

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS



TAMYRIS PASCHOAL PEREIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO
BASEADO EM MONOAMINA OXIDASE-b PARA DETECÇÃO DE
NEUROTRANSMISSORES

SOROCABA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS



Autora: Tamyris Paschoal Pereira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS DOS MATERIAIS.

Área de concentração: Nanociências e Nanomateriais

Orientador: Prof^ª. Dra. Marystela Ferreira

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Marli Leite de Moraes

SOROCABA
2015

P436d Pereira, Tamyris Paschoal.
Desenvolvimento de biossensor amperométrico baseado em monoamina oxidase-b para detecção de neurotransmissores. / Tamyris Paschoal Pereira. -- 2015.
75 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, *Campus* Sorocaba, Sorocaba, 2015
Orientador: Marystela Ferreira
Banca examinadora: Francisco Trivinho Strixino, Débora Terezia Balogh
Bibliografia

1. Materiais nanoestruturados. 2. Neurotransmissores. 3. Detectores. I. Título. II. Sorocaba-Universidade Federal de São Carlos.

CDD 620.115

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

FOLHA DE APROVAÇÃO

TAMYRIS PASCHOAL PEREIRA

“DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM MONOAMINA OXIDASE-B PARA DETECÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 27 de fevereiro de 2015.

Orientador(a)



Prof(a). Dr.(a) Marystela Ferreira
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof.(a). Dr. (a) Francisco Trivinho Strixino
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof(a). Dr.(a) Débora Terezia Balogh
USP – Universidade de São Paulo / IFSC – Instituto de Física de São Carlos



DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Silvana e Edson,
e ao meu irmão, Umberto. Pois tudo o que tenho e
alcansei devo a eles.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por que sem sua guia e força, eu não teria chegado até aqui.

A minha orientadora Marystela Ferreira, que me recebeu muito bem, muito me ensinou e teve infinita paciência. Obrigada por tudo, pela oportunidade, pela amizade, profissionalismo e por todo o aprendizado adquirido até o momento.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Marli Moraes pelo apoio e incentivo prestados.

Aos colegas de laboratório que foram muito bondosos e me ajudaram muito. Gostaria de agradecer a todos pela paciência, por me socorrerem sempre, pela amizade e por tudo o que me ensinaram. Minha imensa gratidão à Paula, Juliana, Anerise, Celina e Daniela, que sempre me amparam nos momentos das dificuldades, tenho certeza que sem vocês eu não teria conseguido.

Aos colegas de graduação que deram força e motivação nos momentos difíceis e decisivos para que eu chegasse até aqui. Em especial a Bianca, Paula e Thalita que foram companheiras mesmo distantes, ajudaram e incentivaram sempre, nunca me deixando desistir.

Aos meus pais e irmão pelo amor, pela compreensão, paciência, força e incentivo para que eu conseguisse completar essa etapa. Obrigada por tudo que fizeram e ainda fazem por mim.

*Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez.*

Thomas Edison

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Filmes automontados camada por camada (LbL).....	20
2.2	Lipossomos.....	22
2.2.1	Encapsulamento de Enzimas.....	24
2.3	Azul da Prússia, PB.....	27
2.4	Biossensores.....	29
2.4.1	Biossensores Amperométricos.....	32
2.5	Caracterização Espectrocópica por UV-Vis e Fluorescência.....	33
2.6	Métodos Eletroquímicos.....	37
2.6.1	Voltametria.....	37
2.6.2	Amperometria.....	38
2.7	Dicroísmo Circular.....	39
2.8	Dopamina.....	40
2.9	Monoamina Oxidase - b.....	41
3	OBJETIVOS.....	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO.....	46
4.1	Tampão fosfato de potássio.....	46

4.2	Solução de Polieletrólitos	47
4.3	Solução de Dopamina	47
4.4	Enzima	47
4.5	Preparo dos Lipossomos	48
4.6	Encapsulação da Enzima	48
4.7	Preparo do Substrato	49
4.8	Modificação da Superfície do Substrato	50
4.9	Montagem dos filmes LbL para Caracterização por Espectroscopia.....	51
4.9.1	Deposição do Filme PEI+MAO-b	52
4.9.2	Deposição do Filme PEI/MAO-b+Lipossomos.....	53
4.10	Montagem dos Filmes LbL para Caracterização Eletroquímica.....	54
4.10.1	Deposição do Filme PEI+MAO-b sob o ITO modificado com PB.....	55
4.10.2	Deposição do filme PEI/MAO-b+Lipossomo sob o ITO modificado com PB..	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
5.1	Espectroscopia de Dicroísmo Circular.....	57
5.2	Espectroscopia de Absorção	57
5.2.1	Espectros das soluções da MAO-b	57
5.2.2	Filme de PEI+MAO-b	58
5.2.3	Filme de PEI/MAO-b+Lipossomos.....	59
5.3	Voltametria Cíclica	62
5.4	Filmes Automontados para Caracterização Eletroquímica.....	63

5.4.1	Filme de PEI+MAO-b	65
5.4.2	Filme de PEI/MAO-b+Lipossomos.....	67
5.5	Estabilidade dos Biossensores de DA.....	71
5.6	Teste de Interferentes	72
6	CONCLUSÃO.....	73
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: [A] Representação esquemática do processo de adsorção do substrato entre soluções de cargas opostas (etapas 1 e 3), sendo as etapas 2 e 4 representativas do processo de lavagem. [B] Ilustração da bicamada formada pelo filme LbL, contendo as etapas de adsorção 1 e 3. Figura adaptada de [8]	21
Figura 2: Estrutura dos fosfolipídios (A) Dipalmitoil fosfatidil glicerol – DPPG e (B) Palmitoil fosfatidil glicerol – POPG. [9]	22
Figura 3: Representação da estrutura dos lipossomos. [19]	23
Figura 4: Representação de uma enzima encapsulada em um lipossomo. [8]	25
Figura 5: Ilustração de uma bicamada lipídica. [20]	26
Figura 6: Representação da atuação do PB como mediador de elétron. Figura adaptada de [32]	29
Figura 7: Classificação dos biossensores de acordo com a escolha do componente biológico. [34]	30
Figura 8: Esquema do funcionamento de um biossensor. Figura Adaptada [34].....	31
Figura 9: Descrição de cada geração de Biossensor Amperométrico. [36].....	32
Figura 10: Perdas por reflexão e espalhamento.....	35
Figura 11: Diagrama dos níveis de energia por (a) Absorção molecular, (b) Relaxação não-radioativa e (c) Fluorescência.....	36
Figura 12: Modelo da célula eletroquímica.....	38
Figura 13: Estrutura das catecolaminas, como noraepinefrina (A), serotonina (B) e dopamina (C). [41]	41
Figura 14: Estrutura tridimensional da MAO-b. [43].....	42

Figura 15: Estrutura tridimensional das enzimas MAO-a (A) e MAO-b (B); Em C e D são mostrados o cofator FAD e as tirosinas em azul, sendo (C) (D) correspondentes a MAO-a e MAO-b, respectivamente. [42].....	43
Figura 16: Estrutura do cofator da FAD, presente no sítio ativo da MAO-b. [43].....	44
Figura 18: Representação da oxidação da dopamina através da MAO-b. [43].....	45
Figura 21: Representação do processo de deposição do colchão, pela técnica LbL.	52
Figura 22: Representação do processo de deposição do filme PEI+MAO-b, pela técnica LbL.	53
Figura 23: Representação da deposição das bicamadas do filme PEI/MAO-b+Lipossomo, pela técnica LbL.....	54
Figura 24: Representação da deposição do filme PEI+MAO-b sobre o ITO/PB, pela técnica LbL.	56
Figura 25: Representação da deposição do filme PEI/MAO-b+Lipossomo sobre o ITO/PB, pela técnica LbL.	56
Figura 26: Espectros de dicroísmo circular para enzima MAO-b livre em tampão PBS e encapsulada com lipossomo POPG:DPPG na proporção 1:4 m/m.	57
Figura 27: (A) Espectro de absorção da solução da MAO-b em tampão fosfato de potássio, pH=7,4 e (B) da solução da solução de MAO-b incorporada em lipossomos, pH 7,4.....	58
Figura 28: (A) Espectro absorção do filme de (PEI+MAO-b) ₁₀ . <i>Inset:</i> Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI+MAO-b) ₈ , com excitação em 260 nm. <i>Inset:</i> Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.....	59
Figura 29: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+DPPG) ₁₀ . <i>Inset:</i> Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme	

(PEI/MAO-b+DPPG) ₈ , com excitação em 260 nm. <i>Inset</i> : Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.....	61
Figura 30: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG) ₁₀ . <i>Inset</i> : Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento de 8 bicamadas do filme (PEI/MAO-b+POPG) ₈ , com excitação em 260 nm. <i>Inset</i> : Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.	61
Figura 31: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ na proporção 1:4 (m/m). <i>Inset</i> : Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₈ na proporção 1:4 (m/m), com excitação em 260 nm. <i>Inset</i> : Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.	61
Figura 32: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ na proporção 1:1 (m/m). <i>Inset</i> : Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₈ na proporção 1:1 (m/m), com excitação em 260 nm. <i>Inset</i> : Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.	62
Figura 33: Voltametria cíclica da solução tampão com dopamina 1.10^{-1} mmolL ⁻¹ . <i>Inset</i> : Voltamograma cíclico do PB eletrodepositado sobre o ITO. V = 0,025 V/s vs ECS.	63
Figura 34: Representação do mecanismo da detecção de dopamina com a geração de H ₂ O ₂ . Figura adaptada de [8].	64
Figura 35: Ilustração do filme automontado de PEI/MAO-b+Lipossomo. Figura adaptada de [8].	65
Figura 36: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b) ₇ ; as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de dopamina ($0,1.10^{-1}$ mmolL ⁻¹). <i>Inset</i> : Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.	66

Figura 37: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+DPPG) ₇ , as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de Dopamina (0,1.10 ⁻¹ mmolL ⁻¹). <i>Inset</i> : Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.....	68
Figura 38: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG) ₇ , as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de Dopamina (0,1.10 ⁻¹ mmolL ⁻¹). <i>Inset</i> : Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.....	69
Figura 39: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₇ na proporção de 1:4 (m/m), as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de Dopamina (0,1.10 ⁻¹ mmolL ⁻¹). <i>Inset</i> : Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.....	69
Figura 40: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₇ na proporção de 1:1 (m/m), as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de Dopamina (0,1.10 ⁻¹ mmolL ⁻¹). <i>Inset</i> : Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.....	70
Figura 41: Estabilidade do biossensor do filme de (PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₇ , na proporção de 1:4 (m/m).	72
Figura 42: Resposta do filme [PEI/(MAO-b+1POPG:4DPPG)] ₇ para possíveis interferentes em meio de tampão PBS a 0.0 V (vs SCE). Cada adição corresponde a 100 µL das substâncias DA (dopamina, analito), AA (ascorbic acid), glicose e ácido úrico.....	73

LISTA DE ABREVIACOES

MAO-B	Monoamina Oxidase B
MAO	Monoamina Oxidase
MAO-A	Monoamina Oxidase A
DPPG	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol</i> (Dipalmitoil fosfatidil glicerol)
ITO	<i>Indium Tin Oxide</i> (xido de estanho dopado com ındio)
MLV	<i>Multilamellar Vesicle</i> (vesícula multilamelar)
PB	<i>Prussian Blue</i> (<i>Azul da Prússia</i>)
PEI	Poli(etilenoimina)
POPG	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol</i> (Palmitoil fosfatidil glicerol)
PVS	Poli(vinil sulfonato de sódio)
LbL	<i>Layer-by-Layer</i> (<i>camada por camada</i>)
PW	<i>Prussian White</i> (<i>Branco da Prússia</i>)
T _v	Temperatura de transio de fase
CV	Voltametria Cíclica
EQM	Eletrodos Quimicamente Modificados
SNC	Sistema Nervoso Central
HFC	Hexacianoferrato
DA	Dopamina
LB	Langmuir-Blodgett

RESUMO

Este trabalho é centrado na produção de filmes nanoestruturados de poli (etilenoimina) PEI em conjunto com MAO-B livre e encapsulada em lipossomos, construídos através da técnica *layer-by-layer* (LbL), camada por camada, para aplicação em biossensores. Lipossomos são vesículas microscópicas compostas de bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por um meio aquoso, capazes de encapsular moléculas hidrofílicas e/ou hidrofóbicas, que se encontram, respectivamente, no compartimento aquoso e inserida ou adsorvidas na membrana. Enzimas encapsuladas em lipossomos apresentam vantagens quanto à estabilidade e atividade catalítica em comparação com a enzima livre. Os lipossomos foram sintetizados por rotaevaporação e a enzima foi imobilizada na sequência. Os fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil oleil fosfatidil glicerol (POPG) e a mistura dos dois foram utilizados neste trabalho nas proporções de (1:1) e (1:4) (m/m). Para construir um biossensor de dopamina baseado em monoamina oxidase b, filmes finos foram montados de poli (etilenoimina) PEI juntamente com a enzima Monoamina oxidase b (MAO-b) imobilizada ou não em lipossomos e depositados sobre eletrodo de ITO, tendo como mediador de elétrons o Azul da Prússia. Os filmes obtidos foram caracterizados por espectroscopias de fluorescência, UV-visível e dicroísmo circular. Os resultados indicaram que o filme é depositado com sucesso sobre quartzo e ITO. As medidas amperométricas foram realizadas nos filmes para detectar sensibilidades e limite de detecção e verificar qual arquitetura é mais adequada para a melhor composição do biossensor. Os resultados obtidos mostram que os lipossomos conservam a estrutura conformacional da enzima e os filmes compostos por PEI/MAO-B+POPG:DPPG na proporção (1:4) (m/m) indicam um melhor desempenho do biossensor, devido ao valor de sensibilidade encontrado de $0,33 \pm 0,02 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$ e uma boa seletividade.

Palavras chave: Biossensor, dopamina, neurotransmissores, monoamina oxidase b, filmes nanoestruturados, lipossomos.

ABSTRACT

This work focuses on the production of nanostructured films of poly (ethyleneimine) PEI together with MAO-b free and encapsulated in liposomes constructed by the layer-by-layer technique (LbL), for application in biosensors. Liposomes are microscopic vesicles composed of concentric lipid bilayers separated by aqueous medium, capable of encapsulating hydrophilic and/or hydrophobic molecules, which are, respectively, included in the aqueous compartment and the membrane or adsorbed. Enzymes encapsulated in liposomes have advantages in stability and catalytic activity compared to the free enzyme. Liposomes were synthesized by using a rotary evaporator and subsequently the enzyme was immobilized. The phospholipids dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) and palmitoyl oleoyl phosphatidyl glycerol (POPG) and the mixture of the two were used in this study in the ratio (1:1) and (1:4) (m/m). To build a biosensor in neurotransmitter monoamine oxidase b on, thin films were set up on poly (ethyleneimine) PEI together with monoamine oxidase b enzyme (MAO-B) immobilized or not in liposomes and deposited on ITO electrodes, being the Prussian blue a mediator of electrons. The obtained films were characterized by fluorescence spectroscopy, UV-visible and circular dichroism. The results indicated that the film is deposited successfully on quartz and ITO. The amperometric measurements were performed to detect the film sensitivity and the detection limits and check which architecture is best suited for the best composition of the biosensor. The results achieved until now show that the liposome retain the conformational structure of the enzyme and films composed of PEI / MAO-B + POPG:DPPG in proportion (1:4) (w/w) indicate better performance of the biosensor, due to the sensitivity value of $0.33 \pm 0.02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$ found and a good selectivity.

Key words: Biosensor, dopamine, neurotransmitters, monoamine oxidase b, nanostructured films, liposomes.

1 INTRODUÇÃO

Consideráveis avanços têm sido alcançados no intuito de melhorar a eficiência de biossensores através do controle molecular e arquiteturas de filmes nanoestruturados, combinando materiais diferentes na mesma unidade sensorial. Alguns exemplos são a fabricação de filmes ultrafinos com diferentes materiais como, polímeros condutores, lipossomos e mediadores de elétrons para aumentam a sensibilidade do biossensor [1, 2].

Há vários métodos para a imobilização das enzimas em biossensores, sendo que as técnicas Langmuir-Blodgett (LB) [3] e automontagem, Layer-by-Layer (LbL) [4] têm sido bastante estudadas, pois permitem depositar uma diversidade de materiais orgânicos, biológicos e híbridos orgânico-inorgânicos em camadas ultrafinas, e combinar materiais distintos num mesmo sensor [9]. A técnica LbL modificada por Decher et.al.[8] baseia-se na interação eletrostática entre moléculas de cargas opostas e, permite o controle de espessura e arquitetura do filme depositado [9].

Esta técnica tem algumas vantagens sobre as outras técnicas de automontagem, por exemplo, quando comparada à técnica LB, a técnica LbL não necessita de equipamentos sofisticados e caros, o solvente mais utilizado é a água, o que torna o método simples, barato e com grande potencial tecnológico [9].

O uso de biomoléculas, proteínas e modelos de membranas, nestes sistemas são interessantes, pois podem simular interações específicas enzima-substrato, antígeno-anticorpo e/ou mimetizar a superfície da membrana celular, possibilitando o desenvolvimento de biossensores [8].

Os biossensores são dispositivos analíticos eficazes quando combinados com biomoléculas imobilizadas em transdutores químicos ou físicos [13]. Sendo assim, um biossensor combinado a um determinado componente biológico ativo, para o analito de

interesse, com a sensibilidade de um transdutor, que converte o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito [13].

