

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

PAULA PEREIRA CAMPOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BIENZIMÁTICO
AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE β -LACTOSE ATRAVÉS DE FILMES
NANOESTRUTURADOS LAYER-BY-LAYER (LBL)**

Sorocaba
2014

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

PAULA PEREIRA CAMPOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BIENZIMÁTICO
AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE β -LACTOSE ATRAVÉS DE FILMES
NANOESTRUTURADOS LAYER-BY-LAYER (LBL)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais.

Orientação: Prof. Dr. (a) Marystela Ferreira

Co-orientação: Prof. Dr. (a) Marli Leite de Moraes

Sorocaba
2014

C198d Campos, Paula Pereira.
Desenvolvimento de um biossensor bienzimático amperométrico para detecção de β -lactose através de filmes nanoestruturados layer-by-layer (LbL). -- 2014.
68 f. : 28 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos,
Campus Sorocaba, Sorocaba, 2014

Orientador: Marystela Ferreira

Banca examinadora: Antonio Riul Junior, Luis Henrique

Dall'Antonia

Bibliografia

1. Materiais nanoestruturados. 2. Lactose. I. Título. II. Sorocaba-
Universidade Federal de São Carlos.

CDD 620.11

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAULA PEREIRA CAMPOS

**“DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR BIENZIMÁTICO
AMPEROMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE B-LACTOSE ATRAVÉS DE
FILMES NANOESTRUTURADOS LAYER-BY-LAYER (LBL)”;**

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, 28 de fevereiro de 2014.

Orientador(a)

Marystela Ferreira

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

Examinador(a)

Antonio Riul Júnior

Prof (a). Dr.(a) Antonio Riul Jr.
Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

Examinador(a)

Luiz Henrique Dall'Antonia

Prof (a). Dr.(a) Luiz Henrique Dall'Antonia
UEL – Universidade Estadual de Londrina



DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

A todos os professores que participaram da minha formação, especialmente à Marystela por acreditar, investir em mim e contribuir para minha formação acadêmica e pessoal. Também à professora Marli por todo suporte e auxílio.

Aos meus pais Paulo e Sueli por toda educação, amor, apoio e muitas coisas mais que me deram ao longo da vida e que não caberiam aqui. Aos meus irmãos Fernanda e Rodrigo que são os meus primeiros companheiros e fazem os meus dias mais alegres. Aos meus avós Silvio e Catarina por estarem sempre presentes.

A todos do laboratório de materiais, principalmente à Anerise, Celina, Juliana, Daniela, Clara, Tamyris, Rafael, Aline e Jaqueline por toda a ajuda que me deram durante o desenvolvimento do trabalho, pela companhia e por deixarem o ambiente sempre mais agradável e feliz.

A todos os meus amigos que me acompanham pela vida, Ana Paula, Layla, Felipe, Josualdo, Thiago, Camila Santos, Camila Bueno, Tiarli, Midian, Dener, Stefani e Jéssica. Ao meu passarinho Bonitinho por me animar com seu canto todos os dias.

Ao Diogo Volpati e Paulo Barbeitas Miranda do IFSC/USP pela colaboração.

Aos órgãos de fomento Capes, CNPq, Fapesp e RedeNBionet pelo apoio financeiro e a PPGCM pela oportunidade.

RESUMO

CAMPOS, Paula Pereira. *Desenvolvimento de um biossensor bienzimático amperométrico para detecção de β -lactose através de filmes nanoestruturados layer-by-layer (LbL)*. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2014.

Neste trabalho investigou-se a imobilização da enzima β -Galactosidase utilizando a técnica de automontagem de filmes nanoestruturados, denominada LbL (*Layer-by-Layer* do inglês) para o emprego em um biossensor amperométrico de lactose. Foram feitas medidas espectroscópicas por Ultravioleta e visível (UV-vis) e fluorescência, a fim de monitorar as bandas de absorção e emissão de cada bicamada depositada e confirmar a presença da enzima nos filmes. Fez-se também espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) e Geração de Soma de Frequências (SFG) para compreender a estrutura dos filmes, as interações presentes e a eficiência da técnica no processo de imobilização. Para a detecção de lactose realizou-se medidas amperométricas e dessa forma avaliou-se o desempenho do eletrodo modificado em relação à imobilização da enzima, a eficiência dos polieletrólitos Poli (alilaminahidroclorada) (PAH) e Poli (etileno imina) (PEI) e as condições de operação do biossensor tais como sensibilidade, limite de detecção, interferentes e estabilidade. A avaliação da deposição da enzima pelo UV-vis e fluorescência mostrou que o crescimento dos filmes foi satisfatório, apresentando as bandas características da β -Gal atribuídas aos resíduos de aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, entre outros, em $\lambda = 280$ nm por absorção e sendo os mesmo responsáveis pela emissão em $\lambda = 344$ nm sendo que a deposição de material foi crescente. Os espectros de FTIR e SFG indicaram bandas de grupamentos químicos característicos dos polímeros e da enzima e comprovaram que as interações, provavelmente secundárias, entre os elementos são fortes o suficiente para manter o filme no substrato durante as avaliações sensoriais. Na detecção de lactose foram feitos eletrodos de ITO/PB/(PEI/PVS)₁/(PEI/ β -Gal)_n e ITO/PB/(PAH/PVS)₁/(PAH/ β -Gal)_n ambos com dez e trinta bicamadas. A sensibilidade do filme ITO/PB/(PEI/PVS)₁/(PEI/ β -Gal)₁₀ foi 0,061 $\mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, enquanto o ITO/PB/(PAH/PVS)₁/(PAH/ β -Gal)₁₀ foi 0,079 $\mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$. A fim de aumentar a eficiência do biossensor eletrodos compostos por 30 bicamadas foram testados, dessa forma o filme ITO/PB/(PEI/PVS)₁/(PEI/ β -Gal)₃₀ alcançou uma sensibilidade superior aos eletrodos anteriores de 0,31 $\mu\text{A} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$, pois é possível que uma maior quantidade de enzimas tenha sido imobilizada. Entretanto o filme ITO/PB/(PAH/PVS)₁/(PAH/ β -Gal)₃₀ não obteve a mesma eficiência mesmo tendo o número de bicamadas aumentado, o que pode ser atribuído à estrutura do polieletrólito. Foram identificados dois interferentes, a glicose e o ácido ascórbico, mas ambos podem ser evitados, o primeiro com o uso de um biossensor para glicose acoplado ao da lactose e o segundo causa uma elevação na corrente, sendo naturalmente diferenciado. A estabilidade do biossensor foi de 12 dias, com medida em dias alternados. Todos os experimentos realizados convergem para provar que a técnica LbL foi adequada para a construção do biossensor e que a detecção da lactose pode ser feita em níveis de concentração próximos à de amostras reais, mas ainda é possível aprimorar o sistema com estudos mais aprofundados sobre a estrutura dos filmes e testar novas configurações de biossensores.

Palavras-chave: Biossensor. Lactose. B-Galactosidase. Técnica Layer-by-Layer.

ABSTRACT

CAMPOS, Paula Pereira. *Desenvolvimento de um biossensor bienzimático amperométrico para detecção de β -lactose através de filmes nanoestruturados layer-by-layer (LbL)*. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2014.

In this work the immobilization of enzyme β -Galactosidase has been investigated with use of assembly technique of nanostructured films denominated LbL (*Layer-by-Layer*) for employment in an amperometric biosensor of lactose. Therefore, spectroscopy measured has made for UV-vis (Ultraviolet-visible) and fluorescence, in order to monitor the bands of absorption and emission of each bilayer deposited and to confirm the presence of enzyme in the films. It has made too FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) and SFG (Sum Frequency Generation) for the purpose to understand the films structure, the interactions present and the efficiency of technique in the immobilization process. For the lactose detection amperometric measured have carried and that way the performance of modified electrode have evaluated in relation to enzyme immobilization, the polyelectrolytes performance Poly (allylamine hydrochloride) (PAH) and Poli (etileno imina) (PEI) and poly(ethyleneimine) and the operations conditions of biosensor which sensibility, limit of detection, interferences and stability. The evaluation of enzyme deposition by UV-vis and fluorescence showed that the films growth has been satisfactory presenting the characteristics bands of da β -Gal regarding to amino acid residues tryptophan, tyrosine and phenylalanine, among others, in $\lambda = 280$ nm for absorption and $\lambda = 344$ nm for emission and the deposition of material has been growing. The spectrum of FTIR and SFG indicated bands of chemical groups characteristics of polymers and enzyme and proved that the bonds, probably secondary of the elements are sufficiently strong for to keep the films in substrate during the sensory evaluation. In lactose detection it has made electrode of $(PEI/\beta\text{-Gal})_n$ e $(PAH/\beta\text{-Gal})_n$ both of ten and third bilayers. The sensibility of film $(PEI/\beta\text{-Gal})_{10}$ was $0.061 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{cm}^{-2}$, while the $(PAH/\beta\text{-Gal})_{10}$ was $0.079 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{cm}^{-2}$. In order to increase the efficiency of the biosensors, electrodes compounds for third bilayers were tested, this way the film $(PEI/\beta\text{-Gal})_{30}$ has achieved a sensibility higher than the previous electrodes of $0.31 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{cm}^{-2}$, is likely that a great amount of enzyme has been immobilized. However, the film ITO/PB/ $(PAH/\beta\text{-Gal})_{30}$ has not get the same efficiency despite de number of bilayer have been increase. Have been identified two interferences, the glucose and the ascorbic acid, but both can be avoided, the first with use of a biosensor for glucose coupled with lactose biosensor and the second causes an elevation on current, being naturally differentiated. The stability of the biosensor was twelve days, being measured in days alternate. All experiments performed to converge to prove that the LbL technique were adequate to assembly the biosensor and that lactose detection can be done and in levels nearby to real samples, but is possible to improve the system still with studies more expanders about the films structure and to test news biosensors configurations.

Keywords: Biosensor. Lactose. β -Galactosidase. Layer-by-Layer technique.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema de funcionamento geral dos biossensores.	22
FIGURA 2 – Biossensor comercial de glicose.	23
FIGURA 3 - Esquema de montagem de um filme pela técnica LbL proposto por DECHER, 1997.	25
FIGURA 4 – Voltametria cíclica do PB com os picos de redução e oxidação	26
FIGURA 5 – Reação da quebra da glicose pela GOx.	28
FIGURA 6 - Estrutura do Poli (etileno imina) (PEI) ramificado.	28
FIGURA 7 – Estrutura do polieletrólito Poli (alilaminahidroclorada) (PAH).	29
FIGURA 8 – Estrutura do Poli (vinil sulfonato de sódio) (PVS).	29
FIGURA 9 - Estrutura da β -lactose e os produtos da reação enzimática (glicose e galactose).	30
FIGURA 10 – Ilustração de como ocorre a excitação de um elétron por absorção de um fóton.	32
FIGURA 11 – Desenho mostrando como ocorre a absorção de luz quando um feixe passa por uma amostra.	33
FIGURA 12 - Esquema de níveis de energia para um sistema de absorção/emissão.	34
FIGURA 13 - Esquema de montagem do filme PEI/ β -Gal.	40
FIGURA 14 - Esquema de montagem do filme PAH/ β -Gal.	41
FIGURA 15 – Esquema idealizado dos feixes de IR e visível incidindo sobre o filme (PEI/PVS) ₂ /(PEI- β -Gal) ₁	44
FIGURA 16 - Esquema simplificado das reações esperadas para o biossensor amperométrico de lactose	44
FIGURA 17 – Esquema idealizado do biossensor. Na etapa 1 a β -Gal imobilizada no filme faz a quebra da lactose em glicose + produtos, na etapa 2 a glicose entra em contato com a GOx em solução gerando H ₂ O ₂ + produtos, na etapa 3 o H ₂ O ₂ se difunde até o PB e na etapa 4 o H ₂ O ₂ é reduzido à água pelo PB.	45
FIGURA 18 – Espectros de absorção (A) e emissão (B) da β -Gal em solução tampão acetato de sódio.	46
FIGURA 19 – Espectros de absorção do filme (PEI/ β -Gal) ₁₀ . O <i>inset</i> ilustra a absorbância monitorada em $\lambda = 280$ nm em função das bicamadas.	47
FIGURA 20 - Espectros de emissão do filme (PEI/ β -Gal) ₁₀ excitado em $\lambda = 280$ nm. O <i>inset</i> ilustra os valores de emissão para cada bicamada monitorada em $\lambda = 344$ nm.	48

