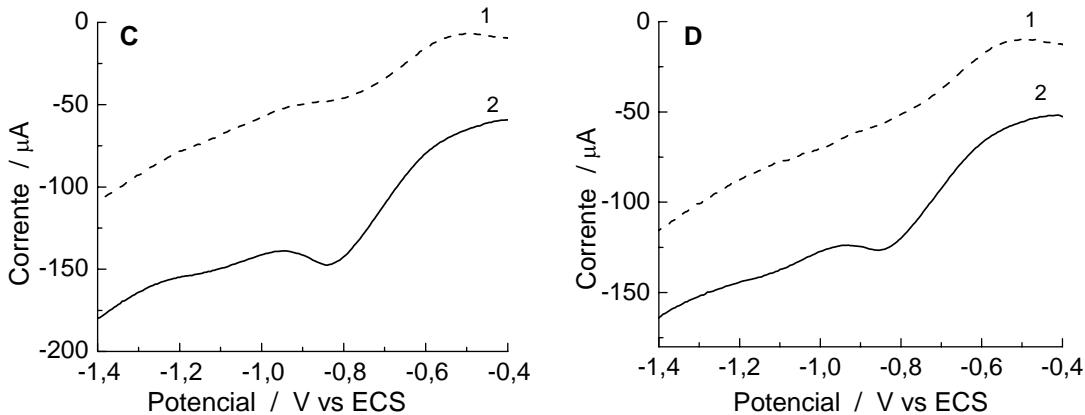


Figura 167: Voltamogramas de pulso diferencial em eletrodo de pasta de carbono. (1) eletrodo sem amostra, (2) eletrodo com substrato ($0,6 \text{ mol.L}^{-1}$) (A) L-alanina (B) α -cetoglutarato pH 6,0 eletrólito HClO_4 ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$), (C) L-alanina (D) α -cetoglutarato pH 14,00 eletrólito NaOH ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). Amplitude do pulso: 50 ms; v : 5 mVs^{-1} .

Considerando que as moléculas de interesse, L-alanina e α -cetoglutarato, possuem grupos carboxila em suas estruturas, estes resultados sugerem que o pico observado em torno de $-0,85 \text{ V}$ é devido a redução deste grupamento.

A detecção das moléculas em pH menos ácidos pode ser atribuída à estrutura do substrato de acordo com o pH do meio reacional. A Figura 28 traz uma simulação da curva de titulação da L-alanina.

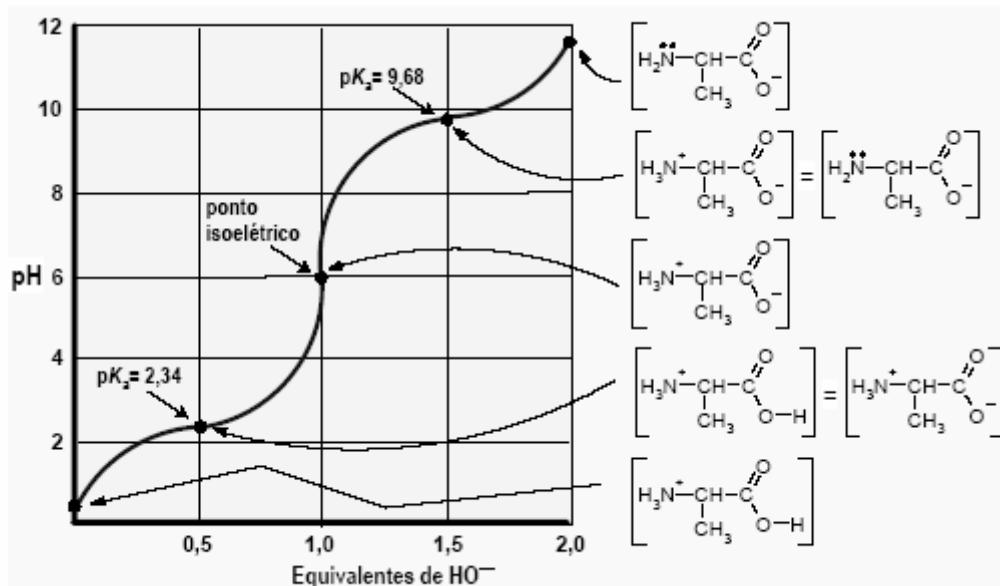


Figura 178: Curva de titulação da L-alanina com NaOH [126].