Devido à diversidade dos biossensores, que abrange os elementos de reconhecimento biológicos e a suas características únicas, como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis, sua utilização tem sido muito promissora [8].

Para aumentar a eficiência do biossensor e minimizar o efeito de interferentes têm-se utilizado mediadores de elétrons, tendo como função o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Os mediadores eletroquímicos inorgânicos, como o hexacianoferrato (HCF) mais conhecido como Azul da Prússia (Prussian Blue, PB), auxiliam a catalise do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em um baixo potencial aplicado (0,0 V VS $Ag/AgCl/KCl_{sat.}$). A detecção em baixo potencial de H_2O_2 contribuiu para eliminar os possíveis interferentes eletroativos que podem ser encontradas em amostras reais [13, 15, 16].

Neste trabalho é utilizado o ITO modificado com Azul da Prússia como mediador de elétrons na detecção de H_2O_2 e a enzima MAO-b é imobilizada em diversos lipossomos com o propósito de fabricar um biossensor para detecção de neurotransmissores, destacando a dopamina (DA).

Há muitos estudos encontrados na literatura relacionados à dopamina, porém a metodologia utilizada para construção dos dispositivos para detecção da mesma são diferentes do realizado neste trabalho, sendo a técnica LbL utilizada pelos fatores positivos apresentados anteriormente. Os diversos trabalhos encontrados na literatura utilizam cromatografia, entre outras técnicas para construção de biossensores para detectar a dopamina.

A dopamina (DA) é um neurotransmissor liberado pelo cérebro muito estudado hoje em dia, pois desempenha uma série de funções, como movimentos, memória e atenção, estando relacionada às doenças como Mal de Parkinson e Esquizofrenia [40]. O estudo da

enzima encapsuladas nos diferentes lipossomos contribui para o melhor desempenho do biossensor [17].

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filmes automontados camada por camada (LbL)

A técnica de automontagem conhecida como “camada por camada” ou LbL, vem se destacando na produção de filmes ultrafinos, pela simplicidade da técnica. A técnica foi proposta no início da década de 1980, no trabalho de Sagiv [12] baseada na adsorção química (por ligações covalentes) entre compostos que contem cargas opostas. Porém, este fato requeria síntese de moléculas com funções específicas, limitando a técnica [12].

Como descrito por Iler, na década de 60 e reformulada por Decher e colaboradores na década de 90 [4,8], propuseram a técnica de automontagem baseada na interação eletrostática entre moléculas contendo grupos iônicos, como compostos anfífilicos e polieletrólitos [9]. Oposta à técnica descrita por Sagiv, nenhuma ligação covalente precisa ocorrer entre bicamadas formadas no filme [8], somente interações secundárias.

Nessa nova proposta a técnica baseia-se na imersão de um substrato sólido, previamente tratado, por um curto período de tempo numa solução aquosa carregada positivamente [12]. Posteriormente, o conjunto é lavado, a fim de eliminar o excesso de material, submetido ao processo de secagem e então imerso numa solução contendo outra solução carregada negativamente, de maneira a resultar na formação da bicamada, composta por camadas moleculares catiônicas e aniônicas, alternadamente adsorvidas através de atração eletrostática [8, 12, 16]. As Figura 1A e 1B representam esquematicamente o processo de fabricação dos filmes com a técnica LbL.

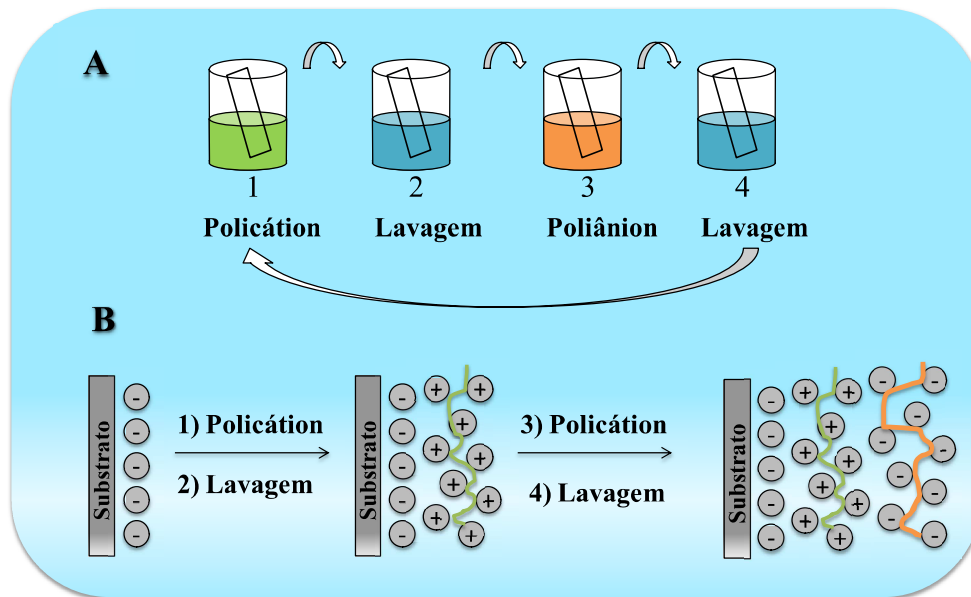


Figura 1: [A] Representação esquemática do processo de adsorção do substrato entre soluções de cargas opostas (etapas 1 e 3), sendo as etapas 2 e 4 representativas do processo de lavagem. [B] Ilustração da bicamada formada pelo filme LbL, contendo as etapas de adsorção 1 e 3. Figura adaptada de [8]

Os filmes são montados por um processo repetitivo de adsorção dos compostos de cargas opostas, sendo maior atrativo da técnica o seu baixo custo, pois necessita apenas de equipamentos básicos como béqueres e pinças.

A formação dos filmes automontados não se deve somente a interação eletrostática, mas também as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals, porém neste trabalho o enfoque é dado para filmes LbL fabricados por interação eletrostática [13].

Outra característica interessante do método é a possibilidade de controlar e ajustar a espessura e a estrutura do filme na escala nanométrica, simplesmente ajustando fatores como: força iônica, pH da deposição, tempo de adsorção e números de ciclos [14].

A técnica tem sido muito utilizada pelos pesquisadores que trabalham na área de biossensor molecular, se mostrando um método muito eficiente, pois através da técnica é possível um controle na organização e orientação molecular em uma escala nanométrica. As aplicações biossensoriais de sistemas automontados incluem principalmente biossensores

enzimáticos, imunossensores, sensores de DNA, sensores de proteínas e ácidos nucleicos. A aplicação de enzimas na fabricação de filmes automontados tem potencializado a fabricação de biossensores. Nesses sistemas quando as enzimas combinadas com substrato específico e mediadores de elétrons, a resposta do biossensor melhora consideravelmente [17, 18]. A razão para essa melhora pode estar no fato da enzima manter sua estrutura quando imobilizada por automontagem, uma vez que no processo pode-se manter a atividade ótima dela por meio de tampão pH e temperatura.

2.2 Lipossomos

Os lipossomos ajudam a preservar a enzima e o seu sitio ativo, fazendo com que ela não se desnature, sendo assim, preservando a sua atividade. Esses têm sido bastante estudados não só para a imobilização de enzimas, mas também como transporte de fármacos [19].

Uma suspensão aquosa de fosfolipídios forma vesículas multilamelares, cujos arranjos das bicamadas lipídicas, observado na Figura 2 e quando submetidas à agitação por vibrações ultrassônicas, as estruturas se rearranjam formando lipossomos [20]. Mais adiante retornaremos as bicamadas lipídicas.

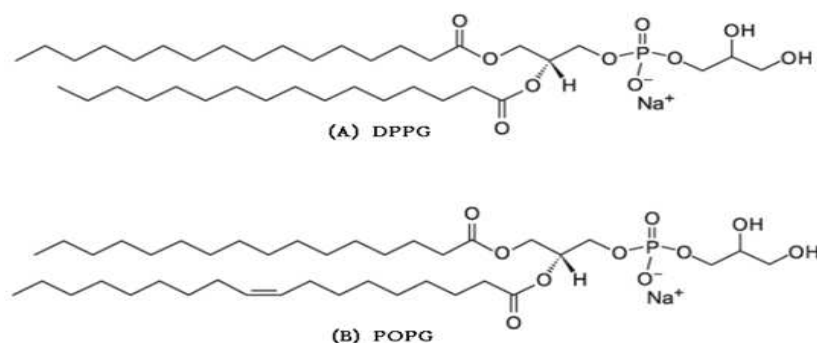


Figura 2: Estrutura dos fosfolipídios (A) Dipalmitoil fosfatidil glicerol – DPPG e (B) Palmitoil fosfatidil glicerol – POPG. [9]

Os lipossomos são vesículas esféricas, constituídas de uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo. São obtidos pela dispersão de fosfolipídios em meio aquoso e podem ser constituídos por uma ou mais bicamadas lipídicas intercaladas com o meio aquoso. O seu tamanho, bem como o número de bicamadas por vesícula, pode ser controlado com o método de preparação, composição e estrutura do lipídio [22]. Os lipídios de membrana são anfipáticos, o que quer dizer que uma de suas extremidades é hidrofóbica (apolar) cauda, e a outro é hidrofílica (polar), cabeça. As interações entre essas duas extremidades, direcionam o empacotamento em camadas, chamadas de bicamadas lipídicas, como ilustra a Figura 3 [20, 21].

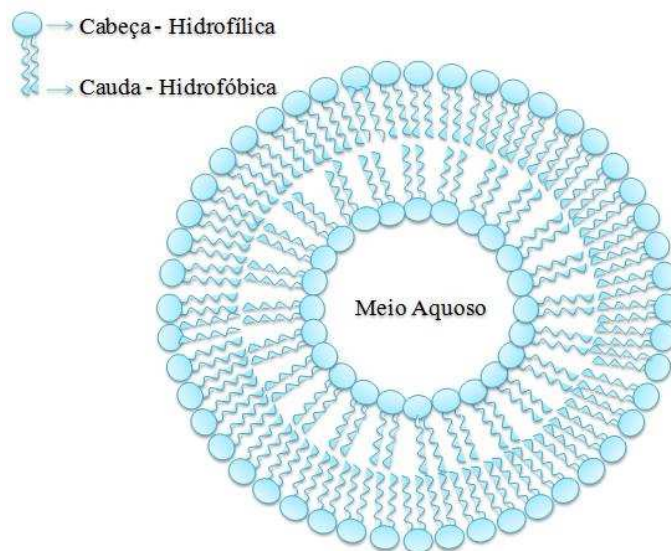


Figura 3: Representação da estrutura dos lipossomos. [19]

Diferente de outros sistemas transportadores/armazenadores, os lipossomos possuem uma elevada biocompatibilidade, especialmente quando estes são formados de lipídios pertencentes às famílias de lipídios naturais. Em geral, são sistemas altamente versáteis, cujo tamanho, lamelaridade, superfície, composição lipídica, volume e composição do meio aquoso interno podem ser manipulados [23].

O método de preparação do lipossomo é essencial para determinar o seu tipo, sendo assim, há diversos fatores que devem ser considerados como, composição química, número de camadas, distribuição de tamanhos, número de lamelas e o volume encapsulado. A preparação das vesículas lipídicas pode ser dividida em duas fases consecutivas: 1) preparação da fase aquosa e lipídica, 2) hidratação do lipídio [23, 24].

Os MLV são os lipossomos de mais simples preparação e por isso foram os primeiros a serem caracterizados como descrito na referência [30], sendo preparadas em duas fases; inicialmente as fases aquosas e lipídicas são preparadas, em seguida ocorre a hidratação do lipídio e posteriormente obtém-se o filme lipídico. Primeiramente deve-se optar pela escolha da composição lipídica e da solução aquosa a ser utilizada no preparo. De um modo geral, a solução escolhida é uma solução tampão que tenha afinidade com o lipídeo. Esse então deverá ser dissolvido num solvente ou em uma mistura de solventes orgânicos que seja eficiente no processo de dissolução e volátil como, clorofórmio ou mistura de clorofórmio-metanol (escolhido de acordo com o fosfolipídio utilizado para o preparo do lipossomo). A proporção do volume e concentração dos componentes da suspensão deve ser escolhida adequadamente, visando à concentração do lipídio pretendida [23].

A imobilização e estabilização dos lipossomos sobre superfícies sólidas exercem papel fundamental para o desenvolvimento dos biossensores, que são baseados nas interações entre os lipídios imobilizados e as proteínas específicas e no de sistemas de liberação controlada de fármacos como adesivos, que requer a incorporação do fármaco ou proteína nos lipossomos [8,9,10, 55].

2.2.1 Encapsulamento de Enzimas

Nos últimos anos têm sido feito grandes estudos para a melhoria nas técnicas de encapsulamento, devido à necessidade da obtenção de biossensores mais precisos e estáveis. Para o desempenho do biossensor consistente e eficaz, é de grande interesse a imobilização e estabilização de enzimas. A imobilização de enzimas sobre a superfície do eletrodo, pode ser realizada através de métodos químicos e físicos, como ligação covalente, cross-linking, encapsulamento e adsorção. Assim, a seleção dos materiais e métodos de imobilização devem ser escolhidos corretamente para manter a atividade da enzima o maior tempo em condições diversas [26].

Incorporar a enzima em lipossomos reduz possíveis deformações da estrutura enzimática, pois, enquanto ela está imobilizada e encapsulada, a membrana do lipossomo que é bastante parecida com uma membrana celular, oferece a enzima um ambiente biocompatível. Esse ambiente que o lipossomo oferece ajuda a estabilizar a conformação da enzima devido as interações hidrofóbicas entre as bicamadas lipídicas e a enzima [26].

Outro fator importante e que contribui para a conservação estrutural da enzima é trabalhar com a temperatura de transição de fase dos lipossomos levemente elevadas, permitindo uma melhor preservação da enzima através deles o que resulta em um aumento considerável da atividade do biocatalisador, como ilustra a Figura 4 [25].

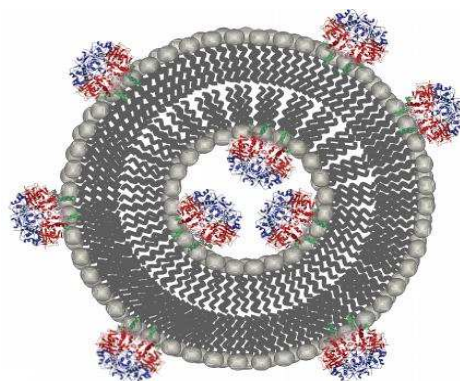


Figura 4: Representação de uma enzima encapsulada em um lipossomo. [8]

As bicamadas lipídicas têm sido muito utilizadas como modelos de membranas celulares desde 1985 nos estudos iniciados por Tamm & McConnell. São amplamente utilizadas para o estudo da estrutura e dinâmica de membranas, interações lipídio-receptor e propriedades eletroquímicas de membranas [20]. Diversas tentativas vêm sendo desenvolvidas aplicando as bicamadas lipídicas suportados em materiais sólidos para a aplicação em biossensores [25, 26]. As moléculas que compõem a bicamada não estão ligadas covalentemente entre si, devido a isso possuem uma flexibilidade o que possibilita alteração na sua forma e nos seus movimentos. Elas são constituídas basicamente por lipídios (tais como os fosfolipídios que são derivados de glicerol e contem fosfato em sua estrutura; os esfingolipídios são compostos por um aminoálcool contendo uma cadeia longa de hidrocarbonetos e colesterol que possui um grupo hidroxila em sua estrutura), além de proteínas e carboidratos como parte de glicoproteínas e glicolipídios, como ilustrado na Figura 5 [20].

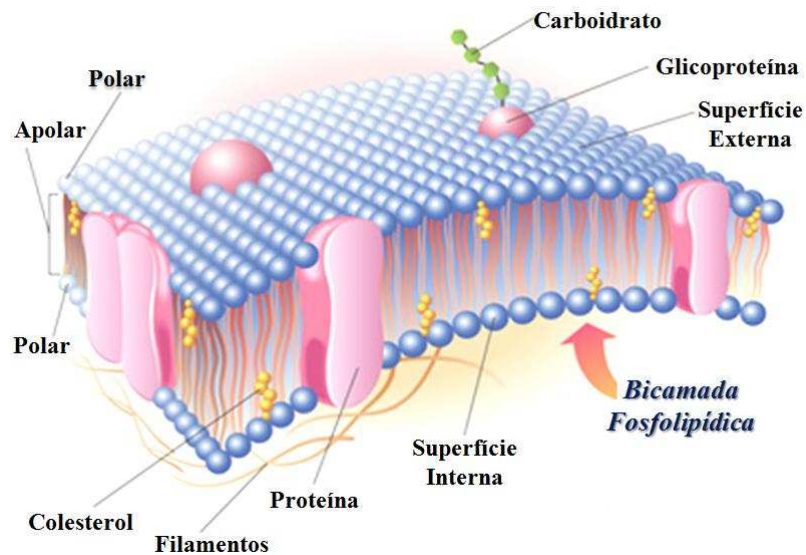


Figura 5: Ilustração de uma bicamada lipídica. [20]

Para aplicação em sensores eletroquímicos, bicamadas lipídicas têm sido muito exploradas, apresentam uma estrutura relativamente biocompatível para o desempenho desses biossensores [27].