FIGURA 21 - Espectros de absorção do filme (PAH/ β -Gal) ₁₀ . O <i>inset</i> ilustra a absorbância monitorada em $\lambda = 280$ nm em função do número de bicamadas.	48
FIGURA 22 - Espectros de emissão do filme (PAH/ β -Gal) ₁₀ excitado em 280 nm. O <i>inset</i> ilustra os valores de emissão para cada bicamada monitorada em 344 nm.....	49
FIGURA 23 – Espectros FTIR dos filmes (PEI/PVS), (PEI/PVS) ₂ /(PEI/ β -Gal) ₁ , e da β -Gal pura dispersa em matriz de KBr, com suas respectivas bandas características.	50
FIGURA 24 – Espectroscopia SFG para as amostras de PEI/PVS (a) imerso em tampão acetato de sódio (b) imerso em solução de lactose (c) (PEI/PVS) ₂ /(PEI/ β -Gal) ₁ imerso em tampão acetato de sódio (d) (PEI/PVS) ₂ /(PEI/ β -Gal) ₁ imerso em solução de lactose. As medidas foram realizadas numa configuração de polarização PPP, onde os filmes PEI/PVS eram compostos por três bicamadas cada. A Figura (c) apresenta uma curva ajustada (linha vermelha) com todos os picos centrados utilizados como parâmetros no processo de montagem.	52
FIGURA 25 - Voltamograma cíclico do ITO/PB varrendo de 0 a 1 V (vs ECS) – 50 mV. Exibiu os picos de redução e oxidação indicados pelas letras.....	54
FIGURA 26 – Teste amperométrico sem a presença da β -Gal, não houve queda na corrente.	54
FIGURA 27 - Teste amperométrico sem a presença da β -Gal, não houve queda na corrente.	55
FIGURA 28 – Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PEI/ β -Gal) ₁₀ . A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O <i>inset</i> ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose	56
FIGURA 29 - Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PAH/ β -Gal) ₁₀ . A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O <i>inset</i> ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose	56
FIGURA 30 - Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PEI/ β -Gal) ₃₀ . A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O <i>inset</i> ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose	57
FIGURA 31 – Curvas analíticas mostrando a variação de corrente dos biossensores ITO/PB/(PEI/ β -Gal) ₁₀ e ITO/PB/(PEI/ β -Gal) ₃₀ em função da concentração da lactose	57
FIGURA 32 – Teste de interferentes como sacarose, tampão, ácido úrico, ácido ascórbico e glicose.....	60
FIGURA 33 – Estabilidade do biossensor ITO/PB/(PEI/ β -Gal) ₃₀ estocado em tampão acetato de sódio por 12 dias por 4°C, medido em dias alternados.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = Absorbância

b = Caminho ótico da amostra

BG = Berlin Green

c = Concentração da amostra

CaF₂ = Fluoreto de Cálcio

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DNA = Ácido desoxirribonucleico

FAD = Flavina Adenina Dinucleotídeo

FTIR = Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia por transformada de Fourier)

GOx = Glicose Oxidase

H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio

IR = Infrared (Infravermelho)

IFSC = Instituto de Física de São Carlos

ITO = *indium tin oxide* (Óxido de estanho dopado com índio)

INV = Invertase

KBr = Brometo de potássio

LB = Langmuir Blodgett

LbL = Layer-by-Layer (automontagem)

nm = nanômetros

P = Potência radiante transmitida pela amostra

P₀ = Potência radiante incidente na amostra

PB = *Prussian Blue* (Azul da Prússia)

PAH = Poli (alilaminahidroclorada)

PEI = Poli (etileno imina)

PDDA = Poli (cloreto de dialidimentilamônio)

pH = potencial de Hidrogênio

pI = ponto isoelétrico

PIB = Produto Interno Bruto

PSS = Poli (estireno sulfonado de sódio)

PVS = Poli(vinil sulfonato de sódio)

PW = Prussian White (Branco da Prússia)

T = Transmitância

TTF = tetrathiafulvalene

SAM = Self-Assembled Monolayer (Monocamadas automontadas)

SFG = Sum-Frequency Generation (Geração de Soma de Frequências)

USP = Universidade de São Paulo

UV-vis = Ultravioleta-visível

β -Gal = β -Galactosidase

ϵ = Absortividade molar

λ = Comprimento de onda

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO	17
1.1. OBJETIVOS	18
CAPÍTULO 2	20
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1. BIOSSENSOR	20
2.1.1. Biossensor amperométrico	22
2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	23
2.3. FABRICAÇÃO DE FILMES LAYER-BY-LAYER	24
2.4. MEDIADORES ELETROQUÍMICOS	25
2.4.1. Azul da Prússia como mediador de elétrons.....	26
2.5. ENZIMAS.....	27
2.5.1. β -Galactosidase.....	27
2.5.2. Glicose Oxidase.....	27
2.6. POLIELETRÓLITOS	28
2.7. LACTOSE	29
2.8. ESPECTROSCOPIA	31
2.8.1. Espectroscopia por absorção	31
2.8.2. Espectroscopia por emissão.....	33
2.8.3. Espectroscopia no Infravermelho	34
2.8.4. Espectroscopia SFG (Sum-Frequency Generation).....	35
2.9. ELETROQUÍMICA.....	36
2.9.1. Amperometria.....	36
2.9.2. Voltametria Cíclica.....	37
CAPÍTULO 3	38
METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. MATERIAIS	38
3.1.1. Enzimas	38
3.1.2. Substratos	38
3.1.3. Soluções.....	39
3.2. MÉTODOS	39

3.2.1.	Filmes de β -gal	40
3.2.2.	Filmes de β -Gal e GOx.....	41
3.2.3.	Teste do branco.....	42
3.2.4.	Deposição do Azul da Prússia	42
3.2.5.	Teste de interferentes.....	42
3.2.6.	Teste de estabilidade.....	42
3.2.7.	Espectroscopia na região do Infravermelho	42
3.2.8.	Espectroscopia por Geração de Soma de Frequência (SFG).....	43
3.3.	MECANISMO DO BIOSENSOR ITO/PB/(PEI/PVS)/(PEI/ β -GAL) _N E ITO/PB/(PAH/PVS)/(PAH/ β -GAL) _N	44
CAPÍTULO 4		46
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		46
4.1.	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA	46
4.1.1.	β -Galactosidase em solução	46
4.1.2.	Filmes PEI/ β -Gal	47
4.1.3.	Filmes PAH/ β -Gal	48
4.1.4.	FTIR	49
4.1.5.	Espectroscopia por Geração de Soma de Frequência (SFG).....	51
4.2.	CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA	54
4.2.1.	Deposição do PB	54
4.2.2.	Teste do branco.....	54
4.2.3.	Filmes de β -gal	55
4.2.4.	Filmes de β -Gal e GOx.....	58
4.2.5.	Limite de detecção.....	59
4.2.6.	Teste de interferentes.....	59
CAPÍTULO 5		61
CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES		61

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Uma estimativa do consumo mundial de leite divulgou que cerca de 727 milhões de toneladas foram produzidos no ano de 2011, incluindo leite de búfala, cabra, ovelha e vaca, sendo que esta última foi responsável por aproximadamente 606,7 milhões de toneladas. Apenas no Brasil foi produzido aproximadamente 32 mil toneladas de leite. Os países que estiveram no ranking de produção de leite em 2011 foram Índia, Estados Unidos, Brasil, Rússia e China, isto indica que estes países além de se destacarem na produção de leite têm se destacado também em termos econômicos como propulsores da economia mundial pós-crise financeira. Tais países, além de serem grandes produtores, também são grandes consumidores de leite e derivados e com a melhora da economia, também há projeções de crescente expansão deste mercado (SIQUEIRA, B. K.; MERCÊS, E. S.; PINHO, C. P., 2013).

A lactose, o açúcar do leite, é muito utilizada como matéria prima para diversos alimentos como sorvetes, sobremesas, assados e até refrigerantes (WALSH, 2001), além de seu amplo uso na indústria farmacêutica em medicamentos, pois estabiliza as preparações e as deixa com um sabor mais agradável (STEFANI et al., 2009). Para detecção de certas bactérias, são produzidos meios de cultura que contenham lactose, sendo que apenas alguns tipos de bactérias degradam a lactose, o que torna mais fácil descobrir qual bactéria está sendo investigada.

Há pessoas que não conseguem fazer a digestão da lactose, conhecidas como intolerantes à lactose, as quais tem uma deficiência na produção da enzima β -Galactosidase (FAEDO et al., 2013). Visto que a lista de produtos que contém a substância é longa e que os métodos atualmente utilizados para detecção como cromatografia, polarimetria, gravimetria, entre outros (GORNISCHEFF; RINKEN, 2011), demandam tempo e instrumentação, seria importante desenvolver um método de detecção rápida, eficiente e com pouca instrumentação que poderia ser usado tanto por indivíduos intolerantes quanto na indústria de forma geral.

Os biossensores são uma boa alternativa para o sensoriamento de forma simples, rápida e reversível. Aqueles que são feitos a partir de filmes automontados de moléculas biológicas podem ser de grande utilidade no desenvolvimento de dispositivos, com as mais variadas aplicações em medicina e biotecnologia. Isso é possível pelo fato da atividade ser mantida após o elemento biológico ser imobilizado (DURAN; MATTOSO; MORAIS, 2006). Já existem biossensores comercializados, principalmente os de glicose, que permitem que diabéticos monitorem diariamente os níveis do açúcar no sangue. (G-TECH Free) (FreeStyle Lite® Blood Glucose Monitoring System).

Nesta dissertação foi desenvolvido um biossensor amperométrico a partir da enzima β -Galactosidase imobilizada com polieletrólitos Poli (alilaminahidroclorada) (PAH) e Poli (etileno imina) (PEI) em filmes automontados para detecção de lactose. Esta dissertação está estruturada da seguinte forma: a introdução, motivação e objetivos são apresentados no Capítulo 1, com uma breve revisão sobre nanotecnologia no biossensoriamento, biossensores específicos para detecção de lactose e outros métodos de detecção para o carboidrato e as vantagens da técnica LbL (*Layer-by-Layer* do inglês). No Capítulo 2 são apresentados os aspectos teóricos relevantes para o desenvolvimento do trabalho como a LbL, os materiais utilizados como as enzimas, os polieletrólitos e mediadores eletroquímicos, e os métodos de caracterização espectroscópicos e eletroquímicos. O Capítulo 3 aborda as descrições técnicas dos materiais e os métodos empregados. No Capítulo 4 são descritos os resultados e discussões das caracterizações de crescimento dos filmes e a detecção da lactose. As conclusões estão expostas no Capítulo 5, e por fim estão apresentadas as referências.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

O surgimento da nanotecnologia está abrindo novos caminhos para o biossensoriamento permitindo que se utilizem cada vez mais materiais diversificados e que os dispositivos sejam mais eficientes. As propriedades únicas dos materiais em escala nanométrica oferecem boas perspectivas para a fabricação de biossensores, pois é possível variar o tamanho, a composição e adaptar suas propriedades físico-químicas (WANG, 2005). A transdução do sinal e o desempenho geral dos sensores eletroquímicos são geralmente determinados pela arquitetura das moléculas sobre a superfície do eletrodo (GRIESHABER et al., 2008). Aliar a nanotecnologia ao sensoriamento de carboidratos pode significar um grande avanço nessas análises.