Para valores de pH muito ácidos haverá no meio maior quantidade da forma protonada. A medida que se aumenta o valor de pH a concentração desta forma protonada vai diminuindo até se igualar com a concentração da forma desprotonada ($\text{R}-\text{COO}^-$ com $\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_3^+$) ($\text{pK}_{\text{a}1}$). Aumentando-se o valor do pH, a concentração da forma desprotonada [$\text{R}-\text{COO}^-$ com $\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_3^+$] aumenta até atingir o ponto de inflexão, que ocorre em pH 6,02. Neste pH, a molécula de L-alanina está totalmente ionizada e ocorre eletroneutralidade de cargas.

Acima deste ponto, a concentração da forma neutra decresce e aumenta a concentração da forma desprotonada ($\text{R}-\text{NH}_2$ com $\text{R}=\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$).

3.4 - ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO ELETRODOS DE OURO:

Os eletrodos de ouro foram usados para incorporação dos substratos de interesse com e sem filme. Os eletrodos de ouro sem filme e modificados com filmes poliméricos eletropolimerizados em diferentes pH dos monômeros foram levados a uma célula contendo solução de ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) com pH ajustado para 14,0, para obtenção da linha de base. A técnica utilizada foi voltametria de pulso diferencial 50 mV.s^{-1} , amplitude de pulso de 50ms, faixa de potencial analisada 0,6 a -1,0V para detecção dos substratos. Estas condições foram escolhidas com base em experimentos anteriores com eletrodos de pasta de grafite (item 3.3). Neste caso escolheu-se uma velocidade maior devido a possibilidade de lixiviação.

As respostas obtidas neste experimento não apresentaram ondas de redução como foi observado no item 3.3.

3.5 - ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DOS SUBSTRATOS USANDO SISTEMA A BASE DE TINTA DE GRAFITE CONDUTORA:

O sistema a base de tinta condutora foram montados exclusivamente para os testes de detecção dos substratos em solução. Este sistema foi escolhido pela sua

geometria, que possibilita eliminar a possibilidade de lixiviação dos substratos, e também pelo baixo volume de amostra necessário para análise.

Com o sistema devidamente conectado ao potenciómetro, gotejou-se na superfície do eletrodo, 1 mL da solução eletrolítica contendo cloreto de potássio ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$). A técnica utilizada para detecção foi voltametria de pulso diferencial 50 mV.s^{-1} , amplitude de pulso de 50ms, faixa de potencial analisada $+0,6$ a $-1,0\text{V}$, fez-se uma linha de base, em seguida adicionou-se $10 \mu\text{L}$ de L-alanina ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$), e realizou-se a medida novamente a fim de se obter uma resposta eletroquímica deste substrato, o mesmo foi feito com α -cetoglutarato. Não foi possível observar ondas de redução que pudessem ser atribuídas aos substratos analisados.

CAPÍTULO 4:

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

4.1. CONCLUSÕES

Os resultados mostram que é possível imobilizar os substratos de interesse (L-alanina e α -cetoglutarato) sobre eletrodos de disco de grafite, e obter resposta desta incorporação usado solução de $K_3Fe(CN)_6$ (5 mmol.L⁻¹), $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol.L⁻¹) e KNO_3 (0.1 mol.L⁻¹) como eletrólito.

Dentre as condições de formação de filmes estudadas, os resultados sugerem que a melhor resposta frente à incorporação dos substratos foi obtida utilizando-se filmes de poli(4-aminofenol) formados em pH 8,0, sendo que polímeros formados em pH 0,4 e pH 12,0 também apresentaram resposta positiva para imobilização de L-alanina e α -cetoglutarato.

Nos estudos conduzidos em eletrodos de ouro e em sistema a base de tinta de grafite condutora não foi possível observar ondas de oxidação nem de redução para L-alanina e α -cetoglutarato nas condições estudadas.