As enzimas se desnaturam rapidamente quando expostas em diferentes ambientes, assim é importante que haja uma proteção das biomoléculas, podendo ser utilizado diversos materiais para a proteção. Diferentes métodos e materiais foram estudados para melhorar a estabilidade das enzimas, como por exemplo, vesículas poliméricas são conhecidas por evitar a desnaturação de enzimas por meio de encapsulamento. Sistemas híbridos com nanopartículas biomoleculares também foram estudados, mostrando ter um potencial para a construção de biossensores estáveis e sistemas bioeletrônicos eficientes [27].

2.3 Azul da Prússia, PB

Durante anos uma das principais preocupações era o desenvolvimento de biossensores amperométricos e o seu desempenho dependia da velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo. Mediante a necessidade de aumentar a seletividade e eficiência na transferência de elétrons do biossensor, estudos realizados mostraram que eletrodos quimicamente modificados melhoravam significativamente a transferência de elétrons entre enzima e a superfície do eletrodo [28].

A ideia envolve imobilização de mediadores apropriados na superfície do eletrodo de forma que o processo eletroquímico ocorra com menor potencial possível, para evitar eletrooxidação de mais espécies. A interação química entre a enzima encapsulada e o substrato modificado influencia diretamente o mecanismo catalítico [28, 29].

Os eletrodos quimicamente modificados (EQM) foram utilizados na eletroquímica inicialmente por Moses e colaboradores, em 1975 [31], para designar eletrodos com espécies

quimicamente ativas, sendo a sua superfície imobilizada, com o objetivo de controlar a natureza físico-química da interface eletrodo solução [31].

Alterar a superfície do eletrodo reduz perdas de energia, melhora a seletividade, assim como a sensibilidade do eletrodo. A modificação da superfície do eletrodo tende a melhorar a estabilidade química do filme, características básicas, necessárias para garantir a durabilidade e reprodutibilidade do dispositivo [30].

Há duas maneiras de realizar a modificação da superfície do eletrodo, podendo ser por síntese química ou por eletrodeposição. A técnica usada neste trabalho foi por eletrodeposição, que consiste em depositar o mediador de elétrons através da aplicação de um potencial constante em um eletrodo de trabalho ou pela aplicação de vários ciclos voltamétricos, utilizando a voltametria cíclica [31].

Diversos materiais inorgânicos têm sido utilizados para modificar a superfície dos eletrodos, dentre eles o que se destaca são os hexacianoferrato (HCF) mais conhecido como azul da Prússia (AP-hexacianoferrato de ferro) ou *Prussian Blue* (PB). Recentemente mais detalhes sobre as características eletroquímicas do HFCs e seus análogos vêm sendo disponibilizadas na literatura, como suas propriedades electrocromáticas, electrocatalíticas e espectroscópicas, devido a essas informações a sua aplicação tem aumentado consideravelmente nos últimos anos [32].

Uma das principais aplicações de sensores modificados com PB é a determinação catalítica do H_2O_2 em um potencial aplicado relativamente baixo (0,0 V vs Ag/AgCl/KCl_{sat.}). O baixo potencial de detecção de H_2O_2 favorece a eliminação de possíveis interferentes eletroativos que podem ser encontradas em amostras reais. Os sensores eletroquímicos que são modificados com PB para detecção de H_2O_2 ganharam o nome de ‘Peroxidase artificial’, devido a sua elevada seletividade fornecida por essa modificação superficial do eletrodo. A determinação do H_2O_2 é de grande importância e tem diversas aplicações, como em processos

oxidativos avançados para a degradação de poluentes, agente branqueador nas indústrias de papel e celulose, têxteis e produtos de higiene bucal [32]. A Figura 6 apresenta a modificação do eletrodo com PB.



Figura 6: Representação da atuação do PB como mediador de elétron. Figura adaptada de [32]

Na construção de um biossensor amperométrico é necessário o uso de enzima, por exemplo, do tipo oxidase, ou seja, uma enzima que atua através da oxidação do substrato de ITO e, em seguida, volte ao seu estado inicial ativo, esse processo ocorre por meio da transferência de elétrons para o oxigênio molecular, gerando como produtos finais uma forma oxidada do substrato e, como produto secundário, o peróxido de hidrogênio. Porém, é necessário um elevado potencial para a oxidação de peróxido de hidrogênio (0,7 V vs Ag/AgCl), o que acaba gerando muitos interferentes. Para minimizar o efeito de possíveis interferentes e a redução do potencial aplicado, os mediadores eletroquímicos, como o PB, são utilizados na fabricação de biossensores baseados em oxidases, além disso, catalisam a oxidação/redução do peróxido de hidrogênio [31, 32].

2.4 Biossensores

A partir da ideia de Clark e Lyons (1962) de utilizar uma enzima imobilizada em um eletrodo para determinação de glicose, um sensor foi construído baseando na oxidação de

glicose a ácido glicônico. O processo envolvia o consumo de oxigênio e a formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima glicose oxidase, de forma que o oxigênio ou o peróxido consumido poderiam ser detectados. Inicialmente, os dispositivos baseados em enzima ganharam o nome de “Eletrodos Enzimáticos”. Porém, com o avanço dos estudos sobre novos sensores físico-químicos, utilizando reações enzimáticas, foi dado um termo mais sofisticado a este tipo de sensores, o de “Biossensor” [33,34].

Os biossensores funcionam como dispositivos analíticos que combinam biomoléculas imobilizadas em um substrato que através de um transdutor converterá a concentração de um determinado analito em uma resposta mensurável [34]. O transdutor é um dispositivo elétrico que responde à medida que o sinal é eletronicamente amplificado, armazenado e exibido [34].

A Figura 7 ilustra o componente biológico e o transdutor e a escolha depende do tipo de medida e amostra que se tem interesse. O componente biológico determina o quanto de seletividade e especificidade terá o biossensor [35].

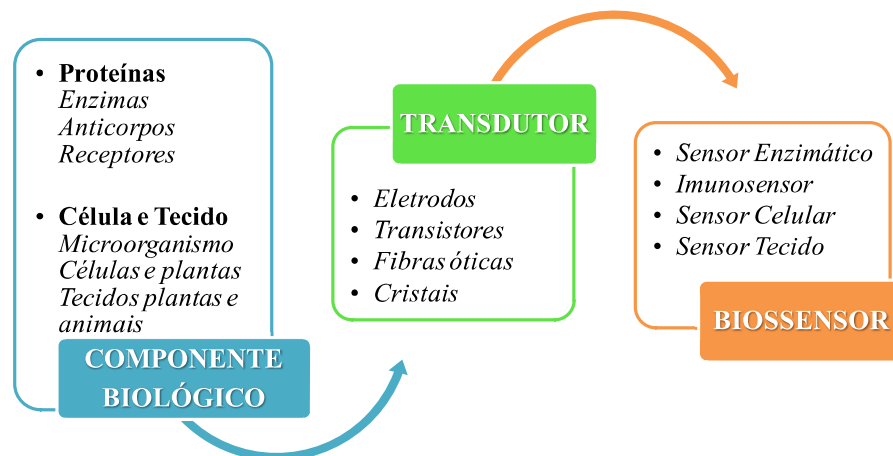


Figura 7: Classificação dos biossensores de acordo com a escolha do componente biológico. [34]

O biossensor é formado por duas partes o componente biológico e o transdutor, representado na Figura 8. O componente biológico reconhece o analito de interesse através de

uma reação química gerando assim um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, entre outros fatores que pode influenciar diversas variações. Já o transdutor converte a reação química que ocorre entre o componente biológico e o analito, em sinal na forma de corrente, potencial, variação de temperatura, etc [34]. Os biossensores oferecem uma resposta rápida, são econômicos e com a possibilidade de serem aplicados há um extenso número de amostras.

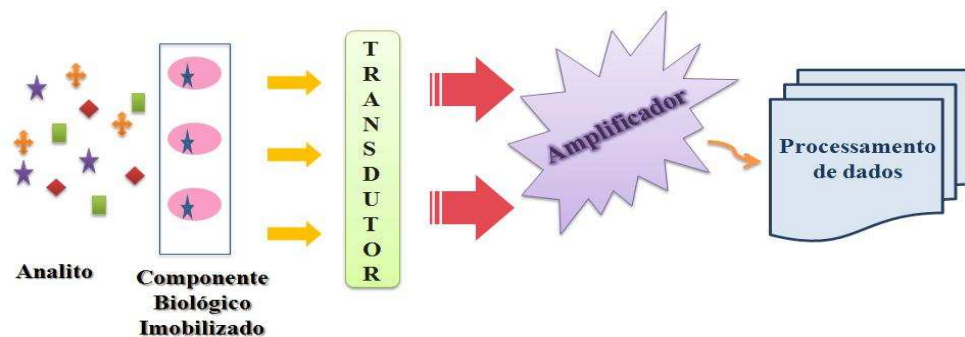


Figura 8: Esquema do funcionamento de um biossensor. Figura Adaptada [34]

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o componente biológico ou de acordo com o sistema de transdução utilizado. Sendo assim, as classes de biossensores podem ser divididas entre: eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutimétrico), Calorimétricos ou Óticos [36].

Os biossensores eletroquímicos são os mais estudados e comuns para análises clínicas e são baseados em eletrodos modificados por materiais biológicos imobilizados. São simples, sensíveis e confiáveis, além disso, apresentam uma rápida resposta e necessitam apenas de aparelhagem simples e de baixo custo, operam em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma extensa faixa de concentração. Entre todas as vantagens dos biossensores eletroquímicos, os equipamentos

envolvidos são relativamente baratos o que torna a técnica muito atrativa. Das classes dos biossensores eletroquímicos, o estudado neste trabalho foi o amperométrico [36].

2.4.1 Biossensores Amperométricos

Essa classe fornece a resposta através da medida da corrente que é produzida por uma reação química entre espécies eletroativas. Ocorrendo quando um potencial é aplicado e uma corrente é produzida, estando relacionada com a espécie em solução. Sendo assim, esse tipo de biossensor depende de um componente biológico que converta cataliticamente analitos eletroquimicamente inativos em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo de trabalho, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com o eletrodo de referência. A corrente gerada pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo [34, 35, 36].

Os sensores amperométricos podem ser classificados em três principais grupos: primeira, segunda e terceira geração. A Figura 10 descreve cada grupo. Essa classificação varia de acordo com o processo envolvido na transferência de elétrons [35].



Figura 9: Descrição de cada geração de Biossensor Amperométrico. [36]

Os biossensores amperométricos são operados através de difusão e tem as suas desvantagens como: uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima, os potenciais relativamente elevados podem oxidar espécies diferentes do composto de interesse, a corrente pode ser afetada pela velocidade com a qual o analito difunde até a superfície do eletrodo. A modificação do eletrodo através de mediadores de elétrons e a imobilização de enzimas ajudam a minimizar a saturação da enzima, assim como, os mediadores de elétrons aceleram o processo de transporte de elétrons [36]. A imobilização das enzimas pode ocorrer por adsorção física, ligação covalente, ligação covalente cruzada e encapsulação [35, 36].

A aplicação de biossensores tem crescido consideravelmente uma vez que muitas indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias tem feito uso desses dispositivos. Sua ampla aplicação e o uso de eletrodos enzimáticos, sua seletividade e rápida análise, diminuíram o custo, o que tem se tornado um atrativo para diferentes tipos de indústrias [36].

2.5 Caracterização Espectroscópica por UV-Vis e Fluorescência

O espectro eletromagnético cobre uma faixa enorme de energia (frequências) e, portanto, de comprimentos de onda. Na faixa de 200 a 400 nm pode-se considerar a região do ultravioleta e na faixa de 400 a 800 nm considera-se a região do visível [28].

As medidas espectroscópicas estão relacionadas com as interações da radiação com a matéria para obter informações sobre uma amostra utilizada para fazer a análise. De alguma forma, a amostra é geralmente estimulada através de uma energia na forma de calor, energia elétrica, luz, partículas ou por uma reação química. [39]

A lei da absorção, também é conhecida como lei de Lambert-Beer, determina a quantidade de luz que pode ser absorvida pela matéria. A grandeza da atenuação depende da

concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção [38].

À medida que a luz atravessa um meio contendo uma amostra que absorve (Figura 10), um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que a amostra é excitada. Para uma amostra de determinada concentração, quanto mais longo for o comprimento do caminho do meio através do qual a luz passa, mais centros absorventes estarão no caminho e maior será a atenuação. A transmitância T da solução é a fração da radiação incidente pela solução [38,58]:

$$T = P/P_0 \quad (1)$$

A absorbância A de uma solução está relacionada com a transmitância de forma logarítmica, como mostra a equação 2.

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (2)$$

Nas paredes das células podem ocorrer perdas por reflexão ou espalhamento[38,58], como pode ser observado na Figura 10 e essas perdas podem ser substanciais.

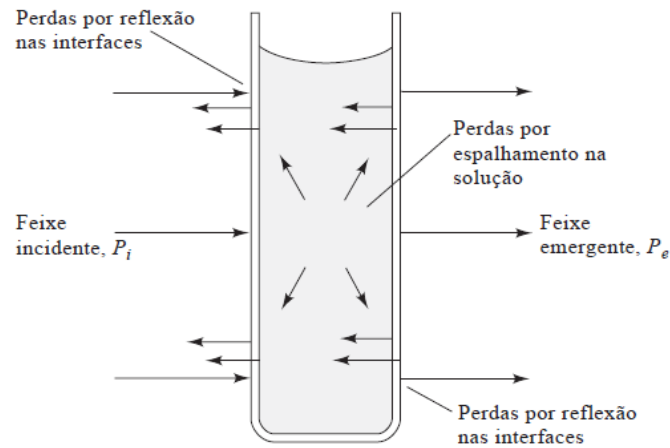


Figura 100: Perdas por reflexão e espalhamento.

Quando passa pela superfície a luz pode ser espalhada em todas as direções, devido à presença de moléculas grandes ou partículas presentes no solvente [38,58].

E esse espalhamento pode causar uma atenuação adicional do feixe quando este passa através da solução. As perdas por reflexão podem ocorrer em todas as interfaces entre os diferentes materiais [38,58].

Pela lei de Beer, também podemos determinar a absortividade a de uma amostra, sabendo que a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente c e ao caminho óptico b do meio absorvente [38,58], portanto,

$$A = \log \frac{P_0}{P} = abc \quad (3)$$

Quando um átomo é promovido a um estado excitado, por meio de uma radiação em um determinado comprimento de onda, a relaxação pode então ocorrer por reemissão de radiação fluorescente de comprimento de onda idêntico [38,58].

A fluorescência é um dos mecanismos pelo quais a molécula retorna ao seu estado de menor energia (estado fundamenta) depois de ter sido excitada pela absorção da radiação [38,58].

Todas as moléculas absorventes apresentam potencial para fluorescência, contudo, muitos compostos não o fazem porque suas estruturas proveem caminhos para uma relaxação não-radioativa mais rápida que a emissão por fluorescência [38,58].

A fluorescência requer estruturas características que diminuam a velocidade dos processos de relaxação não-radioativos e que tenha maior velocidade de relaxação por fluorescência, devido a isso são poucas as moléculas que fluorescem [58].

Pela Figura 11, percebemos que todas as linhas que terminam em níveis vibracionais mais altos do estado fundamental são os de energia menor e produzem emissão fluorescente de comprimentos de onda maiores que λ_1 . Isto é, as bandas de fluorescência molecular consistem na sua maior parte de linhas de comprimento de onda maiores que a banda de radiação absorvida, responsável pela sua excitação [38,58].

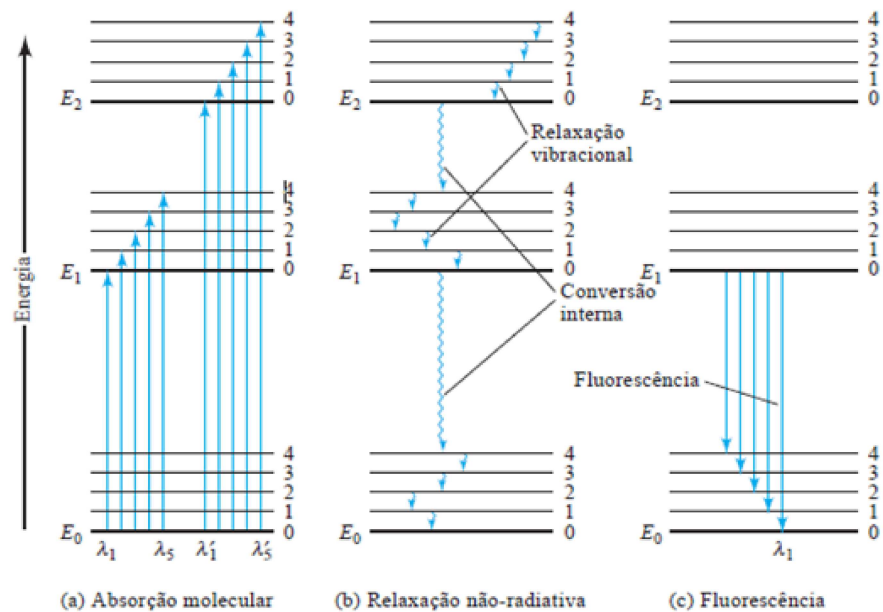


Figura 111: Diagrama dos níveis de energia por (a) Absorção molecular, (b) Relaxação não-radioativa e (c) Fluorescência.