Um método tradicional usado para diferenciar açúcares é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usada para alimentos diversos como sucos, sorvetes, frutas, chocolates, etc. (DRUZIAN; DOKI; SCAMPARINI, 2005), e apesar de ser simples demanda equipamento específico, pessoal treinado para o manuseio e não é portátil, ou seja, é necessário que seja realizado em laboratório, diferente dos biossensores que podem ter seus elementos miniaturizados e qualquer indivíduo pode possuir seu próprio aparelho e fazer a análise em qualquer hora e local.

Existem alguns tipos de biossensores de lactose descritos na literatura: Sharma, S. K. et al, 2004 desenvolveram um biossensor amperométrico de lactose modificando um eletrodo de ITO pela técnica de *Langmuir Blodgett* (LB) com poli (3-hexiltiofeno), β -Gal e galactose oxidase que alcançou um limite de detecção de 29 mmol.L⁻¹ e teve estabilidade por cerca de 120 dias (SHARMA et al., 2004). Conzuelo, F. et al, 2010, modificaram eletrodos de ouro com ácido 3-mercaptopropionico pela técnica *Self Assembled Monolayer* (SAM), e imobilizou a β -Gal, a Glicose Oxidase (GOx), a peroxidase e o mediador de elétrons tetrathiafulvalene (TTF) com uma membrana de diálise e fez a detecção da lactose por amperometria. Seu limite de detecção foi 4,6 x 10⁻⁴ mmol.L⁻¹ e teve vida útil de 28 dias (CONZUELO et al., 2010). Lourenço, R. J. M., et al, 2003, imobilizou a β -Gal e a GOx em membrana de polietersulfonado e aplicou sobre um eletrodo de platina para detectar a lactose, também por amperometria. Seu limite de detecção foi 4,3 mmol.L⁻¹ e estabilidade por 20 dias (LOURENÇO; SERRALHEIRO; REBELO, 2003).

Tais técnicas apresentam algumas desvantagens, como no caso da LB que requer uma instrumentação relativamente cara, maior tempo de preparação, limitação de material, pois é necessário o uso de moléculas anfifílicas e instabilidade da biomolécula devido à fraca atração física no interior do filme (TANG et al., 2006).

No entanto, a fabricação de filmes multicamadas composto por materiais de cargas opostas se tornou um poderoso processo que permite a construção controlada de filmes ultrafinos na escala nanométrica. Com o LbL é possível ajustar a estrutura do filme para alcançar as propriedades desejadas como densidade, morfologia ou porosidade com a escolha dos materiais certos e as condições como pH e temperatura (SCHOELER et al., 2006). Além disso, vários substratos comuns como metais, silicone e vidro possuem carga líquida negativa permitindo o início do filme com a carga positiva, outra vantagem é a diversidade de materiais que pode ser empregado incluindo nanopartículas, dendrímeros, nanotubos, porfirinas, polissacarídeos, polipeptídios, etc. A universalidade da técnica catalisou o processo de desenvolvimento em aplicações biotecnológicas e atualmente muitos grupos de pesquisa vêm trabalhando com a técnica (TANG et al., 2006).

1.1. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo construir um biossensor bienzimático amperométrico, utilizando a técnica de automontagem LbL de fabricação de filmes ultrafinos, para detecção de lactose em amostras padrões e as principais etapas serão:

- Imobilizar a β -Gal. de acordo com suas propriedades físico-químicas para que sua atividade seja mantida.
- Testar dois polieletrólitos com diferentes estruturas, PEI e PAH e construir diversas arquiteturas de filmes a fim de verificar qual deles proporciona uma melhor sensibilidade ao biossensor.
- Testar a imobilização da GOx junto à β -Gal para verificar a eficiência do biossensor na detecção de lactose.
- Determinar as condições de operação do biossensor como sensibilidade, limite de detecção e estabilidade através da técnica amperométrica.
- Verificar quais são os possíveis interferentes presentes em amostras reais.
- Estudar a estrutura dos filmes poliméricos, como eles interagem com a enzima, comparar a estrutura da enzima antes e depois da construção dos filmes e avaliar a

eficiência da LbL na imobilização da β -Gal através das espectroscopias FTIR e SFG.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. BIOSENSOR

Sensores químicos são dispositivos que obtêm informações através de transformações químicas e as tornam em um sinal analítico mensurável, sendo que este pode ser elétrico, ótico, térmico ou piezoelétrico. Biossensores são sensores químicos que fazem o reconhecimento e as transformações químicas deste sistema utilizando mecanismos bioquímicos (THEVENOT et al., 1999). Certos elementos biológicos são capazes de detectar a presença de analitos específicos e gerar um sinal proporcional à sua concentração. O termo biossensor apareceu na literatura por volta de 1970, mas anterior a essa data já havia estudos sobre eles. Em 1992 Clark e Lyons demonstraram que a enzima Glicose Oxidase poderia ser acoplada a eletrodos de O_2 e detectar a glicose proporcionalmente (CLARK; LYONS, 1962). Em 1997, Rechnitz et al., imobilizaram bactérias vivas na superfície de um eletrodo seletivo para arginina e denominaram-no de sensor bio-seletivo (RECHNITZ et al., 1977) (D'ORAZIO, 2003). Desde então muitos biossensores estão sendo desenvolvidos e com técnicas diversificadas. Os biossensores são compostos por duas séries: a química (molecular), onde há o reconhecimento de um sistema (receptor) e a transdução físico-química. No geral o transdutor obtém um sinal não elétrico para um elétrico, de forma que o sinal passa pela microeletrônica é processado e um resultado é gerado. A classificação dos biossensores pode ser baseada no método de transdução e este é empregado de acordo com o elemento de reconhecimento (THEVENOT et al., 1999), que pode ser:

- Transdução eletroquímica – baseia-se no transporte e distribuição de íons e nas reações de elétron transferência que ocorre na solução entre os eletrodos (BANICA, 2012). Os tipos de transdutores eletroquímicos são classificados conforme o tipo de medidas que realizam como potenciométricos, condutimétricos, amperométricos e voltamétricos.
- Transdução óptica - utiliza radiações eletromagnéticas na faixa do ultravioleta, visível e infravermelho e se baseia na emissão ou absorção dos elementos do sensor (BANICA, 2012).
- Transdução térmica - se baseia na mudança de temperatura nos componentes do sistema.

- Transdução piezoelétrica – o exemplo mais comum é o que utiliza espécies imobilizadas sobre cristais piezoelétricos e conforme há adsorção ou desadsorção de moléculas em sua superfície, provenientes de interações entre os elementos da superfície e da amostra, ocorrem mudanças na frequência de vibração (SANTOS, 2008).

Os biossensores podem ser classificados também de acordo com o elemento biológico de reconhecimento:

- Enzimas – Os biossensores enzimáticos podem ser empregados de duas formas: pela sua capacidade em catalisar um substrato específico e gerar um sinal proporcional ou pela inibição enzimática causada por algum elemento específico, dessa forma a perda da atividade enzimática será proporcional ao elemento inibidor presente na amostra (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Para o primeiro caso o processo envolve três etapas: o componente alvo (substrato) se liga ao sítio ativo da enzima para formar o chamado de complexo enzima-substrato. Neste complexo há uma conversão química, com a possibilidade de participação de outros correagentes. Finalmente, os produtos são liberados e o sítio ativo da enzima retorna ao estado inicial. Esta sequência é repetida com todas as outras substâncias moleculares que estão presentes (BANICA, 2012). É comum a construção de sistemas mono ou multi-enzimáticos (os quais as reações ocorrem em cascatas) (THEVENOT et al., 1999).

- Ácidos nucleicos – Nos seres vivos, os ácidos nucleicos são responsáveis pela transferência de informação genética. Os biossensores nesse caso podem ser usados em várias aplicações, como por exemplo, para determinação de espécies carcinogênicas e de fármacos, além de poder analisar e determinar sequências de bases de DNA com o intuito de diagnosticar doenças (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999).
- Células – Os biossensores celulares podem ser construídos com microrganismos íntegros, como bactérias, fungos, leveduras e etc. ou organelas celulares/partículas como mitocôndrias e parede celular entre outros (THEVENOT et al., 1999). Com este tipo de biossensor é possível fazer estudos sobre o comportamento do analito dentro da célula, como o efeito estimulante ou inibidor ou a toxicidade do analito (causando a morte celular) (BANICA, 2012).

- Antígeno-anticorpo – os biossensores que monitoram as interações entre antígeno e anticorpo são chamados de imunossensores. Um deles pode ser imobilizado em superfície sólida de forma que quando o outro (analito) entre em contato a detecção ocorra. Os tipos de transdutores empregados nesses sistemas são variados como os eletroquímicos, óticos, térmicos e etc. (D’ORAZIO, 2003).

A FIG. 1 ilustra os componentes de um biossensor típico com as possíveis alternativas de construção: A) com os elementos biológicos que se ligam especificamente ao analito, B) com as respectivas amostras a serem analisadas, C) os transdutores que variam de acordo com o bioreceptor e D) o processamento dos dados obtidos através da eletrônica e o software de computador que converte os parâmetros físicos em resultados mensuráveis que são apresentados ao operador humano (GRIESHABER et al., 2008).

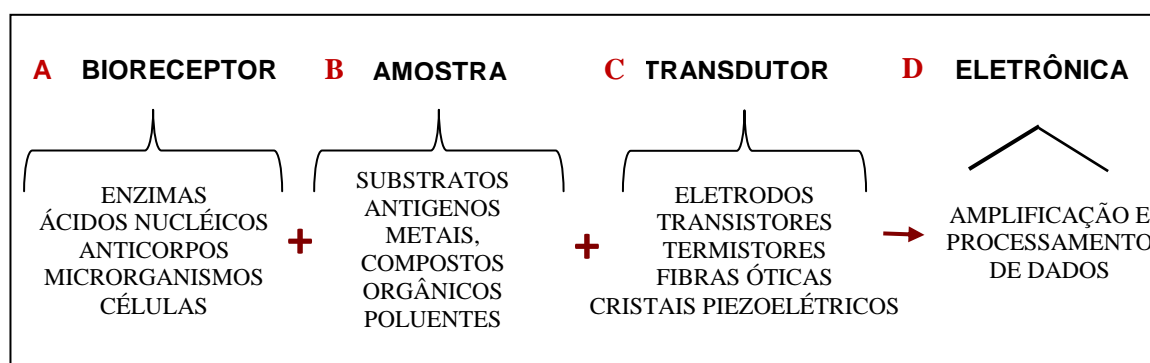


FIGURA 1 – Esquema de funcionamento geral dos biossensores, adaptado de (PUNDIR; NARANG, 2013) e (GRIESHABER et al., 2008).

2.1.1. Biossensor amperométrico

Os biossensores eletroquímicos são os mais estudados e bastante citados na literatura (HELLER, 1996), pois oferecem vantagens como agilidade, baixo custo e podem ser empregados de forma simples através de uma instrumentação compacta (WANG, 2005). Os amperométricos são os mais comercializados (D’ORAZIO, 2003). Um exemplo de biossensor de glicose comercial é o FreeStyle Lite Blood Glucose, ilustrado na FIG. 2, que monitora os níveis de glicose no sangue e permite que pacientes diabéticos façam o controle da doença regularmente.



FIGURA 2 – Biossensor comercial de glicose (“FreeStyle Lite® Blood Glucose Monitoring System”, [s.d.]).

Existe na literatura uma grande quantidade de trabalhos científicos voltados ao desenvolvimento dos biossensores. Um dos tipos pesquisados é o implantável, que facilitaria a vida dos usuários, por exemplo, no caso dos diabéticos que teriam a análise constante das taxas de açúcar no sangue e poderiam regular melhor sua alimentação. Outro exemplo são os dispositivos chamados *Lab-on-a-chip* que também podem utilizar elementos biológicos para o reconhecimento da amostra e tem a capacidade de fazer vários testes laboratoriais de forma rápida e fácil (THEVENOT et al., 1999). De forma geral os biossensores possuem vantagens e desvantagens e certamente há muito para se estudar e aperfeiçoar nestes dispositivos.