Para os experimentos realizados com pasta de grafite como eletrodo de trabalho foi possível observar onda de redução para dos substratos (L-alanina e α -cetoglutarato) quando estes estavam em solução de pH alcalino.

4.2. PROPOSTAS DE CONTINUIDADE

Os resultados obtidos nas investigações realizadas mostraram que é possível imobilizar L-alanina e α -cetoglutarato, na superfície de eletrodo de disco de grafite, possibilitando estudos posteriores de reconhecimento de alanina aminotransferase (ALT), através da reação desta enzima com os substratos incorporados, para construção de um biossensor para hepatopatias.

Considerando que níveis elevados de ALT em sangue humano significam que o indivíduo está acometido por algum tipo de doença hepática, tem-se interesse também em otimizar o desenvolvimento do biossensor a fim de quantificar os níveis desta enzima em amostras de sangue.

CAPÍTULO 5:

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 1012.
2. Gothelf, K. V.; *J. Electroanal. Chem.* **2000**, *494*, 147.
3. Finot, M. O.; McDermott, M. T.; *Electroanal. Chem.* **2000**, *488*, 125.
4. Nelson, A.; *Langmuir* **1996**, *12*, 2058.
5. Galli, A.; Souza, D.; Garbellini, G. S.; Coutinho, C. F. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A.; Machado, S. A. S.; *Quim. Nova*, **2006**, *29*, 105.
6. Sotiropoulou, S.; Gavalas, V.; Vamvakaki, V.; Chaniotakis, N. A.; *Biosens. and Bioelectron.* **2003**, *18*, 211.
7. Malinski, T.; Taha, Z.; *Nature* **1990**, *358*, 676.
8. Moscone, D.; Pasini, M.; Mascini, M.; *Talanta* **1992**, *39*, 1039.
9. Downard, A. J.; *Electroanal.*, **2000**, *12*, 1085.
10. Albareda-Sirvent, M.; Merkoci, A.; Alegret, S.; *Sens. Actuators B* **2000**, *69*, 153.
11. Garcia, C. A. B.; Oliveira Neto, G.; Kubota, L. T.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *374*, 201.
12. Alegret, S.; *Analyst* **1996**, *121*, 1751.
13. Cosnier, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 507.
14. Vieira, I. C.; Lupetti, K. O.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova*, **2003**, *26*, 39.
15. Matuszewski, W.; Trajanowicz, M.; *Analyst* **1988**, *113*, 735.
16. Svancara, I.; Vytras, K.; Barek, J.; Zima, J.; *Anal. Chemistry* **2001**, *31*, 311.
17. Ounigipat, W.; Alexander, P. W.; Southwell-Keely.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *309*, 35.
18. Gorton, L.; *Electroanal.*, **1995**, *7*, 23.
19. Petit, C.; Kauffmann, J. M.; *Anal. Proc.* **1995**, *32*, 11.
20. Lowry J. P.; McAteer, K.; El Atrash, S. S.; Duuff, A.; O'Neill, R. D.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1754.
21. Palmisano, F.; Guerrieri, A.; Quinto, M.; Zambonin, P. G.; *Anal. Chem.* **1995**, *61*, 1005.
22. Rodriguez-Nieto, F. J.; Tucceri, R. I.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *416*, 1.
23. Yuqing, M.; Jianrong, C.; Xiaohua, W.; *Trends in Biotechnology* **2004**, *22*, 227.
24. Vidal, J. C.; Garcia-Ruiz, E.; Castillo, J. R.; *Microchim. Acta* **2003**, *143*, 93.
25. Palmisano, F.; Zambonin, P. G.; Centonze, D. F.; *J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 586.
26. Gerard, M.; Chaubey, A. Malhorta, B. D.; *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *17*, 345.