2.6 Métodos Eletroquímicos

As medidas eletroquímicas para fins analíticos podem ser efetuadas em condições de equilíbrio (corrente nula) com sensores potenciométricos ou fora do equilíbrio (passagem de corrente) com sensores amperométricos ou voltamétricos [38, 39].

2.6.1 Voltametria

O campo da voltametria desenvolveu-se a partir da polarografia, um tipo de voltametria que foi descoberto pelo químico Jaroslav Heyrovsky no início de 1920.

Os métodos voltamétricos levam em consideração a interação da interface entre o eletrodo e a solução, sensores deste tipo necessitam de que uma determinada corrente seja aplicada e seu potencial seja controlado. Em comparação com outros sensores eletroquímicos, esses sensores são os mais sensíveis para o estudo de espécies eletroativas [38,39].

A voltametria estuda a relação entre a voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise em uma célula eletroquímica [36, 38, 39]. Através da voltametria podem-se obter dados quantitativos e qualitativos de uma espécie química a partir do registro de curvas corrente-potencial, realizadas no decorrer das reações de oxidação e redução dessa espécie [38].

O procedimento voltamétrico envolve o uso de uma célula com três eletrodos: (1) um eletrodo de trabalho, no qual ocorre a reação que está se investigando; (2) um eletrodo de referência, que completa a reação redox e têm um potencial constante e (3) um eletrodo auxiliar que permite a passagem de elétrons para uma espécie em solução ou, a passagem de elétrons de elétrons da espécie em solução, como representado na Figura 12 [36].

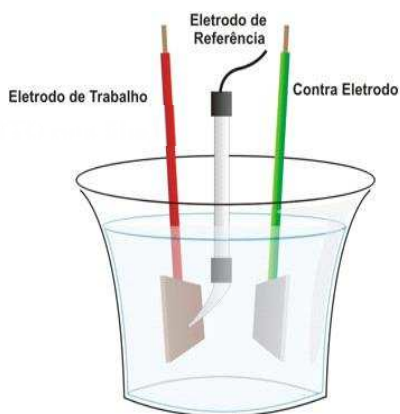


Figura 122: Modelo da célula eletroquímica.

O eletrodo de trabalho pode ser feito de ITO, carbono, Pt, Au entre outros materiais, o eletrodo auxiliar pode ser de Pt e o eletrodo de referência pode ser de calomelano. A espécie a ser estudada é colocada na célula eletroquímica onde estarão presentes esses três tipos de eletrodo [30]. A escolha de um material para ser usado como eletrodo varia em grande parte da zona de potenciais úteis do eletrodo no solvente empregado, e da qualidade e pureza do material [31].

Há diversas técnicas de voltametria, entre elas, a utilizada neste trabalho é voltametria cíclica. As técnicas amperométricas são amplamente utilizadas na tecnologia de sensores e no acompanhamento de titulações e reações de interesse biológico.

2.6.2 Amperometria

Diversos sistemas voltamétricos são desenvolvidos comercialmente para a determinação de espécies de interesse industrial específico e de pesquisa. De uma maneira geral, a amperometria refere-se à medição da corrente ao ser aplicado um potencial constante. Nestas circunstâncias, a grandeza da corrente elétrica é determinada pela concentração do

analito. As medidas amperométricas podem ser usadas para o acompanhamento da concentração de um determinado analito durante a titulação e para a fixação do ponto final.

Os sensores amperométricos baseados em enzima são dispositivos disponíveis no mercado. Por exemplo, o sensor de glicose é bastante utilizado em laboratórios clínicos, sendo este tipo de sensor, fundamentado na detecção de peróxido de hidrogênio, oxigênio ou pH, dependendo do analito e da enzima [38].

2.7 Dicroísmo Circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) detecta alterações através da medida de diferença da absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, após a luz passar pela amostra (equação 4). [53,57]

$$CD = A_E - A_D \quad (4)$$

O CD é muito utilizado para o estudo de moléculas quirais, macromoléculas, como proteínas, carboidratos, dendrímeros, entre outros compostos, que contenham unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir um sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. Quando essas moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente. [53, 57]

As ligações peptídicas da proteína podem interagir com os átomos de outras ligações peptídicas, podendo assim alterar a estrutura da proteína. E essa forma de estruturação que a proteína assume é chamada de “estrutura secundária”, assumindo arranjos helicoidais em determinados trechos da sequência de aminoácidos da proteína. Estudos realizados através de

crystalografia e de RMN, confirmam a presença de arranjos helicoidais, intercaladas com regiões menos estruturadas da proteína. [53] A radiação polarizada interage com as formas regulares dos arranjos atômicos, fazendo com que a luz com polarização circular no sentido horário seja absorvida diferentemente do que a luz com a polarização no sentido anti-horário. E o dicroísmo circular mede a diferença de absorção de radiação com polarização circular e permite conferir se estão ocorrendo tais arranjos helicoidais dentro da molécula de proteína. Através das análises de CD também é possível verificar se mudanças de temperatura, pH ou presença de outras moléculas no solvente que podem modificar a estrutura da proteína e conseqüentemente afetar a atividade biológica da macromolécula. [53, 57]

2.8 Dopamina

A dopamina (DA) é um neurotransmissor catecolamínico, ou seja, é solúvel em água e circula pelo sangue, ligadas a proteínas plasmáticas. A DA atua como terapêutico para alguns distúrbios importantes no sistema nervoso central (SNC), entre eles a doença de Parkinson, mal de Alzheimer e esquizofrenia. Sendo também um precursor de outros neurotransmissores como a norepinefrina e a serotonina. O mecanismo relacionado com esse tipo de neurotransmissor envolve diferentes componentes, que são distribuídos entre os membros da classe, inclusive enzimas de biossíntese e metabólicas. As catecolaminas consistem em um catecol (3,4-dihidroxibenzeno) conectado a um grupo amina, como mostrado na Figura 13 (A), 13(B) e 13(C) [40, 41].

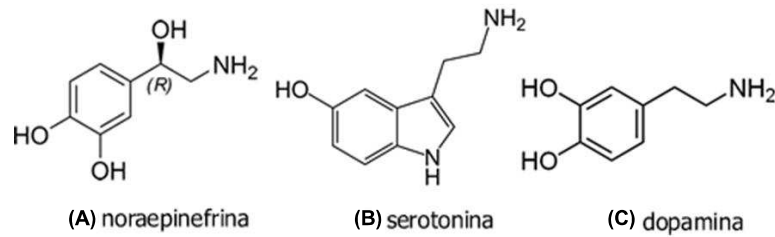


Figura 133: Estrutura das catecolaminas, como noraepinefrina (A), serotonina (B) e dopamina (C). [41]

A síntese da DA ocorre através da tirosina que ocorre no citoplasma do neurônio, em seguida, é transportada no interior de vesículas secretora para armazenamento e liberação [41].

A DA é um neurotransmissor muito importante e muito estudado atualmente, pelo fato de poder afetar os movimentos, memória e proporcionar sensações prazerosas. Uma parte do nosso cérebro chamado de gânglio básico regula nossos movimentos e depende da quantidade de dopamina para que sua função seja eficiente. Quando há uma deficiência de DA no cérebro, os movimentos podem tornar-se atrasados e não coordenados. Por outro lado, se há um excesso de dopamina, o cérebro faz com que o corpo faça movimentos desnecessários, tiques repetitivos. Os níveis de DA no cérebro, especialmente no córtice pré-frontal, ajuda a melhorar o funcionamento da memória. Portanto se os níveis de DA aumentam ou diminuem e não há um equilíbrio, a memória acaba sendo também afetada [41, 42].

Há diversos mecanismos utilizados que removem ou que controlam a DA e interrompem o sinal produzido pelo neurotransmissor. Um dos recursos é o uso das enzimas monoamina oxidase (MAO), que degradam a DA [43], mais adiante será mostrada a reação bioquímica.

2.9 Monoamina Oxidase - b

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima que tem como função impedir a ação das catecolaminas tanto no cérebro quanto na periferia. A MAO é encontrada em diferentes formas: a MAO-a, que fica no cérebro, bem como em sua periferia, e a MAO-b (figura 14), que se localiza no sistema nervoso central (SNC). As duas formas da MAO degradam a dopamina, assim como outros compostos monoamínicos [42].

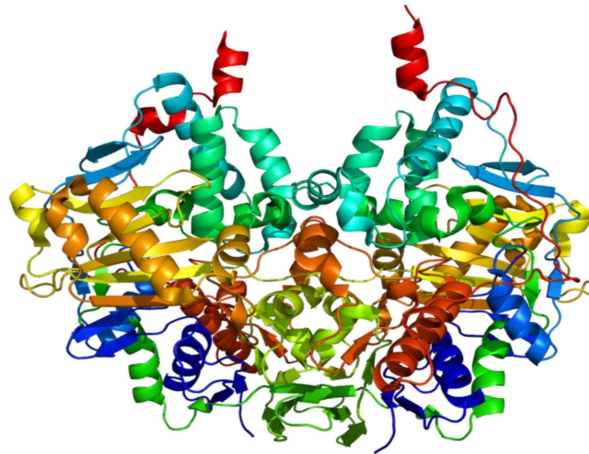


Figura 144: Estrutura tridimensional da MAO-b. [43]

Em condições normais a MAO-b cataboliza grande parte da dopamina do SNC. Para que haja um aumento da função da dopamina no SNC, estudos tem sido realizados para inibição da MAO-b. [43]

Dos diversos substratos da MAO os mais encontrados hoje em dia são os neurotransmissores, como dopamina, serotonina, norepinefrina, tiramina e triptamina. A isoforma MAO-b está relacionada a diversos distúrbios neurológicos, como o mal de Parkinson e mal de Alzheimer, já a MAO-a está relacionada com distúrbios psiquiátricos como depressão, ansiedade e esquizofrenia [36].

Diversos estudos têm contribuído para uma melhor compreensão dos fatores responsáveis pela seletividade das isoformas MAO-a e MAO-b [43, 44].

Nas figuras 15A e 15B observa-se que as duas formas da MAO apresentam estruturas terciárias muito similares. As regiões relacionadas aos resíduos da porção C-terminal da proteína, ressaltadas em verde, está envolvido no ancoramento da enzima na membrana externa da mitocôndria, sendo de extrema importância para manter a atividade catalítica da enzima. A diferença entre as formas da MAO estão no sítio ativo de cada uma, que é constituído por um cofator FAD e as duas tirosinas que constituem a “gaiola aromática”, Tyr407/Tyr444 em MAO-a e Tyr398/Tyr435 em MAO-b, como ilustra as Figuras 13C e 13D [43, 44, 45].

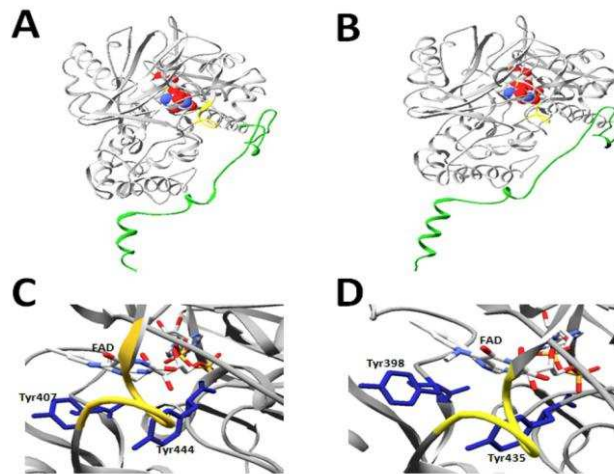


Figura 155: Estrutura tridimensional das enzimas MAO-a (A) e MAO-b (B); Em C e D são mostrados o cofator FAD e as tirosinas em azul, sendo (C) (D) correspondentes a MAO-a e MAO-b, respectivamente. [42]

A MAO-b é uma flavoenzima ligada externamente à membrana mitocondrial e pode ser encontrada em mamíferos, no organismo humano e situa-se predominantemente nas células gliais do cérebro, mas também pode ser encontrada nas plaquetas presentes no sangue e fígado. Sua estrutura é constituída por 520 aminoácidos e um cofator, a FAD. Os cofatores são substâncias não-proteicas que tomam parte das reações enzimáticas e são regeneradas para serem utilizadas em reações futuras. A FAD participa do processo de deaminação oxidativa das monoaminas (Figura 16) [45, 46].

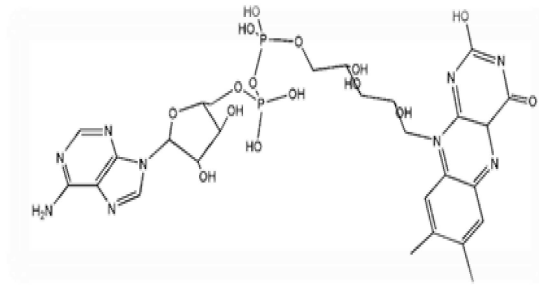


Figura 166: Estrutura do cofator da FAD, presente no sítio ativo da MAO-b. [43]

A deaminação oxidativa refere-se ao processo de remoção do grupo amina desses compostos substituindo-o por um grupo cetona (Figura 17) e tem como substratos seletivos a benzilamina, 2-fenil-etil-amina e a MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). Outros substratos catalisados por ambas as isoformas da MAO são: dopamina, epinifrina (ou adrenalina), noradrenalina, triptamina e tiramina [43, 46].

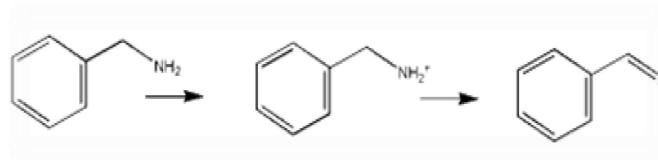


Figura 17: Processo de deaminação oxidativa. [43]

As monoaminas catalisadas pela MAO são neurotransmissores, o que torna o funcionamento dessa enzima essencial na saúde e no desenvolvimento normal do cérebro. Há também indicações de que o nível de atividade da MAO, determinado geneticamente, influencie aspectos da personalidade humana [43, 44].

A figura 18 ilustra a reação que ocorre quando a dopamina entra em contanto com a MAO-B.

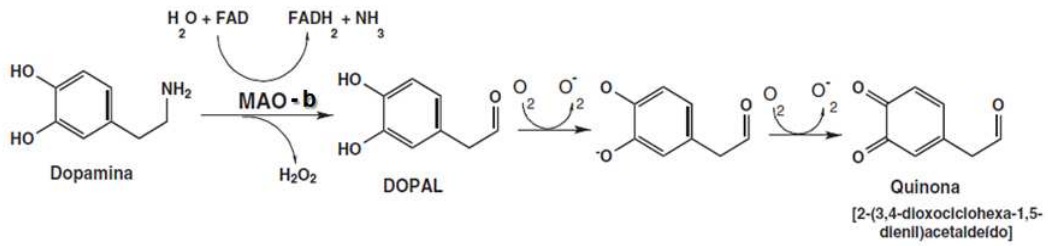


Figura 178: Representação da oxidação da dopamina através da MAO-b. [43]

A DA é metabolizada pela MAO-b, gerando o aldeído DOPAL, o qual pode sofrer oxidação com liberação de superóxido, além disso, há geração de H_2O_2 que nesse trabalho é detectado por amperometria [44, 46].

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a construção e caracterização espectroscópica de diferentes arquiteturas supramoleculares na forma de filmes finos utilizando a técnica de automontagem (LbL) imobilizando a enzima MAO-b e polieletrólitos. Com o intuito de preservar a estrutura enzimática a enzima foi incorporada em lipossomos visando o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para detecção de neurotransmissores.

Para alcançar este objetivo foram cumpridas as seguintes etapas definidas abaixo:

1. Estudar por espectroscopia de UV-Vis e Fluorescência o crescimento dos filmes LbL formado por PEI em junção com MAO-b.

2. Encapsular a enzima em lipossomos de DPPG+POPG e fabricar filmes LbL de PEI em junção com a MAO-b encapsulada e analisar a imobilização por espectroscopia de UV-Vis e Fluorescência.
3. Analisar através de amperometria a eletrotransferência direta dos filmes fabricados de PEI+MAO-b com e sem encapsulamento, em diferentes tipos de lipossomos. Calcular a sensibilidade e o limite de detecção referente à adição de dopamina (analito).
4. Utilizar o Azul da Prússia, como mediador de elétrons na reações enzimáticas que geram peróxido de hidrogênio, para modificar o eletrodo de ITO. Sobre ele depositar as bicamadas de PEI+MAO-b estando a MAO-b com e sem encapsulamento, em diferentes tipos de lipossomos. Analisar a resposta amperométrica, determinando a sensibilidade e limite de detecção referente à adição de dopamina.
5. Determinar a estabilidade do biossensor de dopamina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1 Tampão fosfato de potássio

A solução de tampão fosfato de potássio $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mmolL}^{-1}$ foi preparada utilizando fosfato de sódio bifásico da marca VETEC em água ultrapura do sistema de purificação Milli-Q com resistividade de 18,2 e pH 5,7. O pH do tampão foi ajustado para 7,4 usando o fosfato de potássio da marca VETEC preparando também em água ultrapura. Foi utilizado o tampão no preparo de todas as soluções e também no procedimento de lavagem dos filmes automontados.