2.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Muitas aplicações de ordem biológica necessitam da imobilização de proteínas, como implantes biomédicos, sistemas de liberação controlada de fármacos, biossensores, etc., por isso há um grande número de estudos com o intuito de otimizar o processo e manter sua funcionalidade (STEEN REDEKER et al., 2013). A aplicação industrial das enzimas é frequentemente dificultada por sua falta de estabilidade a longo prazo, difícil recuperação e reutilização da mesma. Essas desvantagens podem ser superadas imobilizando-as, de forma que fiquem mais estáveis, produtivas e reutilizáveis acarretando em economia, visto que elas são caras (SHELDON, 2007).

A imobilização de enzimas em nanodispositivos, especialmente para biossensoriamento, deve permitir a reversibilidade eletroquímica, baixo sobrepotencial (medida do quanto o potencial do eletrodo de trabalho se afasta do potencial de equilíbrio), alta seletividade e manter suas propriedades físico-químicas (CRESPILO et al., 2006). Várias técnicas têm sido empregadas na fabricação de eletrodos, entre elas a LbL (DECHER, 1997), que permite um controle na arquitetura do filme e dos materiais que o compõem, e já

existem diversos biossensores com a imobilização enzimática através da técnica (FERREIRA et al., 2004), (SOUZA; MORAES; FERREIRA, 2013), (MORAES et al., 2010).

2.3. FABRICAÇÃO DE FILMES LAYER-BY-LAYER

A técnica de fabricação de filmes nanoestruturados automontados LbL tem sido largamente explorada pela sua simplicidade em não necessitar de muita instrumentação e ser de baixo custo. Ela permite a construção de superfícies funcionais, que podem originar dispositivos eletrônicos como diodos emissores de luz, transistores, dispositivos de memória, sensores químicos e biológicos, entre outros (DURAN, N. et al 2006).

Quando comparada a outras técnicas de imobilização como Langmuir-Blodgett (LB) e Self-Assembled Monolayers (SAMs) a LbL apresenta algumas vantagens, pois a SAMs só pode ser usada com certos substratos, pouco material fica adsorvido em sua monocamada e é criado em condições nem sempre fisiologicamente favoráveis a filmes biomoleculares, enquanto LB requer cara instrumentação, mais tempo e apenas componentes anfífilos podem ser imobilizados, porém filmes LB são mais estáveis (TANG et al., 2006). A LbL permite a utilização de qualquer tipo de material hidrofílico e que tenha carga, podem ser criados filmes com a quantidade de camadas desejadas e nas condições adequadas, é relativamente barato e a execução é muito simples.

A técnica de automontagem foi proposta inicialmente em 1980 por Sagiv como alternativa para a LB (NETZER; SAGIV, 1983). Alguns anos depois Decher reformulou a ideia propondo a LbL. No processo de construção dos filmes ocorre a adsorção espontânea, química ou física, de camadas ultrafinas, com espessura entre 10 a 100 Å aproximadamente (DECHER, 1997). A preparação dos filmes consiste no processo de alternar camadas de materiais de cargas opostas, formando bicamadas, através de forças eletrostáticas, ligações hidrogênio e forças de van der Waals. A FIG. 3 ilustra o processo de montagem de um filme LbL. O substrato é imerso em soluções conforme representam os números: 1 - solução policatiônica, o material de carga positiva adsorve sobre a superfície; 2 – solução de lavagem, o excesso de material é removido; 3 – aniônica, o material de carga negativa adsorve sobre o primeiro; 4 - lavagem novamente. Esse procedimento repetido várias vezes forma um filme multicamadas (DECHER, 1997).

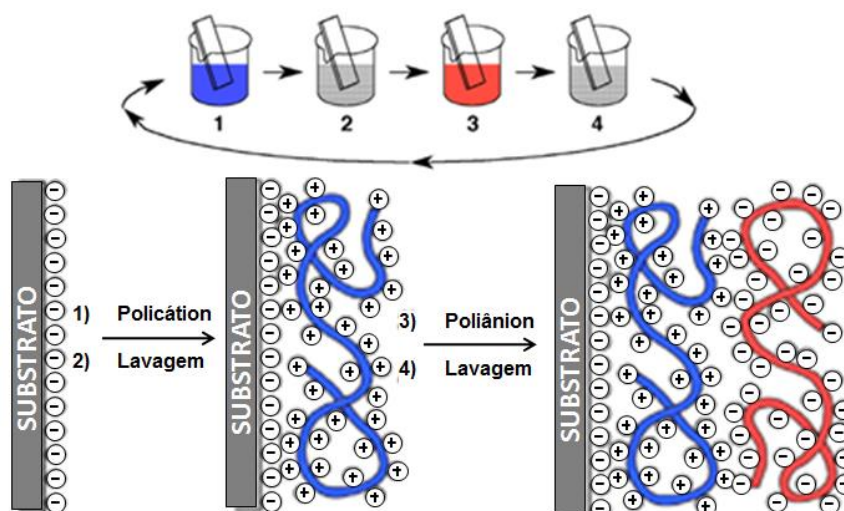


FIGURA 3 - Esquema de montagem de um filme pela técnica LbL proposto por DECHER, 1997.

A LbL tem chamado atenção para diversas vantagens em aplicações biomédicas, pois é possível imobilizar biomoléculas em filmes e trabalhar com as suas melhores condições fisiológicas (TANG et al., 2006).

2.4. MEDIADORES ELETROQUÍMICOS

Há um grande número de enzimas oxidativas que são utilizadas em biossensores, que agem no substrato e geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CLARK; LYONS, 1962) como produto secundário, entre outros, o que pode ser facilmente medido e será proporcional à quantidade inicial do analito. Para catalisar o H_2O_2 é necessário um alto potencial (0,7 V vs Ag/AgCl), o que causa também a catálise de diversas espécies eletroativas que se estiverem presentes no meio dará um falso resultado, como exemplo, em testes clínicos pode estar presentes no sangue como ácido ascórbico, ácido úrico, drogas terapêuticas como paracetamol e dopamina, entre outros (D'ORAZIO, 2003). Isso é evitado usando mediadores eletroquímicos inorgânicos, que fazem o processo com potenciais menores e eliminam alguns tipos de interferentes. O Azul da Prússia (PB, do inglês "Prussian Blue") é um desses compostos já utilizados em diversos estudos apresentando bons resultados (KARYAKIN et al., 2004) (FERREIRA et al., 2004).

2.4.1. Azul da Prússia como mediador de elétrons

A estrutura zeolítica da célula unitária do PB permite que moléculas de baixo peso molecular como O_2 e H_2O_2 penetrem sobre seus poros tornando-o um catalisador tridimensional. A difusão ocorre pelas vacâncias da célula, e a redução do H_2O_2 acontece entre íons de ferro, pela transferência de elétrons (RICCI; PALLESCHI, 2005) (ITAYA; ATAKA; TOSHIMA, 1982). Dessa forma, seus pequenos poros funcionam como um filtro impedindo a passagem de grandes moléculas e diminuindo a quantidade de possíveis interferentes. Assim, o PB é conhecido como uma peroxidase artificial, com a vantagem do baixo custo, alta estabilidade a diferentes condições e facilidade na modificação da superfície do eletrodo (RICCI; PALLESCHI, 2005).

Diferentes biossensores já foram desenvolvidos com o PB, com enzimas como lactato oxidase, colesterol oxidase, etanol oxidase, glutamato oxidase, glicose oxidase, lisina oxidase, dentre muitos outros, além dos sistemas bi e tri enzimático, onde a última etapa do processo depende de alguma enzima oxidase (RICCI; PALLESCHI, 2005). A FIG. 4 ilustra uma voltametria cíclica do PB que foi quimicamente sintetizado em eletrodo de pasta de carbono, o teste foi feito com tampão fosfato e solução de KCl, em pH 6 e apresenta seus respectivos picos de redução e oxidação (RICCI et al., 2003):

PW \longleftrightarrow PB – (PW do inglês *Prussian White* ou Branco da Prússia)

PB \longleftrightarrow BG – (BG do inglês *Berlin Green* ou Verde Berlim)

PB \longleftrightarrow PW

BG \longleftrightarrow PB

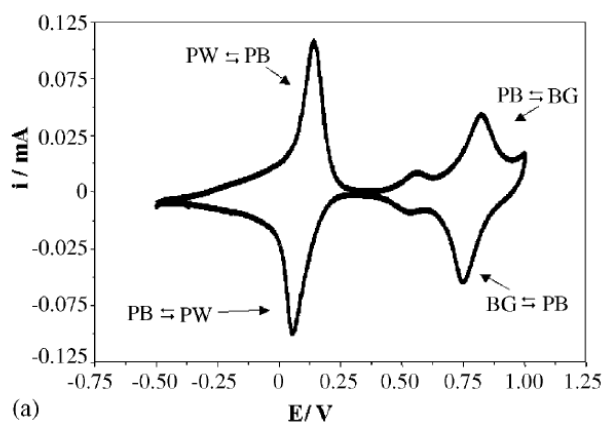


FIGURA 4 – Voltametria cíclica do PB com os picos de redução e oxidação (RICCI et al., 2003).

2.5. ENZIMAS

2.5.1. β -Galactosidase

A β -Galactosidase (β -Gal) pode ser chamada de β -D-galactosidase, β -D-galactoside galactohidrolase, ou ainda lactase (E.C. 3.2.1.23). É uma enzima hidrolítica, ou seja, quebra ligações e adiciona a elas H^+ e OH^- e que catalisa o resíduo terminal β -Galactopiranosil da β -lactose ($Gal\beta 1 - 4Glc$) em glicose e galactose (FISCHER et al., 2013). O sitio ativo da enzima possui um grupo sulfidrilo como uma base e um grupo imidazol como um nucleófilo que agem na divisão glicosídica (MAHONEY, 1998). A enzima tem uma afinidade semelhante para a lactose e para a galactose, pois ambos são capazes de ocupar o sitio ativo da enzima, com a mesma probabilidade, sendo então a galactose um possível inibidor enzimático (JURADO et al., 2002) (PAPAYANNAKOS; MARKAS; KEKOS, 1993). É uma enzima tetramérica que contém 35% de α -hélice, 40% de folha- β , 12% em espirais aleatórias e 13 % de turns (voltas múltiplas) (HUBER; GUPTA; KHARE, 1994).

A β -Gal é usada pela indústria para várias aplicações, como na produção de alimentos lácteos, quando a lactose não é desejada no produto final, ou para evitar a sua cristalização através da hidrólise em doce de leite, leite condensado, sorvetes, iogurtes, etc. Pode também ser empregada como droga para crianças com intolerância genética à lactose (HUSAIN et al., 2011). A intolerância à lactose é causada quando um indivíduo consome e não consegue digerir a lactose devido a uma deficiência em produzir β -Gal (HOUTS, 1988), o que causa desconforto abdominal e diarreia (MANAN; ABD KARIM; KIT, 1999).

2.5.2. Glicose Oxidase

A Glicose Oxidase (GOx), também chamada de β -D-Glicose: 1 oxido-redutase catalisa a oxidação da β -D-Glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, utilizando oxigênio molecular como aceitador de elétron. É uma glicoproteína dimérica, constituída por duas idênticas subunidades de cadeias polipeptídicas que são unidas covalentemente por ligações dissulfeto (BANKAR et al., 2009).

Esta reação pode ser dividida em redutiva e oxidativa. Na reação redutiva, a GOx catalisa a oxidação da β -D-Glicose para D-glucono- δ -lactona, a qual é hidrolisada para ácido glucônico espontaneamente. O cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) da enzima é

reduzido para FADH_2 , permitindo assim a oxidação do substrato. Na reação por meio oxidativo a enzima é reoxidada para a sua forma ativa, através da transferência de elétrons para o oxigênio molecular e como resultado produz peróxido de hidrogênio (BANKAR et al., 2009). O processo da quebra da glicose pela enzima pode ser observado pelo esquema apresentado na FIG. 5.