27. Yang, H.; Bard, A. J.; *J. Electroanal. Chem.* **1992**, *339*, 423.
28. Lapuente, R.; Cases, F.; Garces, P.; Morallon, E.; Vazquez, J. L.; *J. Electroanal. Chem.* **1998**, *451*, 163.
29. Gattrell, M.; Kirk, D. W.; *J. Electrochem. Soc.* **1992**, *139*, 2736.
30. Hawley, D.; Adams, R. N.; *J. Electroanal. Chem.* **1965**, *10*, 376.
31. Menezes, H. A.; Maia, G.; *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *586*, 39.
32. Vieira, S. N.; Ferreira, L. F.; Franco, D. L.; Afonso, A. S.; Gonçalves, R. A.; Brito-Madurro, A. G.; Madurro, J. M.; *Macromol. Symp.*, **2007**, (in press).
33. Clark Jr, L. C.; Lyons, C.; *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Acad. Sei, New York, **1962**, 29.
34. D'Orazio P.; *Clinica Chimica Acta*; **2003**, *334*, 41.
35. De La Guardia, M.; *Microchim. Acta*; **1995**, *120*, 243.
36. Wang, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **1999**, *19*, 47.
37. Tarley, C. R. T.; Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova*; **2005**, *28*, 1087.
38. Li, X. M.; Ju, H.Q.; Ding, C. F.; Zhang, S. S.; *Anal. Chim. Acta*, **2007**, *582*, 158.
39. Riccardi, C. S.; Costa, P. I.; Yamanaka, H.; *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 316.4
40. Ferreira, A. A. P.; Yamanaka. H.; *Quim. Nova*, **2006**, *29*, 137.
41. Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brow, R. S.; *Tibtech* **1995**, *13*, 178.
42. Disponível em <http://www.age.psu.edu/FAC/IRUDAYARAJ/biosensors/Notes/>, acessado em Dezembro de 2006.
43. Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Ariza, R.G.; Filho, L.R.G.; Madurro, J.M.; *J. Mater. Sci*, **2007**, DOI 10.1007/s10853-006-0235-0. 2007.01.15
44. Calvoa, E.J.; Danilowiczb, C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **1997**, *8*, 563.
45. Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, **2002**, *25*, 123.
46. Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker; New York, **1972**.
47. Dixon, M.; Webb, E. C.; *Enzymes*, Academic Press; New York, **1979**.
48. Palmer, T.; *Understanding Enzymes*, John Wiley & Sons; New York, **1985**.
49. Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier; São Paulo, **1986**, pp. 154.
50. Gava, A. J.; *Princípios de Tecnologia de Alimentos*; Nobel; São Paulo, **1988**, pp. 95.
51. Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; *Introdução à Química de Alimentos*, Varela; São Paulo, **1989**, pp. 109.

52. Voet, D.; Voet, J. G.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons; New York, **1995**, pp. 332.
53. Stryer, L.; *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, **1995**, pp. 181.
54. Devlin, T. M.; *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*; John Wiley & Sons; New, **1997**, pp. 127.
55. Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C.; *Quim. Nova*, **2002**, 25, 455.
56. Luppa, P.B.; Sokoll, L.J.; Chan, D.W.; *Clin. Chim. Acta*, **2001**, 1-26.
57. Mozaz, S. R; Marco, M. P.; Alda, M. J. L.; Barceló, D.; *Pure Appl. Chem.*, **2004**, 76, 723.
58. Setford, S. J.; *Trends Anal. Chem.*, **2000**, 19, 330.
59. Ferreira, A. A. P.; Colli, W.; Costa, P. I.; Yamanaka, H.; *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 175.
60. Gil, E. S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I.; *Quim. Nova*, **1999**, 22, 874.
61. D'Souza, S. F.; *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 337.
62. Sharma, S. K.; Sehgal, N.; Kumar, A.; *Curr. App. Phys.*, **2003**, 3, 307.
63. Lei, Y.; Chen, W.; Mulchandani, A.; *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 568, 200.
64. Marrazza, G.; Tombelli, S.; Mascini, M.; Manzoni, A.; *Clin. Chim. Acta*, **2001**, 307, 241.
65. Murphy, L.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2006**, 10, 177.
66. Ghosh, S.S.; Musso, G.F.; *Nucleic Acids Res.*, **1987**, 15, 5353.
67. Khrapko, K.R.; Lyssov, Y.P.; Khorlin, A.A.; Shick, V.V.; Florentiev, V.L.; Mirzabekov, A.D. ; *FEBS Lett.*, **1989**, 256, 118.
68. Beattie, K.; Eggers, M.; Shumaker, J.; Hogan, M.; Varna, R.; Lanture, J.; Hollis, M.; Ehrlich, D.; Rathman, D.; *Clin. Chem.*, **1993**, 39, 719.
69. Wang, J.; Cai, X.; Janssen, C.; Balakrishman, M.; *Electroanalysis* **1996**, 8, 20.
70. Mazzara, G.; Chianella, L.; Mascini, M.; *Biosens. Bioelectron.*, **1994**, 14, 43.
71. Tran L.D.; Piro B.; Pham M.C.; Ledoan T.; Angiari C.; Dao L.H.; Teston F.; *Synthetic Met.*, **2003**, 139, 251.
72. DeBusschere, B. D.; Kovacs, G. T. A.; *Biosens. Bioelectron.*, **2001**, 16, 543.
73. Bousse, L.; *Sensor. Actuat. B- Chem.*, **1996**, 34, 270.
74. Pancrazio, J.J.; Whelan, J.P.; Borkholder, D.A.; Ma, W.; Stenger, D.A.; *Ann. Biomed. Eng.*, **1999**, 27, 697.
75. Frense D.; Muller A.; Beckmann D.; *Sensor. Actuat. B- Chem.*, **1998**, 51, 256.
76. Deshpande, M. V.; Amalnerkar, D. P. ; *Prog. polym. Sci.*, **1993**, 18, 623.
77. Ikeda, T.; Katasho, I.; Kamh M.; Sesda, M.; *Agric. Biol. Chem.*, **1984**, 48, 1969.