4.2 Solução de Polieletrólitos

O polieletrólito catiônico PEI poli(etilenoimina) que tem massa molar média de 25000 g.mol^{-1} foi usado para construir os filmes automontados com MAO-b livre e MAO-b incorporada em lipossomos. Foi preparada uma solução de PEI na concentração de 1 mg.mL^{-1} em tampão fosfato de potássio pH 7,4.

O PVS poli(vinil sulfato de sódio), foi utilizado como polieletrólito aniônico e a solução foi preparada adicionando 4 μL de PVS em 9,96 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,4. O PVS foi utilizado na construção do colchão, formado por uma bicamada de filme polimérico (PEI/PVS) que é depositada na superfície do substrato antes da construção dos filmes com MAO-b [10].

4.3 Solução de Dopamina

Para os experimentos amperométricos para a detecção de dopamina (Sigma-Aldrich), uma solução foi preparada na concentração 1.10 $^{-1}$ mmolL^{-1} de dopamina em tampão fosfato de potássio com pH 7,4. A solução preparada não pode ficar por muito tempo em contato com o oxigênio, pois oxida gerando outro composto, assim, os testes foram feitos logo após a solução ser preparada.

4.4 Enzima

A enzima MAO-b, 5 mg.mL^{-1} , foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich, possui ponto isoelétrico (PI) entre 5,3-5,5 [37] e uma ótima atividade entre pH= 7,0-7,4 [37]. A solução foi preparada 0,2 mg.mL^{-1} de MAO-b em tampão fosfato de potássio com pH 7,4.

4.5 Preparo dos Lipossomos

Os lipossomos foram preparados a partir dos fosfolipídios Dipalmitoil fosfatidil glicerol – DPPG e (B) Palmitoil fosfatidil glicerol – POPG, que foram adquiridos comercialmente da *Avant Polar Lipids* e temperatura de transição de fase -2 e 41 °C [39], respectivamente.

Os filmes foram construídos com cada lipossomo individualmente, assim como, mistura deles na proporção de 1:4 e 1:1. O preparo dos lipossomos ocorreu por rotaevaporação a vácuo. O rotaevaporador utilizado é da marca IKA, modelo RV 10. Inicialmente os fosfolipídios foram solubilizados em uma mistura de clorofórmio:metanol (8:2 v/v), posteriormente os solventes foram removidos por evaporação a vácuo através de rotaevaporação por 15 min (50°C, 45 rpm), resultando em um filme lipídico, como ilustrado na figura 17.

4.6 Encapsulação da Enzima

Depois de preparar o lipossomo por rotaevaporação, o filme lipídico é tratado com uma solução de 2 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,4 contendo 20 µL de MAO-B. Posteriormente é colocado em ultrassom por duas horas. A figura 19 esquematiza o processo de encapsulamento da enzima.

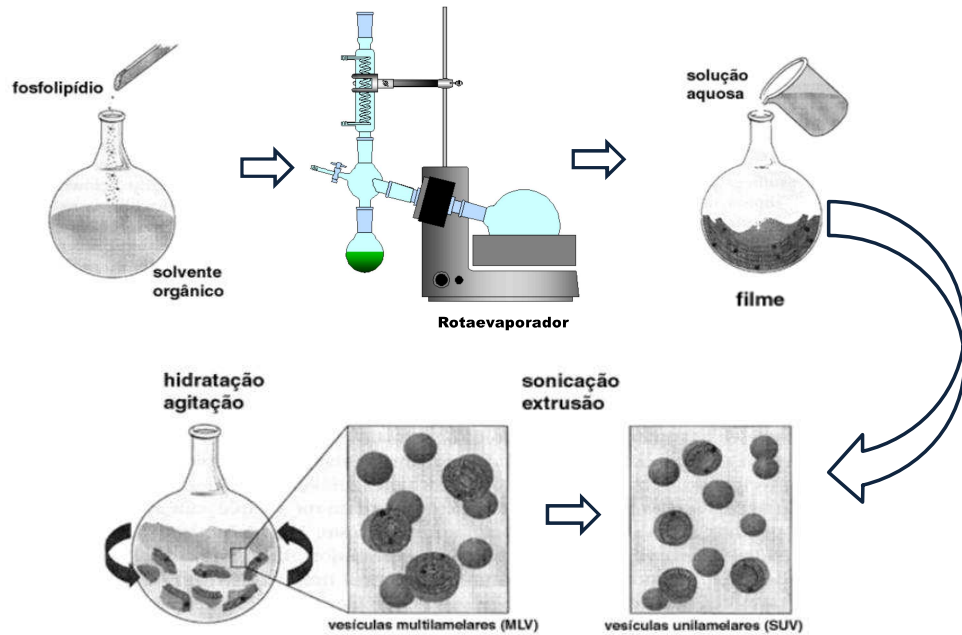


Figura 19: Processo de preparo dos lipossomos e encapsulação da enzima. Figura adaptada de [8].

4.7 Preparo do Substrato

O substrato utilizado para a caracterização espectroscópica dos filmes foram substratos de quartzo, que antes de serem usados passaram por hidrofilição. Para a hidrofilição os substratos foram imersos em uma solução básica $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ com 1:1:5 (v/v) por 10 minutos à temperatura variando entre 70 - 80°C e em seguida lavados com água ultrapura. Posteriormente os mesmos foram imersos em solução ácida $\text{HCl}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ com 1:1:6 (v/v) por mais 10 minutos à temperatura em torno de 70 – 80 °C e lavados com água ultrapura [41].

Na caracterização eletroquímica os substratos foram os de vidro recobertos com óxido de estanho dopado com índio (ITO) que o torna condutor elétrico e sobre ele foi eletrodepositado um filme de Azul da Prússia. Os substratos de ITO foram previamente limpos com clorofórmio e álcool isopropílico. O procedimento de limpeza consistiu em mergulhar os substratos no clorofórmio por aproximadamente 5 minutos, em seguida foram lavados com água ultrapura. Logo terminada a lavagem os substratos foram colocados em um

béquer com álcool isopropílico e levados ao ultrassom por 1 hora, e posteriormente lavados com água ultrapura [41].

4.8 Modificação da Superfície do Substrato

O Azul da Prússia (PB) foi utilizado como mediador de elétrons para detecção eletroquímica de oxigênio (O_2) e H_2O_2 . O PB é reduzido em branco da Prússia (Prussian White, PW) e sua forma reduzida e oxidada possuem atividade catalítica para oxidação de H_2O_2 e para redução de O_2 e H_2O_2 .

Para as medidas eletroquímicas foram utilizadas substratos de ITO (óxido de estanho dopado com índio). As lâminas de ITO foram modificadas por eletrodeposição do PB aplicando um potencial de +0,40 V durante 100 s. Para isto, preparou-se 5,0 mL de uma solução de $2,0 \text{ mmolL}^{-1}$ de $K_3Fe(CN)_6$ solubilizado em KCl (100 mmolL^{-1}) e misturou-se com uma solução de 5,0 mL de $FeCl_3$ ($2,0 \text{ mmolL}^{-1}$) solubilizado em HCl (10 mmolL^{-1}) [8,10]. O eletrodo modificado foi lavado com água ultrapura e imerso em uma solução 100 mmolL^{-1} de KCl e 10 mmolL^{-1} de HCl, em seguida, o eletrodo ITO/PB foi ciclado em uma faixa de potencial entre -0,01 e 1,0 V (vs ECS) na velocidade de 0,05 V/s, até a estabilização do comportamento voltamétrico. A velocidade de varredura foi de 50 mV.s^{-1} .

A Figura 20 ilustra o processo de detecção de H_2O_2 , em que a enzima catalisa o analito liberando o H_2O_2 , reduzido através da atividade catalítica do PB [8].

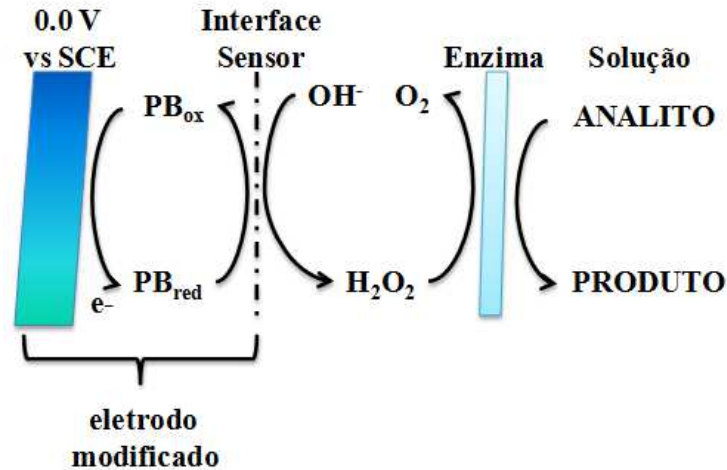


Figura 20: Representação do processo de um biossensor com eletrodo modificado. [8]

4.9 Montagem dos filmes LbL para Caracterização por Espectroscopia

Para acompanhar o crescimento dos filmes de PEI e MAO-b com e sem encapsulação, foi utilizada a técnica de espectroscopia de UV-Vis e Fluorescência. Os filmes foram depositados pela técnica LbL, sendo cada filme montado no substrato de quartzo, um contendo $(\text{PEI/MAO-b})_n$ e os outros contendo $(\text{PEI/MAO-b+DPPG})_n$, $(\text{PEI/MAO-b+POPG})_n$ e $(\text{PEI/MAO-b+POPG:DPPG})_n$, na proporção de 1:1 (m/m) e 1:4 (m/m). O procedimento de crescimento dos filmes será descrito abaixo:

Uma bicamada de colchão é depositada sobre o quartzo, antes que as bicamadas dos filmes sejam depositadas. O colchão é composto pelos polieletrólitos PEI e PVS, sendo um catiônico e o outro aniônico, respectivamente. Este procedimento se deve ao fato da superfície do quartzo conter imperfeições e o colchão ajuda a minimizá-las. O procedimento é realizado da seguinte maneira:

- 1) O substrato é imerso por 3 minutos em uma solução de PEI, pH 7,4.
- 2) Em seguida é lavado em uma solução de tampão pH 7,4, por 30 segundos para remoção de excesso e é secado com ar nitrogênio.

- 3) O substrato é imerso novamente por 3 minutos em uma solução de PVS, pH 7,4.
- 4) Por último é imerso na solução de lavagem de tampão, pH 7,4 por 30 segundos e secado novamente.

Tendo assim a formação da bicamada de colchão, a Figura 21 representa o processo de deposição. Esse procedimento é realizado duas vezes, pois são depositadas sobre o quartzo 2 bicamadas de colchão. O mesmo procedimento é realizado nos experimentos amperométricos, porém é utilizado o ITO como substrato com a superfície modificada com PB (descrito no item 4.8) antes da deposição do colchão.

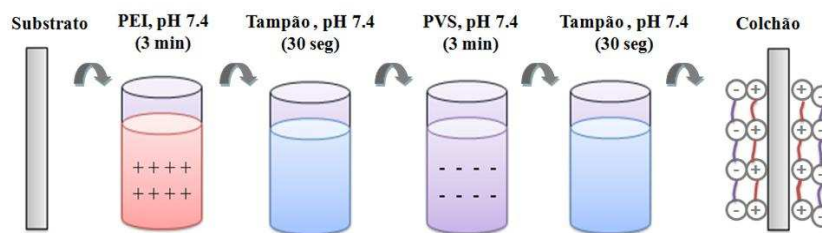


Figura 18: Representação do processo de deposição do colchão, pela técnica LbL.

4.9.1 Deposição do Filme PEI+MAO-b

Assim que o colchão foi depositado, o filme contendo uma camada de PEI e outra de MAO-b começa a ser feito. Todos os filmes feitos para a caracterização espectroscópica contém 10 bicamadas. E foram realizados da seguinte maneira:

- 1) O substrato é imerso por 3 minutos em uma solução de PEI, pH 7,4.
- 2) Em seguida é lavado em uma solução de tampão pH 7,4, por 30 segundos para remoção de excesso e é secado com ar nitrogênio.
- 3) O substrato é imerso novamente por 10 minutos em uma solução de MAO-b, pH 7,4.

- 4) Por último é imerso na solução de lavagem de tampão, pH 7,4 por 30 segundos e secado novamente.

Esse procedimento é repetido até que sejam formadas as 10 bicamadas e então há formação do filme (PEI+MAO-b)₁₀. A Figura 22 apresenta o processo de deposição. O acompanhamento do crescimento do filme foi sendo feito a cada bicamada depositada através de UV-Vis e fluorescência na faixa de comprimento de onda de 190 a 500 nm e 270 a 500 nm, respectivamente.

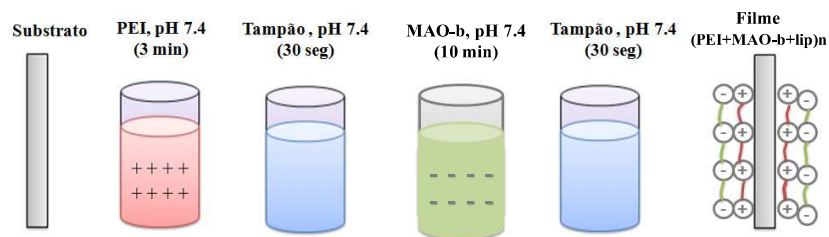


Figura 192: Representação do processo de deposição do filme PEI+MAO-b, pela técnica LbL.

4.9.2 Deposição do Filme PEI/MAO-b+Lipossomos

Após a bicamada de colchão depositada como descrito no item 4.9.1, o filme contendo uma camada de PEI e outra de MAO-b+Lipossomos começa a ser depositado, processo apresentado na Figura 23. Foram usados os fosfolípidios POPG, DPPG, POPG+DPPG na proporção de 1:1 e 1:4. Para todos os tipos de lipossomo utilizado, foi realizado o mesmo procedimento de deposição. Como descrito abaixo:

- 1) O substrato é imerso por 3 minutos em uma solução de PEI, pH 7,4.
- 2) Em seguida é lavado em uma solução de tampão pH 7,4, por 30 segundos para remoção de excesso e é secado com nitrogênio.

- 3) O substrato é imerso novamente por 10 minutos em uma solução de MAO-b+Lipossomos, pH 7,4.
- 4) E por último é imerso na solução de lavagem de tampão, pH 7,4 por 30 segundos e secado novamente.

Esse procedimento é repetido até que seja formada as 10 bicamadas e então há formação do filme (PEI/MAO-b+Lipossomos)₁₀. O crescimento do filme foi acompanhado a cada bicamada depositada através de UV-Vis e fluorescência, o acompanhamento do filme neste caso, ocorreu não apenas para verificar o crescimento, mas também a investigar a incorporação da enzima no lipossomo.

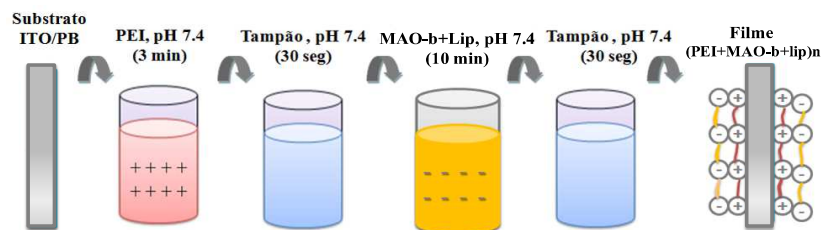


Figura 203: Representação da deposição das bicamadas do filme PEI/MAO-b+Lipossomo, pela técnica LbL.

4.10 Montagem dos Filmes LbL para Caracterização Eletroquímica

Para realizar as medidas amperométricas foi utilizado o potenciostato da Autolab modelo PGSTAT30 com uma célula eletroquímica convencional (Figura 12) de aproximadamente 15 mL com três eletrodos. Como eletrodo de referência foi utilizado o de calomelano saturado (ECS) $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{KCl}_{(\text{sat.})}$, como eletrodo auxiliar foi usado um de platina e os eletrodos de trabalho foram os filmes automontados sobre o substrato de ITO modificado com PB.

A modificação da superfície do eletrodo ocorreu como descrito no item 4.8, logo em seguida a deposição do colchão é feito como mostrado no item 4.9 e o filme é depositado. Os eletrodos de trabalho foram feitos com 2 bicamadas de colchão e 7 bicamadas de filme (PEI+MAO-b)₇ com e sem lipossomo. A solução eletrolítica utilizada foi de tampão fosfato de potássio $0,1 \cdot 10^{-3} \text{ mmolL}^{-1}$ com pH 7,4.

As medidas amperométricas foram feitas depois de todas as bicamadas estarem depositados. Logo em seguida, o filme feito era introduzido na célula eletroquímica e a medida era realizada. Através dessas medidas obtêm-se respostas possíveis de averiguar a sensibilidade, estabilidade e limite de detecção do biossensor de dopamina.

4.10.1 Deposição do Filme PEI+MAO-b sob o ITO modificado com PB

Antes de depositar o filme o ITO foi devidamente limpo com clorofórmio e álcool isopropílico, sua superfície foi modificada com PB. Após esse procedimento a bicamada de colchão foi depositada e posteriormente as bicamadas de (PEI+MAO-b)₇ começou a ser depositada sobre o ITO/PB. Devido a esta modificação na superfície do eletrodo com PB o potencial fixado foi de 0 mV, sendo assim a deposição foi feita da seguinte maneira:

- 1) A superfície do eletrodo foi modificada com PB por eletrodeposição.
- 2) Duas bicamada de colchão é depositada, pela técnica LbL.
- 3) O substrato é imerso por 3 minutos em uma solução de PEI, pH 7,4.
- 4) Em seguida é lavado em uma solução de tampão pH 7,4 por 30 segundos para remoção de excesso e é secado com ar nitrogênio.
- 5) O substrato é imerso novamente por 10 minutos em uma solução de MAO-b, pH 7,4.