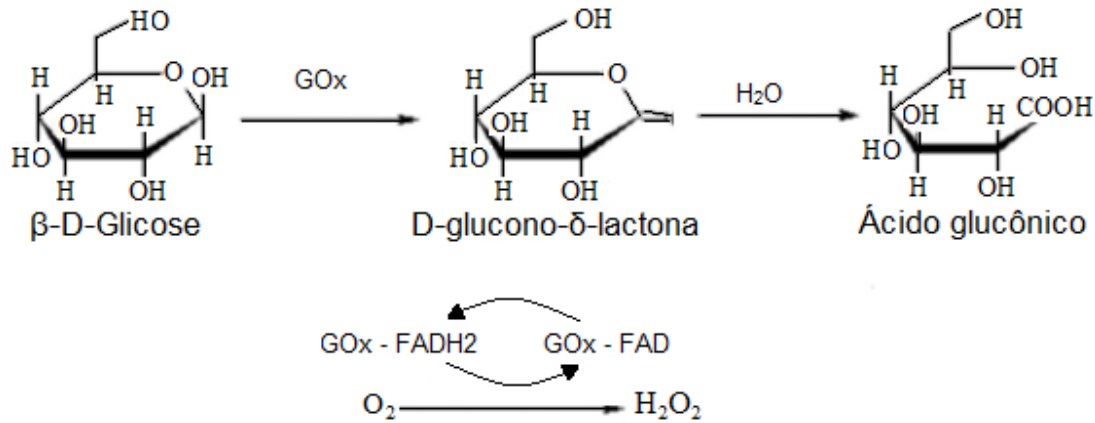


FIGURA 5 – Reação da quebra da glicose pela GOx. Adaptado de Bankar et al. 2009.

2.6. POLIELETRÓLITOS

Um polieletrólito é um polímero que contém sais de grupos iônicos e não metálicos, que quando em solução ficam parcialmente ionizados. Possuem diversas densidades de cargas que variam conforme a porcentagem de monômeros ionizados na cadeia polimérica inteira (HEURISON DE SOUZA SILVA, 2010). São comumente empregados na construção de biossensores, pois permitem a imobilização de diferentes elementos biológicos.

O polieletrólito Poli (etileno imina) (PEI) existe na forma linear e ramificada e é altamente catiônico devido a sua densidade de carga (NEU; FISCHER; KISSEL, 2005). O PEI ramificado, como segue ilustrado na FIG. 6, é composto por aminas primárias, secundárias e terciárias, e sob condições neutras aproximadamente 20% dos átomos de nitrogênio estão protonados (MAITANI et al., 2013).

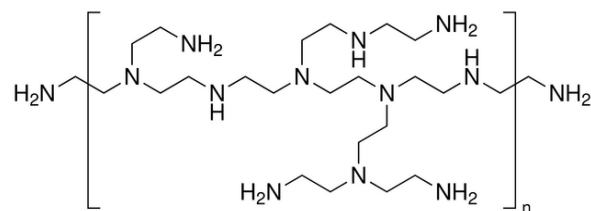


FIGURA 6 - Estrutura do Poli (etileno imina) (PEI) ramificado.

Polímeros solúveis em água são usados em várias aplicações tecnológicas, uma delas é o auxílio à estabilização de proteínas. No caso das enzimas, dependendo do polímero e da forma como é usado ele pode interagir com ela de modo que ao invés de estabilizá-la ele a deixe inativa (ANDERSSON; HATTI-KAUL, 1999). O PEI é um dos polímeros que segundo Teramoto et al., 1992 tem um efeito positivo na estabilidade e atividade enzimática, isso porque quando o polieletrólito com carga positiva se liga à enzima com carga negativa em múltiplos pontos a enzima fica mais rígida e estável contra desdobramentos (TERAMOTO et al., 1992).

O Poli (alilaminahidroclorada) (PAH) é um polieletrólito composto por unidades monoméricas de etileno com grupos laterais amina e fica carregado positivamente quando dissolvido em água. É considerado um polieletrólito fraco e sua densidade de carga varia de acordo com o pH onde se encontra. Em soluções com pH baixo apresenta uma densidade de carga maior do que quando em soluções com alto pH. Possui um comprimento médio de cadeia de aproximadamente 150 nm (WITT, M. A., 2012) (HEURISON DE SOUZA SILVA, 2010) (CHOI; RUBNER, 2005), sua estrutura está ilustrada na FIG. 7.

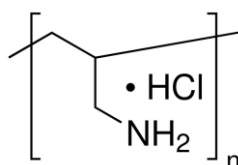


FIGURA 7 – Estrutura do polieletrólito Poli (alilaminahidroclorada) (PAH).

O poliânion utilizado na fabricação dos filmes foi o Poli (vinil sulfonato de sódio) (PVS). Sua estrutura pode ser visualizada na FIG. 8.

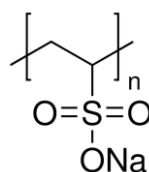


FIGURA 8 – Estrutura do Poli (vinil sulfonato de sódio) (PVS).

2.7. LACTOSE

A lactose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) é um dissacarídeo constituído por uma molécula de D-glicose ligada a uma molécula de D-galactose. Ela está presente no leite de mamíferos com poucas exceções, sendo que no leite bovino sua concentração varia entre 4,4 a 5,2%, e no humano é de aproximadamente 7% (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

Em solução aquosa a lactose existe na forma α e β e sempre aproximadamente 37,3% de α e 62,7% de β (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008). A FIG. 9 ilustra a estrutura da β -lactose e os produtos da reação depois da ação da enzima β -Gal, que são a glicose e a galactose.

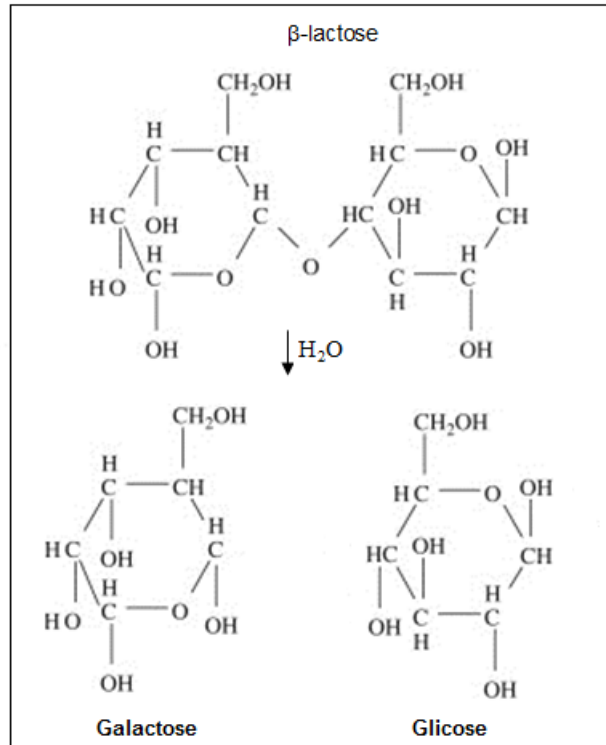


FIGURA 9 - Estrutura da β -lactose e os produtos da reação enzimática (glicose e galactose). Adaptado de (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

A partir de 1960 houve um crescente avanço no uso da lactose como matéria prima/insumos nas indústrias alimentícia, farmacêutica e química. Inúmeros produtos são obtidos através da manipulação da lactose, como seguem os exemplos ilustrados na Tabela 1.

TABELA 1 - Produtos originados a partir da lactose.

Produto	Propriedade	Aplicação
<i>Ácido lactobiônico</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Emulsionante, estabilizante de espuma e solúvel em água. 	<ul style="list-style-type: none"> • Detergente e sabão • Flúido conservante para órgãos transplantados
<i>Lactitol</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Estabilidade, solubilidade, higroscopicidade e gosto adocicado. 	<ul style="list-style-type: none"> • Alimentos em geral • Laxante osmótico
<i>Lactulose</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Dissacarídeo sintético 	<ul style="list-style-type: none"> • Tratamento de constipação

		crônica, encefalopatia hepática, carcinogênese do colón e acidente cerebral vascular isquêmico.
		• Aditivo alimentar
<i>Lactossacarose</i>	• Adoçante com baixo teor calórico	• Alimentos em geral
<i>Ácido láctico</i>	• Acidulante, regulador de acidez, umectante e antioxidante • Hidratante e regulador de pH em cosméticos	• Produção de cerveja e sucos • Como conservante de legumes. • Como descontaminante de carnes • Regulador e clareador de pele em cosméticos.

Fonte: (BOZA; GOMES; BLUMER, 2013).

Na indústria farmacêutica, a lactose é usada com agente espessante em remédios de humanos e animais (MIAO; ROOS, 2005), na microbiológica é adicionado a meios de cultura para diferenciação das bactérias que fermentam ou não a lactose (GÄNZLE; HAASE; JELEN, 2008).

2.8. ESPECTROSCOPIA

2.8.1. Espectroscopia por absorção

Quando uma molécula absorve um fóton, ela será promovida a um estado de maior energia, ou seja, seus elétrons saem do estado fundamental e vão para o estado excitado. A radiação ultravioleta e a visível são responsáveis por essa transferência de elétrons nos materiais que absorvem nas respectivas regiões (HARRIS, D. C., 2008). Na FIG. 10, consideramos um átomo isolado que recebeu um fóton de determinado comprimento de onda, um elétron na camada energética E_2 absorve a radiação e passa para um estado de energia superior E_4 . O elétron permanecerá por um período e depois decairá para seu estado fundamental novamente, com uma remissão de radiação eletromagnética, de forma que são possíveis diversas trajetórias (CALLISTER, 2006).

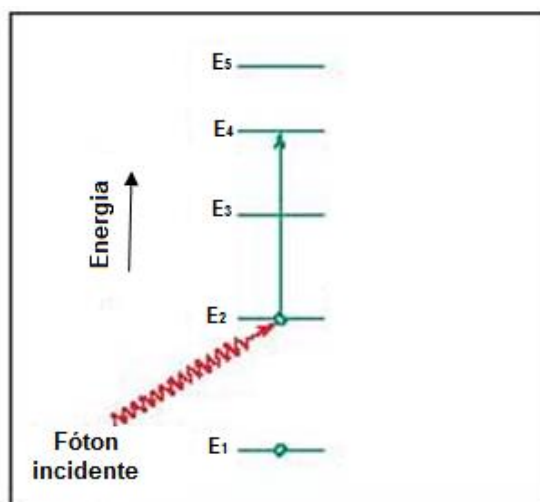


FIGURA 10 – Ilustração de como ocorre a excitação de um elétron por absorção de um fóton adaptado de (CALLISTER, 2006).

A espectroscopia UV-vis é amplamente utilizada para a determinação quantitativa de um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas. Ela consiste no estudo da interação entre a radiação e a matéria. Os equipamentos comuns trabalham na faixa de 200 a 750 nm (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009) (HARRIS, D. C., 2008).

A espectroscopia de absorção molecular é baseada na medida de transmitância (T) ou da absorbância (A) de soluções contidas em células transparentes com o caminho óptico de alguns centímetros. A transmitância é definida como a fração de luz original que passa pela amostra e é inversamente proporcional à absorção. A equação da Lei de Beer relaciona a concentração de um analito com a absorbância/transmitância (HARRIS, D. C., 2008):

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

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

Onde:

A = Absorbância

T = Transmitância

P_0 = Potência radiante incidente na amostra

P = Potência radiante transmitida pela amostra

Um feixe paralelo de radiação monocromática com potência P_0 incide no bloco perpendicular à superfície. Após percorrer uma espessura b do material que contém n átomos, íons ou moléculas absorventes, sua potência decresce para P como resultado de absorção, FIG. 11.

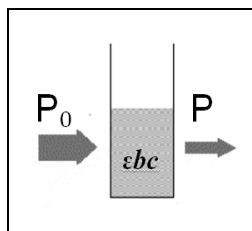


FIGURA 11 – Desenho mostrando como ocorre a absorção de luz quando um feixe passa por uma amostra. Adaptado de (MENDHAM, J; BARNES, J. D.; DENNEY, R. C., 2002).