78. Ramanathan, K.; *Ph.D Thesis*, IIT Delhi, India, 1995.
79. Ramanathan, K.; Ram, M.K.; Malhotra, B.D.; Murthy, A.S.N.; *Mater. Sci. Engg.*, **1995**, 3, 159.
80. Ramanathan, K.; Mehrotra, R.; Jayaram, B.; Murthy, A.S.N.; Malhotra, B.D.; *Anal. Lett.*, **1996**, 29, 1477.
81. Ramanathan, K.; Ram, M.K.; Verghese, M.M.; Malhotra, B.D.; *J. Appl. Polym. Sci.*, **1996**, 60, 2309.
82. Ramanathan, K.; Sundaresan, N.S.; Malhotra, B.D.; *Electroanal.*, **1995**, 7, 579.
83. Ramanathan, K.; Pandey, S.S.; Kumar, R.; Gulati, A.; Murthy, A.S.N.; Malhotra, B.D.; *J. Appl. Polym. Sci.*, **2000**, 78, 662.
84. Cosnier, S.; *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14, 443.
85. Minett, A. I.; Barisci, J. N.; Wallace, G. G.; *React. Funct. Polym.*, **2002**, 53, 217.
86. Ying-Sing, F.; Shi-Hui, S.; De-Rong, Z.; *Talanta*, **2000**, 51, 151.
87. Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Mir Publishers, Moscow, 1992.
88. Mulchandani, A.; Rogers, K.R.; *Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, 1998.
89. Tran, M.C.; *Biosensors*, Chapman and Hall and Masson, Paris, 1993.
90. Mikkelsen, S.R.; Cort' on, E.; *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley and Sons, New Jersey, 2004.
91. Blum, L.J.; Coulet, P.R.; *Biosensor Principles and Applications*, Marcel Dekker, New York, 1991.
92. Nikolelis, D.; Krull, U.; Wang, J.; Mascini M.; *Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Pollutants in Field*, Kluwer Academic, London, 1998.
93. Bartlett, P. N.; Birkin, P. R.; Ziegler, Ch.; Gopel, W.; Zerbi, G.; *Synth. Met.*, **1993**, 61, 15.
94. Wilson, G. S. Em *Biosensors: Fundamentals and applications*; Turner A.P.F., Karube, I.; Wilson, G. S., eds.; Oxford: Oxford University Press, 1987, p. 165.
95. Belini, A.; Fatibello, O. F.; Clemente, E.; *Braz. J. Food Technol.*, **2001**, 4, 75.
96. Schmidt, H.-L.; Gutberlet, F.; Schuhmann, W.; *Sens. Actuat. B-Chem.*, **1993**, 13-14, 366.
97. Liu H.; Ying, T.; Sun, K.; Li, H.; Qi, D.; *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 344, 187.
98. Okawa, Y.; Nagano, M.; Hirota, S.; Kobayashi, H.; Ohno, T.; Watanabe, M.; *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, 14, 229.