- 6) Por último é imerso na solução de lavagem de tampão, pH 7,4 por 30 segundos e secado novamente.

A Figura 24 apresenta o processo de deposição do filme.

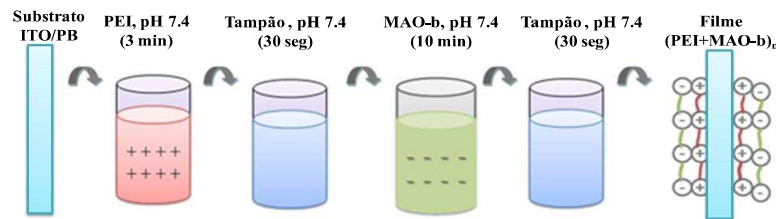


Figura 214: Representação da deposição do filme PEI+MAO-b sobre o ITO/PB, pela técnica LbL.

4.10.2 Deposição do filme PEI/MAO-b+Lipossomo sob o ITO modificado com PB

O procedimento de deposição do filme de $(\text{PEI/MAO-b+Lipossomo})_7$ é feito da mesma maneira como foi descrito no item 4.10.1. Os filmes construídos foram de $(\text{PEI/MAO-b+DPPG})_7$, $(\text{PEI/MAO-b+POPG})_7$, $(\text{PEI/MAO-b+POPG:DPPG})_7$ na proporção de 1:1 (m/m) e 1:4 (m/m). A figura 25 abaixo mostra o processo de deposição do filme.

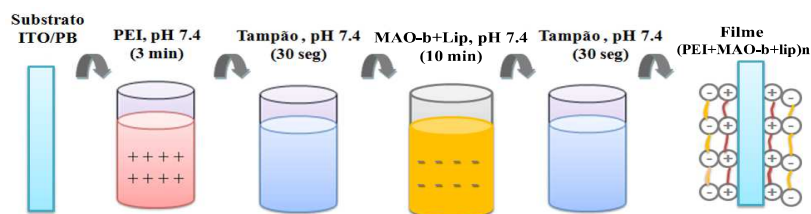


Figura 225: Representação da deposição do filme PEI/MAO-b+Lipossomo sobre o ITO/PB, pela técnica LbL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A Figura 26 ilustra os espectros de dicroísmo circular (CD) para a solução de MAO-b livre em tampão PBS e incorporada em lipossomos POPG:DPPG na proporção 1:4. O espectro de MAO-b incorporada nos lipossomos indicou dois mínimos em 208 nm e 221 nm, indicando a preservação da estrutura α -hélice, corroborando com resultados da literatura [10]. O espectro da MAO-b livre em tampão exibiu apenas um mínimo em 207 nm, possivelmente, devido as mudanças conformacionais na ausência do lipossomo, comprovando assim, a eficácia da incorporação na preservação da estrutura da enzima.

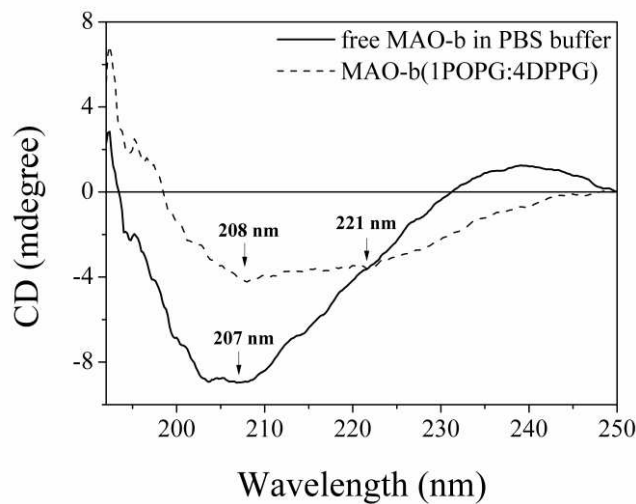


Figura 236: Espectros de dicroísmo circular para enzima MAO-b livre em tampão PBS e encapsulada com lipossomo POPG:DPPG na proporção 1:4 m/m.

5.2 Espectroscopia de Absorção

5.2.1 Espectros das soluções da MAO-b

A Figura 27 (A) ilustra o espectro de absorbância da solução de MAO-b, em tampão fosfato de potássio, pH 7,4. Todas as medidas espectroscópicas foram realizadas em uma cubeta de quartzo 1,0 cm de caminho ótico e na concentração de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ de MAO-b.

A enzima é constituída por tirosinas, que possui um anel aromático responsável pela absorção de luz ultravioleta próximo ao comprimento de onda de 260 nm [48]. Pode-se observar na Figura uma absorção máxima nesse comprimento de onda, confirmando a presença de tirosina presente na enzima.

A Figura 27 (B) ilustra o espectro de absorbância da solução de $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$ MAO-b+Lipossomo em solução fosfato de potássio também em pH 7,4. Para o preparo do lipossomo foi utilizado uma mistura de fosfolípido de POPG e DPPG na proporção de 1:4 (m/m). Tendo a mesma banda da tirosina em evidência novamente, confirmando que a enzima mantém sua conformação quando incorporada em lipossomos.

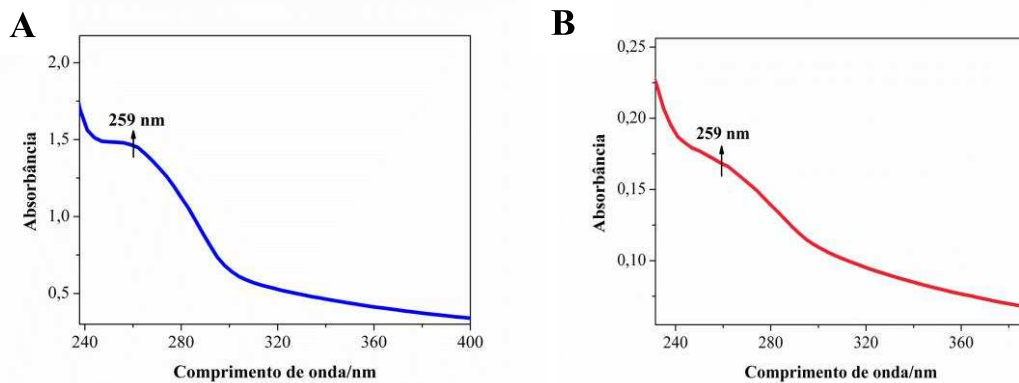


Figura 247: (A) Espectro de absorção da solução da MAO-b em tampão fosfato de potássio, pH=7,4 e (B) da solução da solução de MAO-b incorporada em lipossomos, pH 7,4.

5.2.2 Filme de PEI+MAO-b

O filme de PEI+MAO-b foi depositado sobre o substrato de quartzo como descrito no item 4.9.1 e o crescimento do filme foi monitorado a cada bicamada depositada por espectroscopia de UV-Vis e fluorescência. A Figura 28 (A) apresenta os espectros de

absorção de 10 bicamadas depositadas sobre o substrato. Os filmes de (PEI+MAO-b)₁₀ apresentam bandas de absorção em 254 nm [48], indicando a presença de tirosina da MAO-b, porém houve um deslocamento de 259 para 254 em comparação com o espectro da MAO-b em solução, devido à interação da enzima com o polieletrólito (PEI). O *inset* da figura apresenta o crescimento linear com o aumento da absorbância ($\lambda = 254$ nm) o que indica que a mesma quantidade de material é adsorvida a cada deposição. O coeficiente de correlação, R^2 , foi de 0,99 e teve uma absorbância máxima de 0,06.

A Figura 28 (B) apresenta os espectros de fluorescências obtidos durante o crescimento do filme (PEI+MAO-B)₈. O filme LbL apresenta banda de fluorescência (emissão) em 298 nm devido a presença de tirosina na MAO-B [10, 54], quando excitado em 260 nm. No detalhe, os filmes apresentaram comportamento de crescimento linear indicando que a mesma quantidade de material foi adsorvida a cada etapa de deposição.

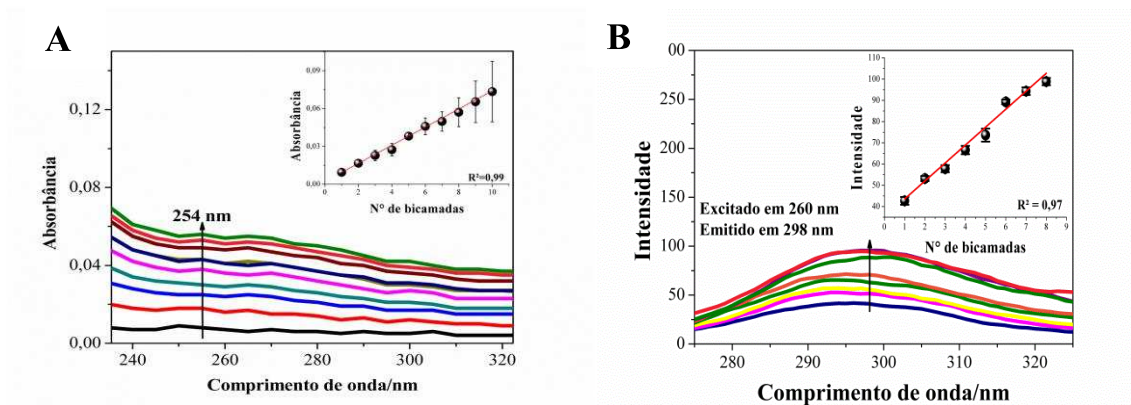


Figura 258: (A) Espectro absorção do filme de (PEI+MAO-b)₁₀. *Inset*: Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI+MAO-b)₈, com excitação em 260 nm. *Inset*: Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.

5.2.3 Filme de PEI/MAO-b+Lipossomos

Os espectros dos filmes de (PEI/MAO-b+DPPG)₁₀, (PEI/MAO-b+POPG)₁₀ e (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₁₀ na proporção 1:4 e 1:1 (m/m) serão apresentados abaixo. Os

filmes foram depositados sob o quartzo como descrito no item 4.9.2 e o crescimento do filme foi monitorado a cada bicamada por espectroscopia de UV-Vis. As Figuras 29 (A), 30 (A), 31 (A) e 32 (A) apresentam os espectros de absorção para o crescimento dos filmes. Num total de 10 bicamadas depositadas.

Os filmes apresentam bandas de absorção em 254 nm [48] indicando a presença de tirosina, porém houve um deslocamento de 259 para 254 em comparação com o espectro da MAO-b em lipossomo e uma menor evidência da banda referente à tirosina, devido ao espalhamento de luz na presença de lipossomos [8]. O *inset* da figura apresenta o crescimento linear com o aumento da absorbância ($\lambda = 254$ nm).

O crescimento desses filmes foi monitorado também por espectroscopia de fluorescência. As Figuras 29 (B), 30 (B), 31 (B) e 32 (B) apresentam os espectros de fluorescência para o crescimento dos filmes. Os filmes LbL apresentaram bandas de fluorescência (emissão) em 298 nm devido a presença de tirosina na MAO-B [10, 54], quando excitados em 260 nm. No detalhe, os filmes apresentaram comportamento de crescimento linear indicando que a mesma quantidade de material foi adsorvida a cada etapa de deposição. No detalhe da figura 29 (B) pode-se observar que o filme apresenta dois regimes de crescimento, portanto, até a terceira bicamada o filme apresenta um comportamento e a partir da quarta bicamada demonstra ter outro regime de crescimento. A variação de regime pode ser explicada pela variação das forças que estão atuando no processo de crescimento.

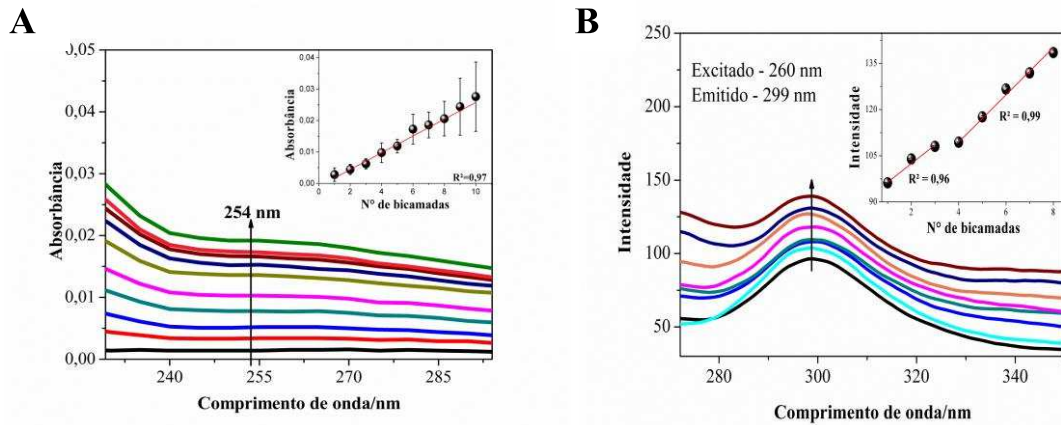


Figura 269: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+DPPG)₁₀. *Inset:* Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI/MAO-b+DPPG)₈, com excitação em 260 nm. *Inset:* Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.

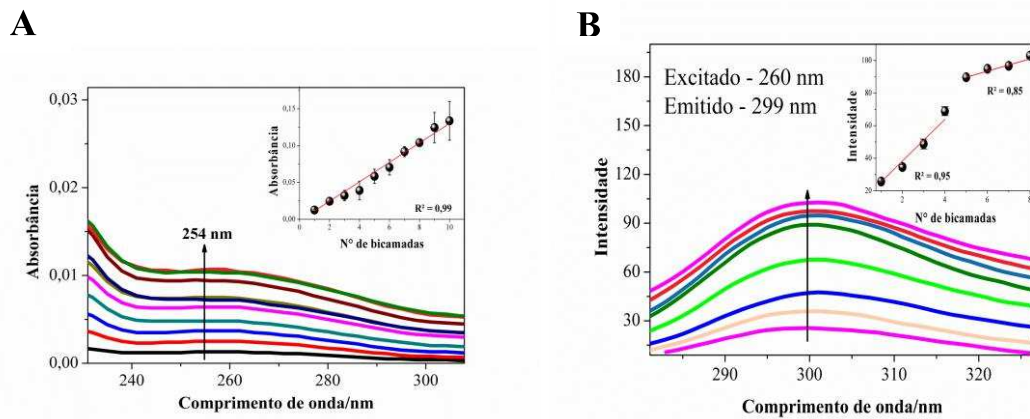


Figura 27: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG)₁₀. *Inset:* Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento de 8 bicamadas do filme (PEI/MAO-b+POPG)₈, com excitação em 260 nm. *Inset:* Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.

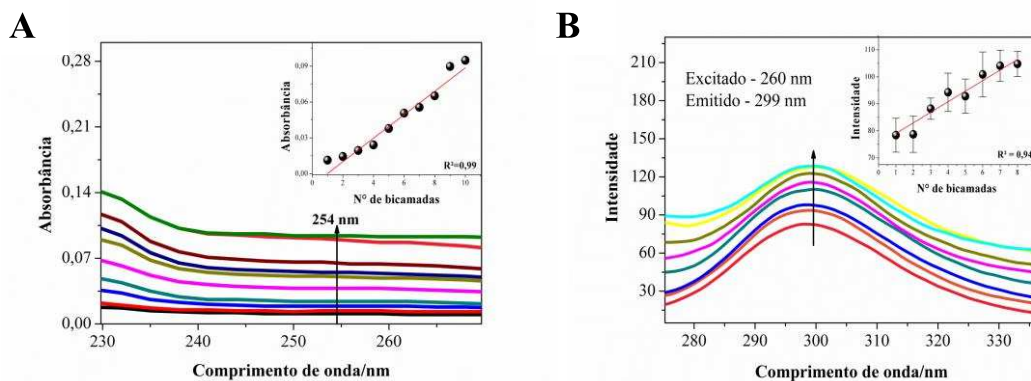


Figura 28: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₁₀ na proporção 1:4 (m/m). *Inset:* Crescimento linear do filme em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₈ na proporção 1:4 (m/m), com excitação em 260 nm. *Inset:* Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.

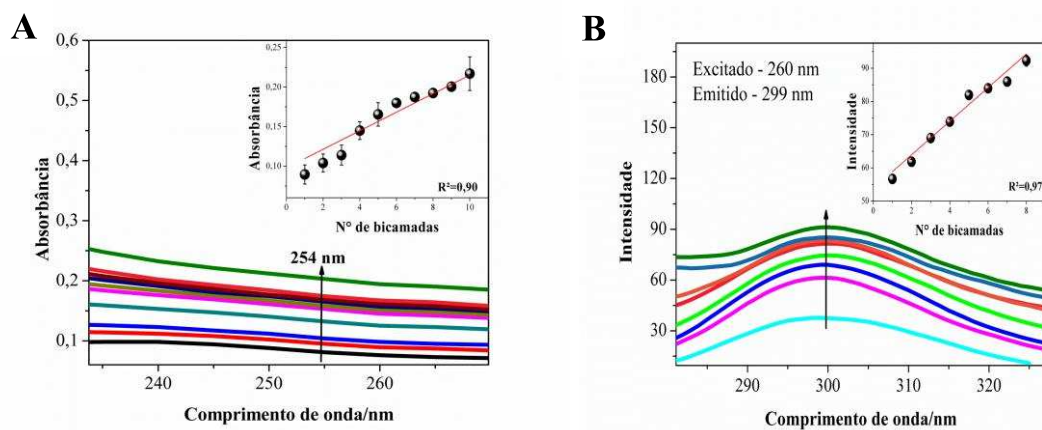


Figura 292: (A) Espectro de Absorção do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₁₀ na proporção 1:1 (m/m). *Inset:* Crescimento linear em 254 nm. (B) Espectro de fluorescência (emissão) do crescimento do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₈ na proporção 1:1 (m/m), com excitação em 260 nm. *Inset:* Crescimento do filme em função do número de bicamadas depositadas.