A absorvância está relacionada na equação 3 e é uma grandeza adimensional. A concentração da amostra c é geralmente expressa em número de moles por litro, b é o caminho ótico e a grandeza ϵ é conhecida como absorvância molar, a qual é característica de cada substância e indica qual a quantidade de luz que é absorvida em um determinado comprimento de onda.

$$A = \epsilon bc \quad (3)$$

Onde:

ϵ = absorvância molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

b = caminho ótico (cm)

c = concentração ($mol \cdot L^{-1}$)

2.8.2. Espectroscopia por emissão

A luminescência é a emissão de luz a partir do retorno de um elétron a um estado de menor energia depois de ter sido excitado. A fluorescência é um tipo de luminescência onde ocorre a emissão de um fóton durante uma transição entre estados com o mesmo número quântico de spin, ou seja, a transição é direta entre os níveis de energia e geralmente não passa por outros estados intermediários, enquanto na fosforescência há uma mudança no spin eletrônico antes da remissão do fóton (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009). Isso causa uma diferença no tempo de emissão do fóton, no

primeiro caso a emissão ocorre em um tempo muito curto entre 10^{-8} a 10^{-4} segundos, enquanto no segundo é mais longo levando de 10^{-4} a 10^2 segundos (HARRIS, D. C., 2008).

A fluorescência pode ocorrer sem a mudança de frequência, que é conhecida como radiação ressonante ou fluorescência de ressonância, porém, o mais comum é ocorrer um deslocamento do comprimento de onda em relação à absorbância, como ilustrado no esquema da FIG. 12 quando uma molécula absorve um fóton e deixa o estado S_0 . As moléculas excitadas que estão no estado S_2 perdem qualquer excesso em forma de energia vibracional, caem para o menor estado S_1 , e depois decaem para o estado fundamental S_0 , emitindo um fóton com uma energia menor em relação ao que foi excitado, e maior comprimento de onda (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

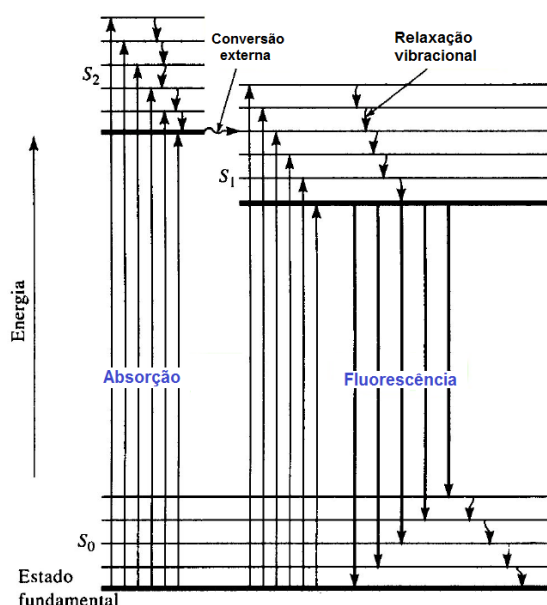


FIGURA 12 - Esquema de níveis de energia para um sistema de absorção/emissão. Adaptado de (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

2.8.3. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção, emissão e reflexão no infravermelho de moléculas podem ser observados pelas numerosas variações de energia que são produzidas por transições de moléculas de um estado de energia vibracional ou rotacional para outro. A energia do Infravermelho (IR do inglês *Infrared*) não é suficiente para produzir transições eletrônicas como ocorre no UV-vis. Para absorver a energia na faixa no IR é necessário que ocorra uma variação no momento dipolo na molécula (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

Para ocorrer transições rotacionais é requerida uma energia pequena, enquanto as transições rotacionais-vibracionais correspondem à região do IR médio. Para os gases geralmente o espectro IR é composto por linhas muito próximas, pois existem vários níveis de energia rotacionais para cada nível vibracional, enquanto que para os líquidos e sólidos as rotações são reduzidas, as linhas desaparecem e aparecem bandas vibracionais mais alargadas. As vibrações podem ser classificadas em estiramento ou deformação, e em vibrações por estiramento ocorre uma variação na distância interatômica ao longo do eixo de ligação dos dois átomos, enquanto nas vibrações por deformação há uma variação no ângulo entre duas ligações. (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

O espectro IR já é bem conhecido para biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e etc. Muitos estudos iniciaram por volta da década de 70, quando a transformada de Fourier começou a ser usada. Para proteínas, a técnica é bastante útil, pois detecta suas alterações conformacionais após serem imobilizadas ou processadas por outros métodos e dá informações sobre seus grupos químicos (KUMAR, 2014) (TAMM; TATULIAN, 1997).

2.8.4. Espectroscopia SFG (Sum-Frequency Generation)

A Espectroscopia por Geração de Soma de Frequências (SFG) é uma técnica óptica não linear específica para analisar interfaces cujas propriedades de simetria não se anulam. O sinal é obtido de interfaces em que a simetria de inversão é descontínua, comum em processos de óptica não-linear de segunda ordem. A montagem experimental é constituída por dois feixes de laser, um na faixa do visível ω_{vis} e outro na região de infravermelho ω_{IR} , ambos sobrepostos espacialmente e temporalmente, dando origem a um sinal da soma das frequências emitidas $\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{vis}} + \omega_{\text{IR}}$. Quando a frequência do feixe IR corresponde a uma vibração normal da molécula, a intensidade do sinal de SFG aumenta bruscamente (MIRANDA, P. B. et al., 1998). Portanto, nesta interface as moléculas devem ter uma orientação líquida média para obter um sinal mensurável. Conforme as variações espectrais na faixa do IR são obtidas, os picos ou bandas são atribuídos às ressonâncias de modos vibracionais de certas moléculas, pois diferentes grupos químicos possuem “assinaturas vibracionais” e assim podem ser caracterizados (MAIA, F. C. B, 2011).

Os métodos espectroscópicos não lineares, que são muito diferentes dos métodos lineares: não há interferência da contribuição de ressonância com o segundo plano não ressonante. O sinal do SFG pode ser obtido nas combinações de polarização ssp, sps e ppp,

sendo que o “s” indica que a luz está polarizada perpendicularmente, e “p” paralelamente ao plano de incidência. Assim cada letra representa a polarização da luz SFG, do visível e do infravermelho, respectivos à ordem em que aparecem (AMIM et al., 2010). Mais detalhes sobre a técnica: (LAMBERT; DAVIES; NEIVANDT, 2005), (SHEN, Y. R., 1994).

2.9. ELETROQUÍMICA

Em uma reação redox há a transferência de elétrons entre espécies. Quando uma espécie é oxidada significa que ela perde elétrons, quando ganha diz-se que ela é reduzida. À medida que os elétrons de uma reação redox fluem através de um circuito elétrico é possível fazer medições elétricas que podem ser úteis, por exemplo, para identificar espécies químicas que reagem (HARRIS, D. C., 2008). A eletroquímica oferece vantagens, pois geralmente o processo é específico para um estado particular de oxidação, é relativamente barato e oferece informações sobre a atividade de uma espécie química em vez de sua concentração (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

Na cela eletroquímica convencional usa-se um eletrodo de referência, um auxiliar e um de trabalho. O eletrodo de referência tem seu potencial conhecido com exatidão e é independente da concentração do analito ou de outros íons presentes na solução. Os eletrodos de calomelano são bastante usados como eletrodo de referência e consistem em mercúrio metálico em contato com uma solução de cloreto de mercúrio (calomelano) e solução de KCl saturada. Os eletrodos do tipo auxiliar são construídos com metais inertes como platina, ouro e paládio (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009). Os de trabalho são geralmente modificados através da adsorção irreversível de certas substâncias que possuem grupos funcionais desejados, ligações covalentes de espécies químicas na superfície do eletrodo e cobertura do eletrodo com filmes de diversas substâncias (WALSH, 2001) Neste trabalho empregou-se o eletrodo de calomelano como referência, o de platina como auxiliar e o ITO/PB/(PEI/PVS)₁(PEI/β-Gal)_n e ITO/PB/(PAH/PVS)₁(PAH/β-Gal)_n como de trabalho.

2.9.1. Amperometria

A amperometria é baseada na medida da corrente que varia conforme espécies eletroativas são oxidadas ou reduzidas, em função do tempo. É normalmente feita mantendo um potencial constante no eletrodo de trabalho e comparando-o a um eletrodo de referência,

enquanto o eletrodo auxiliar fecha o circuito elétrico. A diferença de corrente é proporcional à concentração de espécies eletroativas (GRIESHABER et al., 2008) (HARRIS, D. C., 2008)

2.9.2. Voltametria Cíclica

A voltametria pode ser definida como um conjunto de técnicas em que se observa uma relação entre o potencial e a corrente, durante um processo eletroquímico. Na voltametria cíclica aplica-se um potencial linear entre os eletrodos de trabalho e referência entre os tempos t_0 e t_1 (geralmente com duração de alguns segundos), a rampa é então invertida para trazer o potencial, no tempo t_2 ao seu valor inicial, de forma que as espécies eletroativas presentes na solução ou na superfície do eletrodo são oxidadas e reduzidas. O gráfico que representa a técnica é chamado voltamograma (HARRIS, D. C., 2008) (F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH, 2009).

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Enzimas

A β -Gal (E.C. 3.2.1.23), originária do fungo *Aspergillus Oryzae* possui massa molecular de 90 KDa, ótima atividade em pH próximo de 4,5 e 5 e ponto isoelétrico (pI) 4,6 (WALSH, 2001) (MOHY ELDIN et al., 2012). A GOx (E.C. 1.1.3.4) originária do fungo *Aspergillus Niger*, possui massa molecular 152 KDa, faixa de pH ótimo entre 3,5 e 6,5 (BANKAR et al., 2009) e pI 4,2 (ZOU et al., 2008). Ambas foram adquiridas comercialmente da Sigma-Aldrich®.

3.1.2. Substratos

Para as medidas espectroscópicas UV-vis e fluorescência foram utilizados substratos de quartzo hidrofílicos. Segundo Moraes, M. L., 2008 o processo de hidrofílicização consiste em:

- 1) Imergir o substrato em uma solução básica contendo NH_4OH : H_2O_2 : H_2O na proporção 1:1:5 por 10 minutos, à temperatura entre 70 e 80 °C.
- 2) Lavar o substrato com água ultrapura de origem do sistema Milli-Q.
- 3) Imergir o substrato em uma solução ácida de HCl : H_2O_2 : H_2O (1:1:6) por mais 10 minutos, entre 70 e 80 °C e lavá-lo novamente em água Milli-Q.

Para a espectroscopia FTIR e SFG utilizou-se substrato de CaF_2 limpos com peróxido de hidrogênio e permanganato de potássio, alternadamente.

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados substratos de vidro recobertos com óxido de estanho dopado com índio (*indium tin oxide*, ITO) da marca Delta Technologies, com resistência de 8-12 Ω . Eles foram limpos em clorofórmio por 5 minutos, depois com água Milli-Q e por último em álcool isopropílico por 30 minutos sob sonicação em um ultrassom Maxi Clean 750 da Unique.

3.1.3. Soluções

O tampão acetato de sódio foi preparado diluindo o acetato de sódio a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ em água ultrapura Milli-Q e o pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético. O tampão fosfato foi preparado com uma solução de fosfato de sódio monobásico de 10 mmol.L^{-1} em água Milli-Q, e ajustado para pH 6,3 com um solução de fosfato de sódio bibásico anidro (10 mmol.L^{-1} em água Milli-Q).

A β -Gal foi preparada a uma concentração de 5 mg.mL^{-1} , a GOx a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a β -lactose (obtida comercialmente da Sigma-Aldrich[®]), com massa molecular de $342,3 \text{ g.mol}^{-1}$, foi preparado a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Todos foram solubilizados em tampão acetato.