99. Gorton, L.; Lindgren, A.; Larsson, T.; Munteanu, F.D.; Ruzgas, T.; Gazaryan, I.; *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 400, 91.
100. Carelli, D.; Centonze, D.; De Giglio, A.; Quinto, M.; Zambonin, P.G.; *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 565, 27.
101. Lu, X. B. ; Zhang, Q.; Zhang, L.; Li, J. H.; *Electrochem. Commun.*, **2006**, 5, 874.
102. Tian, Y.; Mao, L.; Okajima, T.; Ohsaka, T.; *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 21, 557.
103. Qi, H; Zhang, C; Li, X.; *Sens. Actuat. B-Chem.*, **2006**, 114, 364.
104. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; *Fundamentals of Analytical Chemistry*; Saunder College Publishing; Orlando, Flórida, EUA, **1996**.
105. Trojanowicz, M.; Krawczyk, T. K.; *Microchim. Acta*, **1995**, 121, 167.
106. Alcântara, M. M.; *Tese de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, **2004**.
107. Carvalho, R. M.; Rath, S.; Kubota, L. T.; *Quim. Nova*, 2003, 26, 97.
108. Brecht, A.; Gauglitz, G.; *Biosens. Bioelectron.* **1995**, 10 , 923.
109. Godinho, R. E.; Mamer, C. P.; *VIII Congresso Luso-Afro-Brasileiro de Ciências Sociais* “O comportamento social pode levar a doenças hepáticas” **2004**.
110. Lida, V. H.; Silva, T. J. A.; Silva, A. S. F.; Silva, L. F. F.; Alves, V. A. F.; *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, **2005**, 41, 29.
111. Jorge, S. G.; Tommaso, A. M. A.; Mochizuki, M.; disponível em <http://www.hepcentro.com.br/biblioteca.htm>, acessado em Janeiro de 2007.
112. Varaldo, C. **Convivendo com a Hepatite C: Experiências e Inf. Portador do Vírus**. 2 ed. São Paulo: Carlos Varaldo, 2003. 268.
113. Xuan, G. S.; Oh, S. W.; Choi, E. Y.; *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 19, 365.
114. **Manual Merck: O Paciente em Primeiro Lugar**, disponível em http://www.msd-brazil.com/msd43/m_manual/mm_sec10_116.htm acessado em Janeiro de 2007.
115. Chang, Y.H.; Chang, T.C.; Kao, E.F.; Chou, C.; *Biosci. Biotech. Bioch.*, **1996**, 60, 1571.
116. Lin, C. E.; Chen, Y. T.; Wang, T. Z.; *J. Cromatogr. A* **1999**, 837, 241.
117. Gutz, I. G. R.; Disponível em <http://www2.iq.usp.br/docente/gutz/curtipot.html> acessado em Janeiro de 2007.
118. R. M. Silverstein, G. Clayton Bassler, T. C. Morril, in: “*Spectrometric Identification of Organic Compounds*” 5rd. ed.; J. Wiley & Sons, New York, 1991, p. 306.

119. H. A. Menezes, G. Maia, *J. Electroanal. Chem.* **2006**, *586*, 39.
120. M. A. Cotarelo, F. Huerta, C. Quijada, F. Cases, J. L. Vázquez, *Synth. Met.* **2005**, *148*, 81.
121. B. Yu, B. Khoo, *Electrochim. Acta* **2005**, *50*, 1917.
122. Bardavid, Y.; Kotlyar, A. B.; Yitzchaik, S.; *Macromol. Symp.* **2006**, *240*, 102.
123. Zoltowski, P.; *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *375*, 45.
124. Alves, V. A.; Brett, C. M. A.; *Electrochim. Acta* **2002**, *47*, 2081.
125. Zhang, J.; Shan, D.; Mu, S.; *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 4262.
126. MOTTA, V. T. Aminoácido e proteínas. In: _____. **Bioquímica**. 1. ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2005. 35.