O crescimento linear dos filmes indica que a mesma quantidade de material é adsorvida a cada deposição. O coeficiente de correlação, R^2 e a absorbância máxima e intensidade máxima de cada filme estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Absorbância máxima ($\lambda = 254$ nm) e coeficiente de correlação, R^2 , dos filmes utilizados para caracterização por espectroscopia UV-Vis e fluorescência.

	(PEI/MAO-b+DPPG) ₁₀	(PEI/MAO-b+POPG) ₁₀	(PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ (1:4)	(PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ (1:1)
Absorbância Máxima	0,04	0,024	0,10	0,24
R²	0,97	0,96	0,99	0,90
	(PEI/MAO-b+DPPG) ₁₀	(PEI/MAO-b+POPG) ₁₀	(PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ (1:4)	(PEI/MAO-b+POPG:DPPG) ₁₀ (1:1)
Intensidade Máxima	140,0	104,2	130,0	91,2
R²	0,99	0,95	0,94	0,97

5.3 Voltametria Cíclica

Para realizar a detecção da dopamina utilizando a voltametria cíclica nas diferentes arquiteturas dos filmes automontados utilizou-se uma solução de dopamina ($1.10^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$) em tampão fosfato de potássio $0,1.10^{-3} \text{ mmolL}^{-1}$ em pH 7,4. A faixa de potencial aplicado foi de $-0,6 \text{ V}$ a $+0,6$ com velocidade de varredura de $0,025 \text{ mV/s}$ vs ECS [49]. A Figura 33 apresenta o voltamograma da dopamina e o *insert* representa o voltamograma do PB. O eletrodo de ITO foi modificado com PB como descrito no item 4.8, tendo picos característicos de oxidação em $0,14 \text{ V}$ e redução em $0,09 \text{ V}$ referente ao par de Fe(II)/Fe(III). Posteriormente os filmes foram depositados sobre a superfície modificada com PB. Para identificar e diferenciar os picos de oxidação e redução da dopamina e do PB foi realizado os voltamogramas apresentados na Figura 33. A dopamina apresentou picos de oxidação em $0,175 \text{ V}$ e redução em $-0,03 \text{ V}$, atribuídos a oxidação/redução da dopamina em dopal. Diferenciando-o dos picos de oxidação e redução do PB.

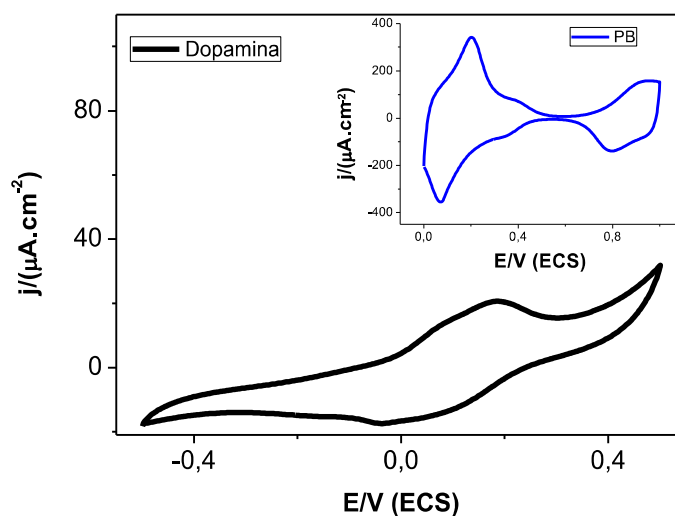


Figura 303: Voltametria cíclica da solução tampão com dopamina $1.10^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$. *Inset:* Voltamograma cíclico do PB eletrodepositado sobre o ITO. $v = 0,025 \text{ V/s}$ vs ECS.

5.4 Filmes Automontados para Caracterização Eletroquímica

Na figura 34 é apresentado o mecanismo de detecção da dopamina com geração de H_2O_2 a partir da reação enzimática. O PB é reduzido formando o branco da Prússia (Prussian White, PW), sendo que as formas reduzidas e oxidadas do PB apresentam atividade catalítica capaz de reduzir as espécies O_2 e H_2O_2 e oxidar o H_2O_2 [8]. Devido ao cofator flavina-adenosina-dinucleotídeo (FAD) contido na MAO-b, a enzima oxida a dopamina, gerando o aldeído DOPAL [42], o qual pode sofrer oxidação com liberação de superóxido, além disso, há geração de peróxido de hidrogênio, a reação enzimática ocorre como mostra a reação representada em 5:

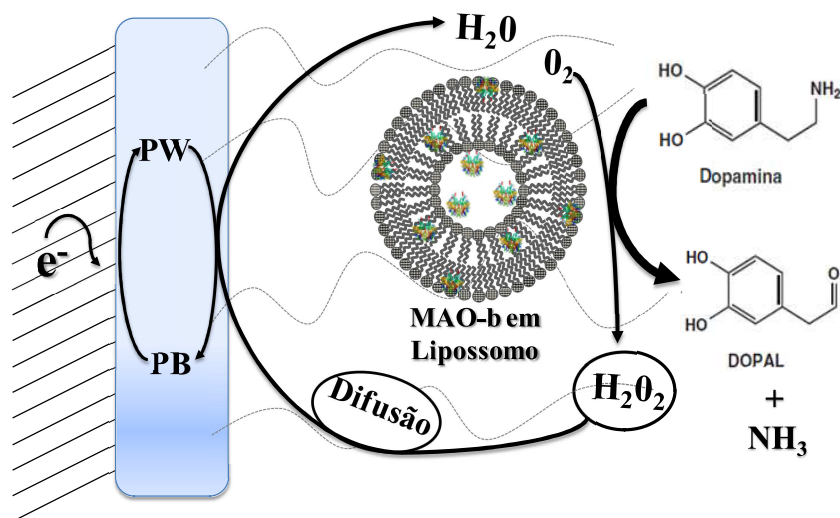
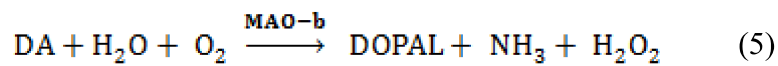


Figura 314: Representação do mecanismo da detecção de dopamina com a geração de H_2O_2 . Figura adaptada de [8].

A Figura 35 ilustra a estrutura do filme automontado pela técnica LbL, com polieletrólito PEI em junção com a MAO-b+Lipossomo.

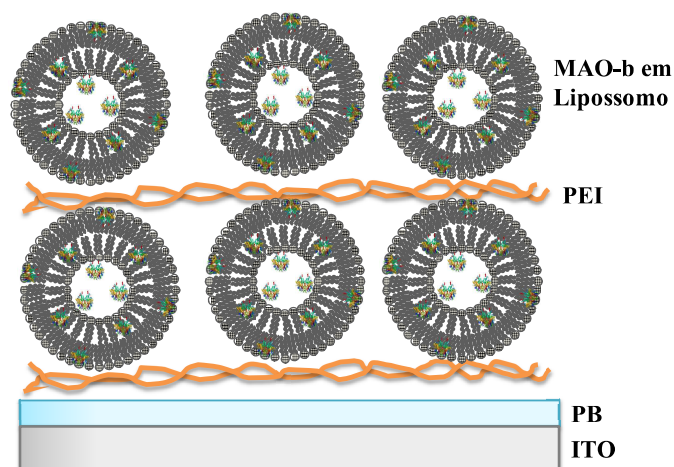


Figura 325: Ilustração do filme automontado de PEI/MAO-b+Lipossomo. Figura adaptada de [8].

Os filmes automontados para as medidas amperométricas foram construídos como descritos no item 4.10.1 e 4.10.2. A resposta dos filmes foi estudada em diferentes lipossomos e os filmes construídos em diferentes arquiteturas $(\text{PEI}+\text{MAO-b})_7$, $(\text{PEI}/\text{MAO-b}+\text{DPPG})_7$, $(\text{PEI}/\text{MAO-b}+\text{POPG})_7$, $(\text{PEI}/\text{MAO-b}+\text{POPG}:\text{DPPG})_7$ na proporção de 1:4 e 1:1(m/m). Com apenas 7 bicamadas já havia uma resposta do biossensor, portanto, manteve-se um padrão de 7 bicamadas para todas as outras arquiteturas.

Utilizou-se como solução eletrolítica a solução de tampão fosfato de potássio $0,1 \cdot 10^{-3}$ mmolL^{-1} , pH 7,4 e o potencial de 0,0 mV devido a superfície estar modificada com PB [50]. Logo após a estabilização da corrente, foram adicionadas alíquotas de 100 μL de dopamina ($0,1 \cdot 10^{-3}$ mmolL^{-1}) sob agitação. Nos itens 5.3.1 e 5.3.2 serão descritos os resultados amperométricos de cada filme automontado.

5.4.1 Filme de PEI+MAO-b

Figura 36 apresenta a resposta e a sensibilidade obtida para o biossensor composto do filme de $(\text{PEI}+\text{MAO-b})_7$ depositado no eletrodo de ITO modificado com PB, como descrito no item 4.10.1.

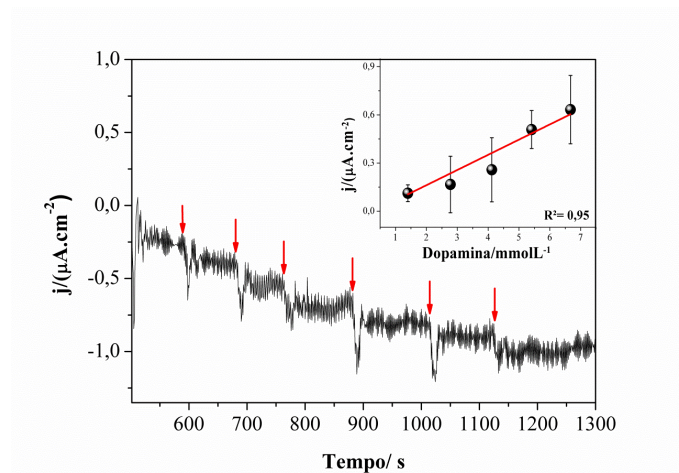


Figura 336: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b)₇; as setas vermelhas indicam as adições de 100 µL de dopamina (0,1.10⁻¹mmolL⁻¹). *Inset:* Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.

Foram realizadas 7 adições e em cada uma foi adicionado 100 µL de DA (0,1.10⁻¹mmolL⁻¹) e como pode-se observar da Figura 36, houve uma pequena variação da corrente de aproximadamente 0,1 µA.cm⁻². A sensibilidade do filme foi calculada através da curva analítica da variação da densidade de corrente em função da concentração de DA apresentada no *inset*. A sensibilidade encontrada foi de 0,094±0,001 µA.cm⁻².mmolL⁻¹ e o limite de detecção foi de 1,41±0,06 mmolL⁻¹. Com esses dados foi possível calcular a constante de Michaelis-Mentem, Km^{ap}, através da equação de Lineweaver-Burk [51], mostrada a seguir:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

O Km^{ap} encontrado foi de 13,53±5,29 mmolL⁻¹ e comparado com o valor encontrado na literatura de um Km^{ap} de 5 mmol⁻¹ [47], pode-se perceber um valor alto de Km^{ap}, tanto encontrado na literatura, como neste trabalho. Sabe-se que quanto maior o Km^{ap} menor é a atividade, portanto, a atividade da enzima está baixa, ocasionando assim uma baixa

sensibilidade e uma baixa variação de corrente com o decréscimo na quantidade de H_2O_2 que é gerado.

5.4.2 Filme de PEI/MAO-b+Lipossomos

Os filmes de $(PEI/MAO-b+DPPG)_7$, $(PEI/MAO-b+POPG)_7$, e $(PEI/MAO-b+POPG:DPPG)_7$, na proporção de 1:4 (m/m) e 1:1 (m/m) foram depositado no eletrodo de ITO modificado com PB, como descrito no item 4.10.2. As Figuras 37, 38, 39 e 40 apresentam as respostas e as sensibilidades dos filmes, respectivamente.

Primeiramente, será apresentada na Figura 37 a resposta do biossensor para DA com a arquitetura do filme $(PEI/MAO-b+DPPG)_7$.

Nota-se que o biossensor responde há presença de DA, com variação maior de corrente quando comparado com o biossensor sem lipídio. E em cada adição de DA houve uma variação de corrente de aproximadamente $0,2 \mu A.cm^{-2}$. O biossensor apresentou uma resposta linear nos intervalos em que ocorreram as adições ($1,4$ a $9,09 \text{ mmolL}^{-1}$ de DA) e tende a saturar após $10,2 \text{ mmolL}^{-1}$. A sensibilidade foi de $0,30 \pm 0,03 \mu A.cm^{-2}.mmolL^{-1}$, limite de detecção de $0,62 \pm 0,20 \text{ mmolL}^{-1}$, um K_m^{ap} de $5,80 \pm 0,81 \text{ mmolL}^{-1}$ e um coeficiente de correlação, R^2 , de 0,99. A tabela 2 na página 69 ilustra os resultados comparativos para todas as arquiteturas dos biossensores estudados.

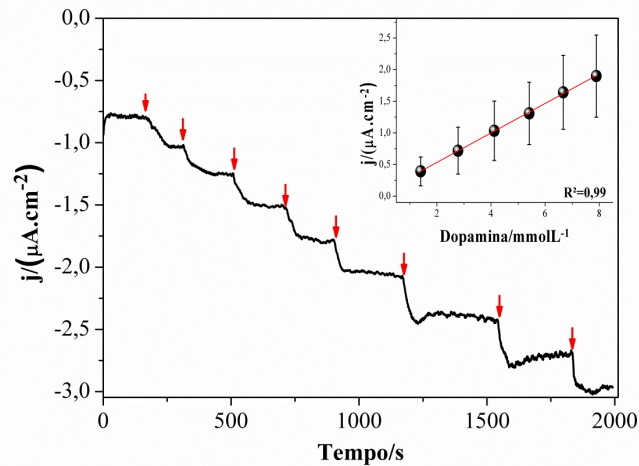


Figura 347: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+DPPG)₇, as setas vermelhas indicam as adições de 100 μL de Dopamina ($0,1\cdot 10^{-1}\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). *Inset:* Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.

A Figura 38 apresenta a resposta do biossensor na arquitetura (PEI/MAO-b+POPG)₇ na qual a enzima foi incorporada em lipossomo POPG. Verifica-se que o biossensor também responde há presença de DA, com uma variação menor de corrente, tendo em cada adição uma variação de corrente de aproximadamente $0,17\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. O biossensor apresentou uma resposta linear nos intervalos em que ocorreram as adições ($1,4$ a $9,09\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dopamina) e tende a saturar após $10,2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dopamina. A sensibilidade foi de $0,27\pm 0,03\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, limite de detecção de $2,22\pm 0,21\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, um K_m^{ap} de $10,71\pm 1,58\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação, R^2 , de 0,99.

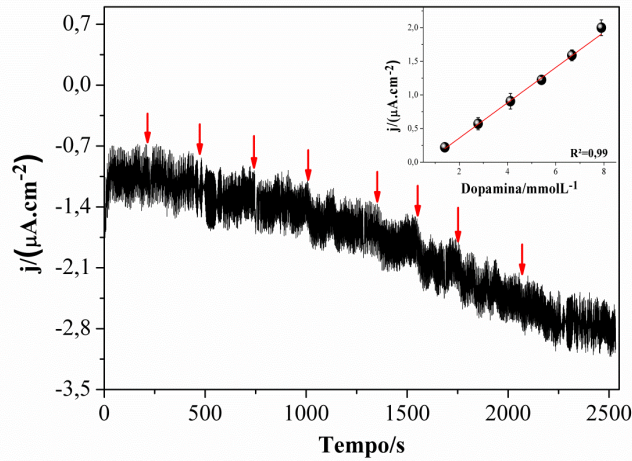


Figura 358: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG)₇, as setas vermelhas indicam as adições de 100 μL de Dopamina ($0,1 \cdot 10^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$). Inset: Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.

As respostas dos biossensores compostos dos filmes (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:4 (m/m) e 1:1 (m/m), pode ser conferida nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

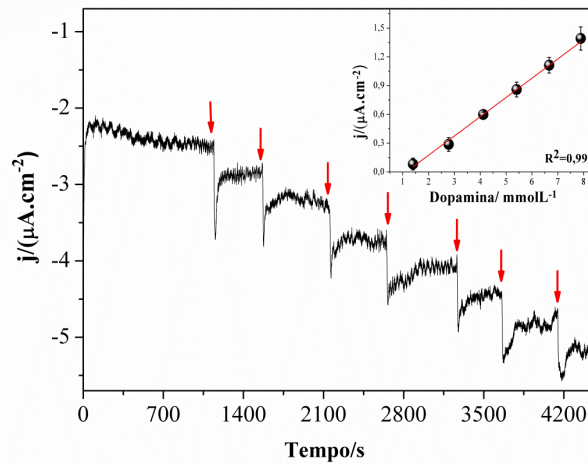


Figura 369: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:4 (m/m), as setas vermelhas indicam as adições de 100 μL de Dopamina ($0,1 \cdot 10^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$). Inset: Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.