Os polieletrólitos PAH e PVS foram preparados em tampão acetato de sódio, enquanto o PEI foi preparado em água Milli-Q com o pH acertado em 5,5 com solução de HCl (1 mol.L^{-1}). O PAH e PEI foram preparados a 1 mg.mL^{-1} e o PVS a $40 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e adquiridos comercialmente pela Sigma-Aldrich[®].

Para o teste de interferentes foram usados: glicose e sacarose obtidos da Sigma Aldrich e ácido ascórbico da Cinética todos preparados à $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão acetato de sódio, e ácido úrico da Fluka diluído em solução de NaOH $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, completado com tampão acetato e teve o pH acertado para 5,5 com HCl 1 mol.L^{-1} .

3.2. MÉTODOS

Para verificar a eficiência da técnica LbL em imobilizar a β -Gal foram feitas caracterizações por espectroscopia de UV-vis e fluorescência. Antes de iniciar a deposição das bicamadas com o material de interesse, foi depositado sobre o substrato duas bicamadas de polycation/poliânion durante 3 minutos cada, intercaladas com lavagem com o respectivo solvente, para minimizar os efeitos do substrato, (PETRI; FERREIRA; MORAES, 2011), pois eles são normalmente rugosos e as primeiras bicamadas tem maior interação com o substrato, de forma que as camadas posteriores vão ter mais interações com o próprio material depositado do que com o substrato. Nesse caso o polycation usado é o mesmo que será usado no restante do filme, então para os filmes PEI/ β -Gal essas bicamadas foram feitas com PEI/PVS, enquanto os filmes que utilizaram PAH/ β -Gal foram PAH/PVS.

As medidas de absorvância foram realizadas no equipamento Thermo Scientific Genesys 6[™]. A linha de base para filmes foi feita com lâmina de quartzo enquanto para soluções utilizou-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm contendo o solvente

correspondente ao usado na medida. As medidas de emissão foram feitas no equipamento Shimadzu TM, modelo RF-5301 PC.

As medidas amperométricas foram feitas no potenciostato Autolab, modelo PGSTAT 30 com um eletrodo de trabalho (platina de 1 cm²), um de referência (calomelano) e o de trabalho modificado com ITO/PB/(PAH)/PVS)₁/(PAH/ β -Gal)_n ou ITO/PB/(PEI/PVS)₁(PEI/ β -Gal)_n (n representa uma quantidade indeterminada de bicamadas) em uma cela eletroquímica convencional contendo 7 mL de tampão acetato de sódio + 500 μ L de GOx. O potencial foi mantido no valor operacional de 0,0 V, e foram adicionadas alíquotas de 100 μ L de lactose a 0,1 mol.L⁻¹ foram iniciadas após a estabilização da corrente, sob agitação constante.

3.2.1. Filmes de β -gal

Os filmes (PEI/ β -Gal)_n foram produzidos por 3 minutos em solução de PEI, 30 segundos em tampão acetato de sódio para lavagem, 3 minutos em solução de β -Gal e 30 segundos em tampão para lavagem novamente. O procedimento foi realizado para filmes de 10 e 30 bicamadas, e pode ser visualizado na FIG. 15.

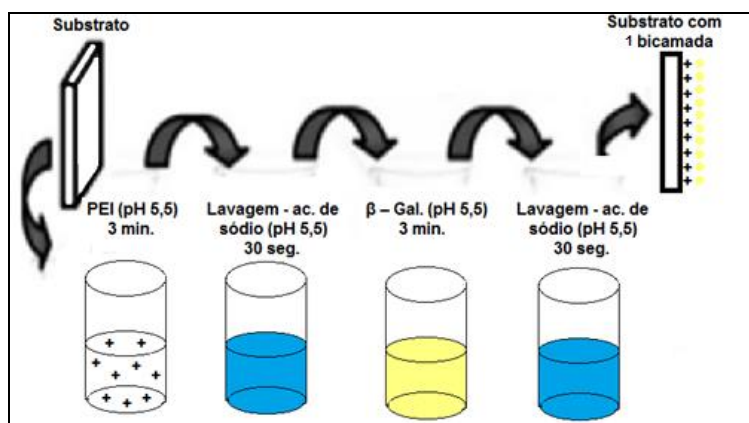


FIGURA 13 - Esquema de montagem do filme PEI/ β -Gal

Os filmes (PAH/ β -Gal)_n foram produzidos por 3 minutos em solução de PAH, 30 segundos em tampão acetato de sódio para lavagem, 3 minutos em solução de β -Gal e 30 segundos em tampão para lavagem novamente. O procedimento foi realizado para filmes de 10 e 30 bicamadas, FIG. 16.

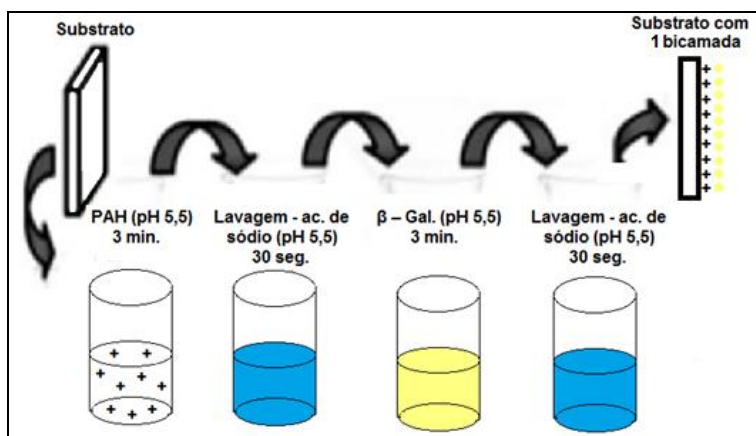


FIGURA 14 - Esquema de montagem do filme PAH/ β -Gal.

É usual trabalhar com o PEI e PAH com a concentração de 1 mg.mL^{-1} e fazer a deposição por 3 minutos (MORAES et al., 2010) (SOUZA; MORAES; FERREIRA, 2013). O tempo de 3 minutos da enzima e sua concentração de 5 mg.mL^{-1} foi determinado por observações durante o trabalho.

3.2.2. Filmes de β -Gal e GOx

Para esses filmes a GOx foi preparada em tampão fosfato de sódio a 5 mg.mL^{-1} no pH 6,3 e o tempo de imersão do substrato na solução enzimática foi 5 minutos. Exclusivamente para as bicamadas de GOx o PAH foi preparado em tampão fosfato, a 1 mg.mL^{-1} e tempo de imersão de 3 minutos, a solução de lavagem foi o próprio tampão fosfato. Para as bicamadas de β -Gal o PAH foi preparado de acordo com a seção 3.1.3.

Foram feitos filmes com cinco bicamadas de β -Gal e cinco de GOx de três formas: no primeiro caso a β -Gal foi imobilizada antes da GOx - ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₅/(PAH/GOx)₅, no segundo caso a ordem foi invertida e a β -Gal foi imobilizada depois da GOx - ITO/PB/(PAH/GOx)₅/(PAH/ β -Gal)₅, no terceiro caso as duas enzimas foram intercaladas - ITO/PB/(PAH/ β -Gal/PAH/GOx)₁₀. Os filmes foram testados por amperometria em uma cela eletroquímica convencional contendo 7 mL de tampão acetato de sódio. O potencial foi mantido no valor operacional de 0,0 V, e foram adicionadas alíquotas de 100 μL de lactose a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, iniciadas após a estabilização da corrente, sob agitação constante.

3.2.3. Teste do branco

Foi feito um teste amperométrico com um eletrodo modificado apenas com ITO/PB em uma cela eletroquímica convencional contendo 7 mL de tampão acetato de sódio + 500 µL de GOx. O potencial foi mantido no valor operacional de 0,0 V, e foram adicionadas alíquotas de 100 µL de lactose a 0,1 mol.L⁻¹, iniciadas após a estabilização da corrente, sob agitação constante.

3.2.4. Deposição do Azul da Prússia

O filme de PB foi depositado em ITO por amperometria com potencial de + 0,40 V (vs eletrodo de Ag/AgCl) durante 400 segundos em solução aquosa de 2×10^{-3} mol.L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆] + 2×10^{-3} mol.L⁻¹ FeCl₃ em 0.1 mol.L⁻¹ KCl + 0.01 mol.L⁻¹ HCl. Após a deposição o ITO foi lavado com água ultrapura Milli-Q e colocado em 0.1 mol.L⁻¹ KCl + 0.01 mol.L⁻¹ HCl para voltametria cíclica com potencial de 0.0 a 1.0 V vs eletrodo de Ag/AgCl) a uma taxa de varredura de 0,05 V s⁻¹ até a estabilização da voltametria (FERREIRA et al., 2004).

3.2.5. Teste de interferentes

O teste de interferentes foi realizado por amperometria com filme (ITO/PB/PEI/β-Gal)₃₀. Durante o processo foram adicionadas alíquotas de glicose, sacarose, ácido úrico, ácido ascórbico, lactose e tampão acetato de sódio como descrito na seção 3.2.

3.2.6. Teste de estabilidade

O teste foi realizado com o filme (ITO/PB/PEI/β-Gal)₃₀, que foi armazenado por 12 dias a aproximadamente 4°C em tampão acetato de sódio. Durante esse intervalo foram feitas medidas em dias alternados. Utilizou-se a técnica amperométrica como descrito na seção 3.2.

3.2.7. Espectroscopia na região do Infravermelho

Os testes de FTIR e SFG foram realizados no Instituto de Física de São Carlos (USP/IFSC) em colaboração com o aluno de pós-doutorado Dr. Diego Volpati e com o professor Dr. Paulo Barbeitas Miranda. As medidas de FTIR foram feitas no modo

transmissão comparando filmes de apenas polieletrólitos (PEI/PVS)₃ e com a enzima adsorvida sobre a superfície do filme por 5 minutos (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ em substrato de CaF₂, secos por N₂ antes da medida. Fez-se também uma medida apenas com a enzima dispersa em matriz de KBr (concentração de 0,5% em matrix de KBr). Utilizou-se para estas medidas um espectrômetro Nicolet 470 Nexus, com fluxo de nitrogênio constante, localizado no IFSC. Os espectros obtidos foram editados no programa GRAMS - Software de espectroscopia (suavização e linha de base). O objetivo foi avaliar a composição dos filmes com e sem a enzima e em relação a ela pura.

3.2.8. Espectroscopia por Geração de Soma de Frequência (SFG)

A espectroscopia por geração de soma de frequências (SFG) foi utilizada devido ao seu intrínseco caráter seletivo a interfaces. Os espectros vibracionais SFG foram feitos com um modelo comercial Ekspla (Lituânia), localizado no IFSC, equipado com um laser pulsado Nd³⁺:YAG que fornece feixes em 1064 nm (duração do pulso de 28 ps, com taxa de repetição de 20 Hz), com feixes de segundo harmônico de $\lambda = 532$ nm e de terceiro harmônico $\lambda = 355$ nm. Os terceiros feixes harmônicos e fundamentais chegam a um amplificador paramétrico ótico com um estágio de frequência que gera uma diferença de infravermelhos (IR) sintonizável na faixa de 1.000 a 4.000 cm⁻¹, com energia de pulso próximo a 30-200 μ J. Os tamanhos de pontos e ângulos de incidência para o IR e feixes visíveis são 0,50 mm, e 1,00, respectivamente. O sinal é medido com um fotomultiplicador após a filtragem espectral e espacial com dados coletados para cada escaneamento ponto com resolução de 3 cm⁻¹.

Nesse trabalho, as amostras foram medidas para as interfaces (PEI/PVS)₃ em tampão acetato de sódio, (PEI/PVS)₃ com solução de lactose (0,1 mol.L⁻¹), (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ (5 mg.mL⁻¹) em tampão acetato de sódio como está idealizado na FIG. 17, de forma que incide sobre o filme os dois feixes provenientes das medidas, e (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ + Lactose nas mesmas concentrações anteriores. As medidas foram realizadas na polarização PPP na região de 1500 a 1800 cm⁻¹, e o sinal proveniente das amostras foi normalizado pelo sinal do ZnS.