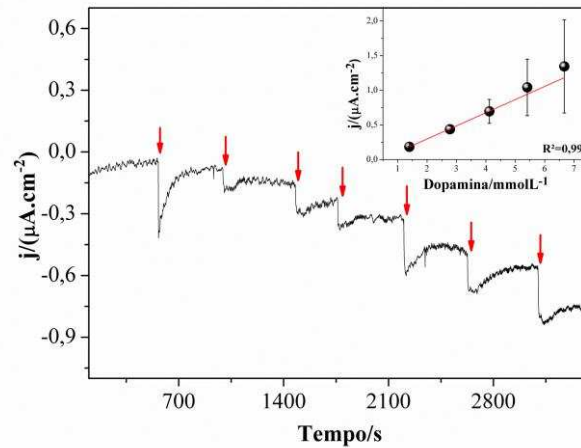


Figura 37: Resposta do biossensor (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:1 (m/m), as setas vermelhas indicam as adições de 100 μL de Dopamina ($0,1\cdot 10^{-1}\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Inset: Curva analítica mostrando a sensibilidade do filme automontado.

A variação de corrente no filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:4 (m/m) foi maior em comparação com os outros filmes, sendo de aproximadamente $0,41\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. O biossensor apresenta uma resposta linear durante a adição de DA, que tende a saturar quando uma adição acima de $10,2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ é feita. A sensibilidade encontrada foi $0,33\pm 0,02\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, limite de detecção de $0,86\pm 0,26\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, um K_m^{ap} de $6,59\pm 0,82\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação, R^2 , de 0,99.

O biossensor de (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:1 (m/m) apresentou uma variação de corrente de $0,09\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, houve uma redução de corrente menor do que para o biossensor de (PEI/MAO-B+POPG:DPPG)₇ na proporção de 1:4 (m/m), tendendo a saturação quando adições acima de $10,2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de dopamina é realizada.

A sensibilidade encontrada foi $0,31\pm 0,03\ \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, limite de detecção de $1,89\pm 0,82\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, um K_m^{ap} de $11,08\pm 3,04\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e um coeficiente de correlação, R^2 , de 0,99. Todos os valores de sensibilidade, K_m^{ap} e limite de detecção encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de sensibilidade, limite de detecção e KM^{ap} para os biossensores com e sem MAO-b incorporada em lipossomos com diferentes concentrações de fosfolipídios.

Filmes do Biossensor	Sensibilidade $\mu A.cm^{-2}.mmolL^{-1}$	Limite de Detecção $mmolL^{-1}$	Km^{ap} $mmolL^{-1}$
(PEI/MAO-B+DPPG) ₇	0,30±0,03	0,62±0,20	5,80±0,81
PEI/MAO-B+POPG) ₇	0,27±0,03	2,20±0,21	10,70±1,58
(PEI/MAO-B+POPG:DPPG) ₇ 1:4	0,33±0,02	0,86±0,26	6,59±0,82
PEI/MAO-B+POPG:DPPG) ₇ 1:1	0,31±0,03	1,89±0,45	11,08±3,04
(PEI+MAO-B) ₇	0,094±0,001	1,41±0,07	13,53±5,29

Pode-se observar que os valores de sensibilidade, limite de detecção e Km^{ap} são melhores para os filmes de (PEI/MAO-b+DPPG)₇ e (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇ na proporção 1:4 (m/m) e isso se deve ao fato das estruturas lipídicas do DPPG e da estrutura lipídica da mistura de POPG:DPPG 1:4 (m/m) preservarem a estrutura da enzima. As temperaturas de transição de fase da membrana do lipossomo ($T_m = -2^\circ C$ para o POPG e $T_m = 41^\circ C$ para o DPPG) permite que haja um equilíbrio entre as estruturas, possibilitando assim, uma melhor incorporação da MAO-b e uma melhor penetração do analito pelas estruturas lipídicas. O valor de Km^{ap} para o filme de (PEI+MAO-b)₇ é muito maior do que para os filmes com lipossomos, mostrando assim, a maior atividade da enzima com o substrato quando a mesma está incorporada em lipossomos. Esses valores comprovam que além de manter a atividade, os lipossomos ajudam a aumentar a atividade da MAO-b com o substrato. Não há na literatura trabalhos feitos de detecção da DA com a MAO-b, portanto, os parâmetros de comparação foram realizados através dos trabalhos já realizados no grupo, entre outros trabalhos que estão relacionados a detecção de DA [9, 10].

5.5 Estabilidade dos Biossensores de DA

Os testes de estabilidade dos biossensores foram realizados para todas as arquiteturas dos filmes automontados. A mistura de (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇, nas proporções de 1:4 (m/m) e 1:1 (m/m) apresentaram uma melhor estabilidade em comparação aos outros dois

biossensores de (PEI/MAO-b+DPPG)₇ e (PEI/MAO-b+POPG)₇. Os filmes foram guardados em um *ependorf* sem tampão e colocados na geladeira.

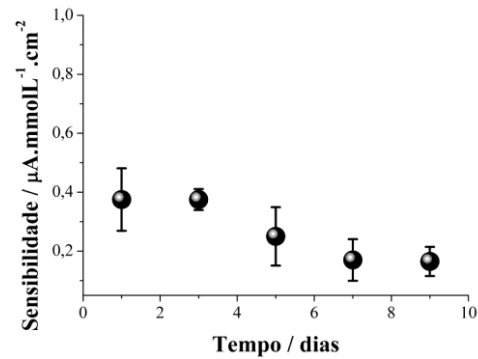


Figura 38: Estabilidade do biossensor do filme de (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇, na proporção de 1:4 (m/m).

A estabilidade dos filmes com a mistura de lipossomos foi de 10 dias, já os filmes somente com DPPG e POPG tiveram uma duração de estabilidade de 10 dias. A figura 39 apresenta a estabilidade do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇, na proporção de 1:4 (m/m). Inicialmente houve um decaimento da sensibilidade de 37,1%, logo o filme se manteve estável por 5 dias e decaiu novamente. Posteriormente, teve um decaimento de sensibilidade de 85,7% quando o filme para de responder por completo. A técnica LbL utilizada para a construção dos biossensores na detecção de DA com a MAO-b, não são encontrados na literatura. Alguns trabalhos sobre MAO-b são encontrados, porém outro tipo de técnica é utilizada para desenvolver o biossensor. Sendo assim, os resultados obtidos foram comparados com os trabalhos realizados pelo grupo e outros possíveis de comparação encontrados na literatura [9, 10].

5.6 Teste de Interferentes

Os efeitos de interferentes em respostas de biossensores devem ser investigados para avaliar sua seletividade. A resposta do biossensor para possíveis interferentes foi testada injetando-se alíquotas de 100 μL de tampão, e de soluções 0,1 mol.L⁻¹ de glicose, ácido úrico, ácido ascórbico. Como ilustrado na Figura 40, após alcançado a estabilização da corrente a primeira adição de dopamina indicou um decréscimo da corrente, como esperado. Com o acréscimo de ácido ascórbico foi observado um sinal de corrente para valores positivos, o que pode ser facilmente distinguível por ser um sinal inverso a dopamina. As injeções de ácido úrico e de tampão PBS não apresentaram nenhum sinal.

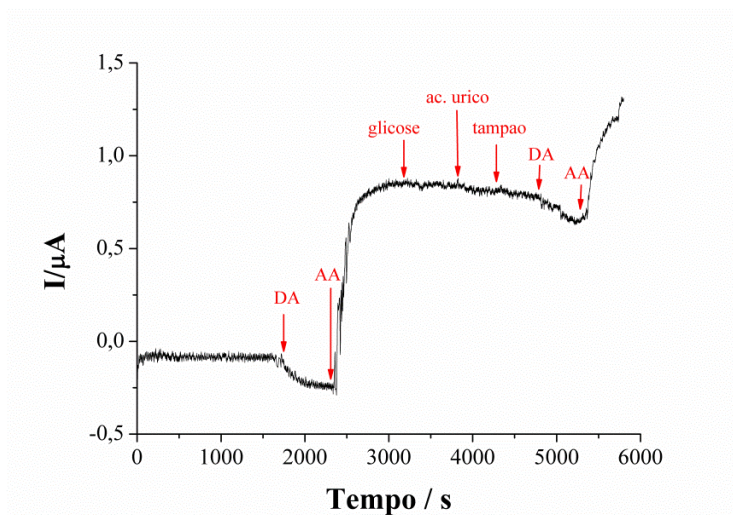


Figura 392: Reposta do filme [PEI/(MAO-b+1POPG:4DPPG)]₇ para possíveis interferentes em meio de tampão PBS a 0.0 V (vs SCE). Cada adição corresponde a 100 μL das substâncias DA (dopamina, analito), AA (ascorbic acid), glicose e ácido úrico.

6 CONCLUSÃO

A construção dos filmes automontados através da técnica LbL foi essencial para o desenvolvimento do biossensor para detecção de DA. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o PB é um ótimo mediador de elétrons, pois os valores de sensibilidade, limite de detecção e K_m^{ap} foram muito satisfatórios, para os filmes construídos com lipossomos.

Através das análises de CD comprova-se que a incorporação de enzimas é muito eficiente para preservar a estrutura conformacional da enzima, aumentando também o desempenho do biossensor. Através dos valores obtidos sem e com incorporação da enzima em lipossomos, nota-se um aumento de sensibilidade e de K_m^{ap} quando a MAO-b é encapsulada. Nas misturas de lipossomos utilizadas para fabricação dos filmes, uma melhor sensibilidade, um menor limite de detecção e um menor K_m^{ap} , foram obtidos para os biossensores dos filmes (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇, na proporção de 1:4 (m/m) e de (PEI/MAO-b+ DPPG)₇. O biossensor do filme (PEI/MAO-b+POPG:DPPG)₇, na proporção de 1:4 (m/m) também apresentou uma boa seletividade, sendo possível distinguir os interferentes utilizados do analito (DA).

Trabalhos futuros serão direcionados para a detecção de outros neurotransmissores como a tiranina e a serotoina.

7 REFERÊNCIAS

- [1] NAMBIAR, S.; YCOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 26, p. 1825-1832, 2011.
- [2] DHAND, C. et al. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 26, p. 2811-2821, 2011.
- [3] OLIVEIRA, R. F. et al. Exploiting cascade reactions in bi-enzyme layer-by-layer films. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, DC, v. 115, p. 19136-19140, 2011.
- [4] SOUZA, T. T. L.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensor. **Sensors and actuators. B, Chemical**, Lausanne, v. 178, p. 101-106, 2013.
- [5] GAO, Q. et al. Na amperometric glucose biosensor on layer-by-layer GOx-SWCNT conjugate/redox polymer multilayer on a screen-printed carbon electrode. **Sensors and actuators. B, Chemical**, Lausanne, v. 153, p. 219-225, 2011.
- [6] HE, Q. et al. Self-assembly of composite nanotubes and their applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v. 14, p. 115-125 2009.
- [7] ARIGA, K.; NAKANISHI, T.; MICHINOBU, T. Immobilization of biomaterials to nano-assembled films (self-assembled monolayers, Langmuir-Blodgett films, and layer-by-layer assemblies) and their related functions. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 6, n. 8, p. 2278-3001, 2006.
- [8] MORAES, M. L. **Filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores**. 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- [9] XAVIER, A. C. F.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in layer-by-layer films for transdermal drug delivery. **Materials Science & Engineering. C, Materials For Biological Applications**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 1193-1196, 2013.

- [10] GRAÇA, J. S. et al. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome encapsulated glucose oxidase. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 96, p. 37-42, 2014.
- [11] PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA JR, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
- [12] DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. **Science**, New York, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- [13] DESHMUKH, K. P. et al. Stimuli-sensitive layer-by-layer (LbL) self assembly systems: targeting and biosensory applications. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, p. 294-306, 2013.
- [14] TANG, Z. et al. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 18, n. 24, p. 3203-3224. 2006.
- [15] DELCEA, M.; MÖHWALD, H.; SKIRTACH, A. G. Stimuli-responsive LbL capsules and nanoshells for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, p. 730-747, 2011.
- [16] KUBOTA, L. T. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- [17] FARIA-TISHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochemistry and Biotechnology reports**, Londrina, p. 2316-5200, 2012
- [18] JESUS, C. G. **Filmes automontados do cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano e ftalocianina de cobre obtidos pela técnica LbL**: preparação, caracterização e aplicações. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009.
- [19] GARCIA, M. B. F. **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados**: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

- [20] VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [21] LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- [22] MORENO, L. C. G. A. I. A. **Delineamento e caracterização de lipossomas contendo nimodipina para o uso direcionado a doenças neurodegenerativas**. 2011. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.
- [23] SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1181-1185, 2022.
- [24] FRÉZARD, F. et al. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.
- [25] CRESPILO, F. N. **Membranas eletroativas nanoestruturadas**: estudo de transporte de carga e imobilização enzimática. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- [26] PARK, B.-W.; YOON, D.-Y.; KIM, D.-S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 26, p. 1-10, 2010.
- [27] HWANG, S. Y. et al. Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of enzymes. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 94, p. 296-303, 2012.
- [28] RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, p. 389-407, 2005.
- [29] MATTOS, I. L. et al. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.
- [30] MATTOS, I. L.; GORDON, L. Filmes de metal-hexacianoferrato: uma ferramenta em química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 200-205, 2001.
- [31] RICHTER, E. M. et al. Determinação de peróxido de hidrogênio em antisséptico bucal usando um microdispositivo contendo partículas de Azul da Prússia. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 987-991, 2011.

[32] MONTES, R. H. O. **Estudo e aplicação de eletrodo modificado com hexacianoferrato de óxido de rutênio para a detecção seletiva do sulfito**. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

[33] SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 123-128, 2002.

[34] MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

[35] SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da uréase em filmes de polipirrol**. 2011. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

[36] SANTOS, J. C. C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

[37] GERALDO, V. P. N. **Filmes nanoestruturados contendo lipossomos para a liberação controlada de ibuprofeno**. 2008. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

[38] HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2009.

[39] HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

[40] TOLEDO, R. A. **Estudo eletroquímico e desenvolvimento de novas metodologias eletroanalíticas para a determinação de antidepressivos tricíclicos e neurotransmissores**. 2006. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

[41] STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica de farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2009.

- [42] FOLLMER, C.; BEZERRA NETTO, H. J. C. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos da doença de Parkinson. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 306-313, 2013.
- [43] BINDA, C. et al. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 1, p. 22-26, 2002.
- [44] YOUDIM, M. B. H. Brain monoamine oxidase (MAO) B: A unique neurotoxin and neurotransmitter producing enzyme. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, Oxford, v. 13, p. 363-371, 1989.
- [45] FRITZE, J. et al. Isoelectric focusing of monoamine oxidase subtypes as identified by MAO inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 172, p. 147-154, 1989.
- [46] LACERDA JÚNIOR, E. G. **Simulação de docking da interação de inibidores competitivos com o sítio catalítico da monoamina oxidase b**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009.
- [47] ARAÚJO, A. N. et al. Amperometric biosensor based on monoamine oxidase (MAO) immobilized in sol-gel film for benzydamine determination in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 33, p. 983-990, 2009.
- [48] SCHMID, F.-X. Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry. **Encyclopedia of Life Sciences**, Weinheim, 2001.
- [49] ZUCOLOTTI, V. et al. Nanoscale processing of polyaniline and phthalocyanines for sensing applications. **Sensor and actuators. B, Chemical**, Lausanne, v. 113, p.809-815, 2006.
- [50] KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. The electrocatalytic activity of Prussian blue in hydrogen peroxide reduction studied using a wall-jet electrode with continuous flow. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 456, p. 97-104, 1998.
- [51] CARVALHO, N. M. F. et al. Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1607-1611, 2010.

[52] MOCCELINI, S. K. **Sensores modificados com monocamadas auto-organizadas de tióis para determinação de dopamina, tiodicarbo e catequina**. 2011. 130 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Física e Matemática, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

[53] ITO, A. J. Técnicas espectroscópicas em biofísica. **Caderno de Física da UEFS**, Feira de Santana, v. 3, p. 21-29, 2009.

[54] LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006.

[55] CAMPOS, P. P. et al. Amperometric detection of lactose using β -Galactosidase immobilized in Layer-by-Layer films. **ACS Applied Materials and Interfaces**, Washington, v. 6, n. 14, p. 11657-11664. 2014.

[56] WOODY, R. W.; SREERAMA, N. Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. **Methods in Enzymology**, New York, v. 383, p. 318-351, 2004.

[57] WOODY, R. W.; MANNING, M. C.; LLLANGASEKARE, M. Circular dichroism studies of distorted α -helices, twisted β -sheets, and β -turns. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 77-86, 1988.

[58] HOLLER, J.E. SKOOG, A.D. CROUCH, R.S. WEST, D.M. *Fundamentos de Química Analítica*. 6ª edição. São Paulo: Editora Bookman, 2009. 1055p.