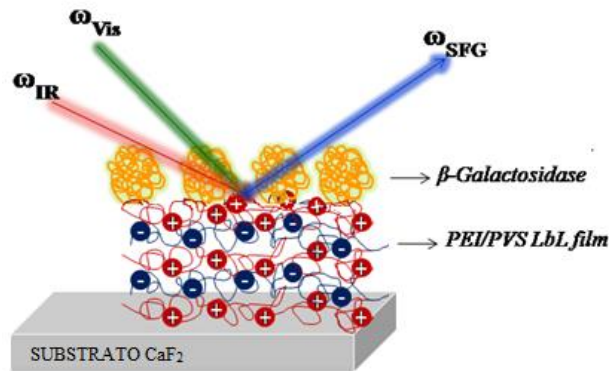


FIGURA 15 – Esquema idealizado dos feixes de IR e visível incidindo sobre o filme $(PEI/PVS)_2/(PEI-\beta-Gal)_1$.

3.3. MECANISMO DO BIOSENSOR ITO/PB/(PEI/PVS)/(PEI/ β -GAL)_N E ITO/PB/(PAH/PVS)/(PAH/ β -GAL)_N

Espera-se que quando a β -lactose for adicionada na cela eletroquímica, a β -Gal a converta em D-galactose e β -D-glicose (LISBOA et al., 2012) (MARIOTTI et al., 2008). A segunda etapa do processo consiste na conversão da D-glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (BANKAR et al., 2009), e a terceira etapa se baseia na transferência de elétrons pelo PB (RICCI; PALLESCHI, 2005), como ilustrado na FIG. 13.

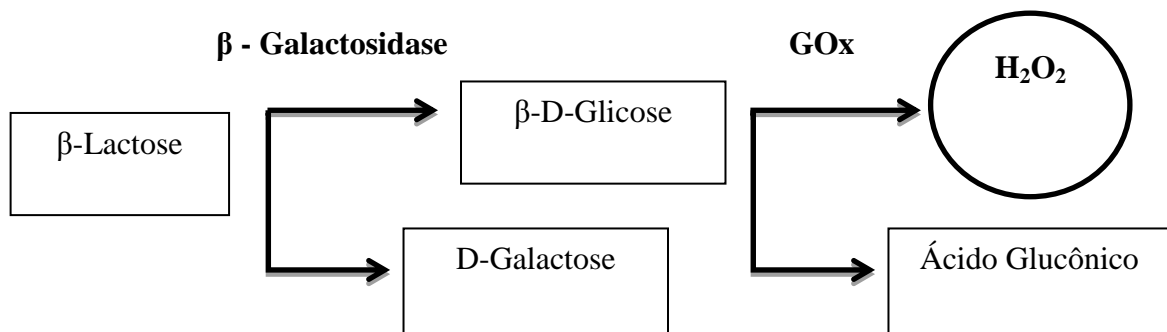


FIGURA 16 - Esquema simplificado das reações esperadas para o biossensor amperométrico de lactose

A FIG. 14 apresenta um esquema idealizado do filme LbL contendo a enzima imobilizada sobre o ITO previamente modificado com PB. O mecanismo de detecção da lactose, na presença da GOx em tampão, com a geração de H_2O_2 está retratado nos passos 1 e 2, 3 e 4. Na etapa 1 a lactose entra em contato com a β -Gal imobilizada no filme e é convertido em produtos + glicose. Na etapa 2 a glicose entra em contato com a GOx

imobilizada no filme ou livre na solução, e há a geração de produtos + peróxido de hidrogênio. Na etapa 3 ocorre a difusão do peróxido pelo filme até chegar ao PB, etapa 4, onde será reduzido à água e dessa forma haverá queda da corrente elétrica.

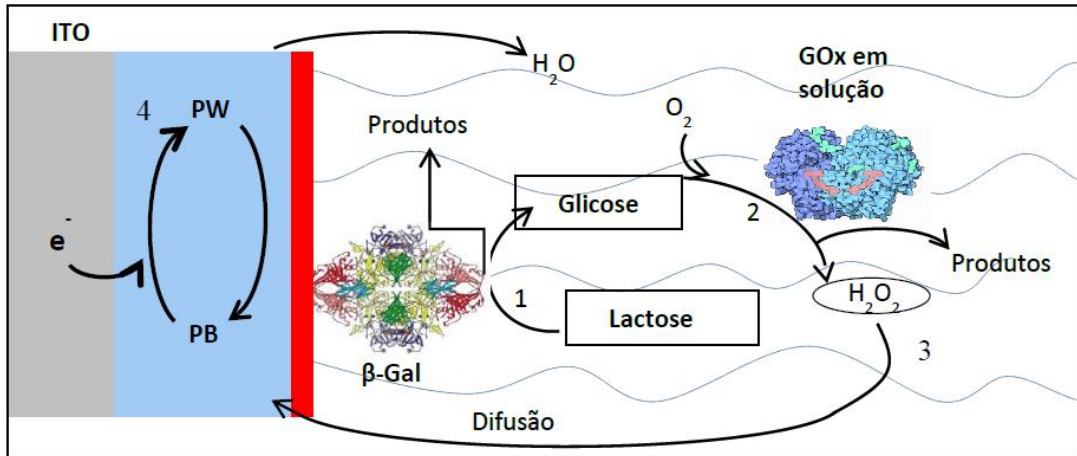


FIGURA 17 – Esquema idealizado do biossensor. Na etapa 1 a β -Gal imobilizada no filme faz a quebra da lactose em glicose + produtos, na etapa 2 a glicose entra em contato com a GOx em solução gerando H_2O_2 + produtos, na etapa 3 o H_2O_2 se difunde até o PB e na etapa 4 o H_2O_2 é reduzido à água pelo PB.

O PB depositado sobre o ITO quando na presença de H_2O_2 é reduzido para a forma incolor, o Prussian White (PW), de acordo com a Equação (4):



Onde o FeIII e o FeII são estados de oxidação dos átomos de ferro na estrutura do PB. O PW reduz eletrocataliticamente o H_2O_2 formado pela reação enzimática (FERREIRA et al., 2004).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA

4.1.1. β -Galactosidase em solução

Inicialmente, foram feitas medidas de absorção e emissão apenas da solução de β -Gal para verificar o comportamento da enzima pura em tampão acetato de sódio, na concentração de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em pH 5,5. Do espectro é possível verificar a banda de $\lambda = 280 \text{ nm}$, FIG. 18A. Craven G. R., et al, fizeram um estudo da composição da enzima originária da bactéria *Escherichia coli* em 1965, e listou suas proporções de aminoácidos, citando, por exemplo, a fenilalanina, tirosina, triptofano, metionina e histidina, entre outros (CRAVEN, 1965). Alguns anos depois Tanaka, Y. et al., confirmaram a presença destes aminoácidos na enzima originária do fungo *Aspergillus Oryzae* e demonstrou apenas diferentes proporções, o que é comum, pois varia conforme a origem. Estes aminoácidos são bastante encontrados nas demais enzimas, e quando analisados em teste de UV-vis é comum apresentarem banda em $\lambda = 280 \text{ nm}$ (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

No fluorímetro excitando a solução em $\lambda = 280 \text{ nm}$, observou-se a banda de emissão em 350 nm , FIG. 18B. A maioria dos espectros de fluorescência de proteínas exibe essa banda pelos três aminoácidos já citados, fenilalanina, tirosina e triptofano (LAKOWICZ, 2006).

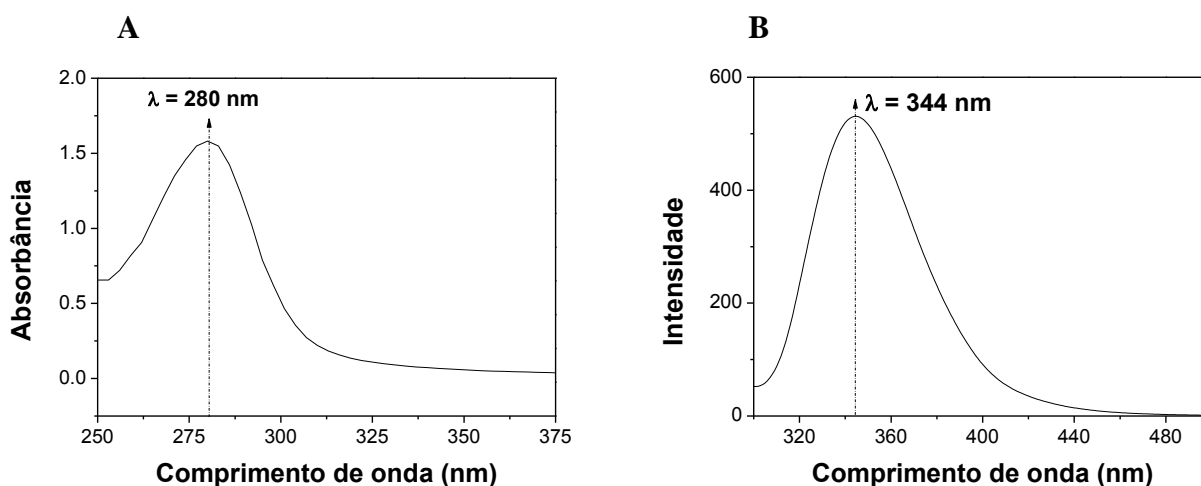


FIGURA 18 – Espectros de absorção (A) e emissão (B) da β -Gal em solução tampão acetato de sódio.

4.1.2. Filmes PEI/ β -Gal

Cada bicamada depositada do filme (PEI/ β -Gal)₁₀ foi monitorada por UV-vis e fluorescência. Do espectro ilustrado na FIG 19 é possível verificar a banda de absorção em $\lambda = 280$ nm o que condiz com o espectro da enzima pura em solução tampão (FIG 18A) e com esses resultados conclui-se que a técnica LbL está sendo eficiente na imobilização da β -Gal sobre o substrato de quartzo. O *inset* ilustra o gráfico da absorbância vs. o número de bicamadas coletados em $\lambda = 280$ nm e coeficiente de correlação (R^2) é = 0,84.

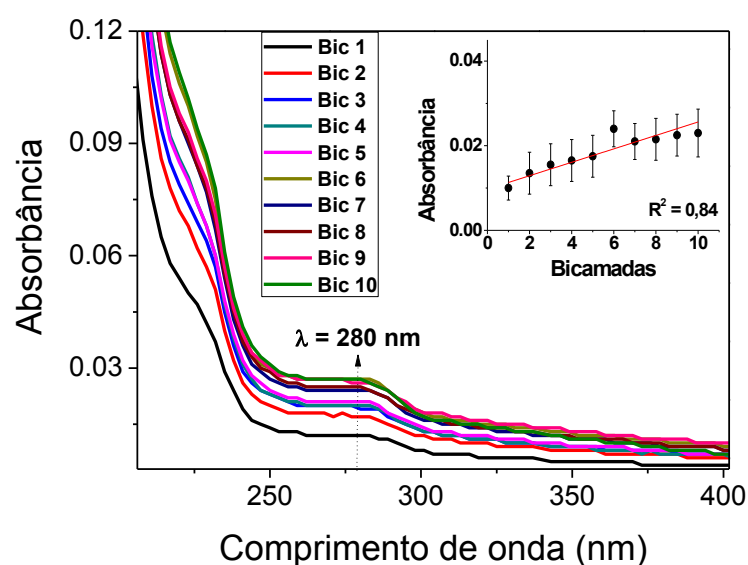


FIGURA 19 – Espectros de absorção do filme (PEI/ β -Gal)₁₀. O *inset* ilustra a absorbância monitorada em $\lambda = 280$ nm em função das bicamadas.

O espectro de fluorescência, obtido com a excitação em $\lambda = 280$ nm, confirmou a presença da β -Gal no filme a cada bicamada, com a banda de emissão em $\lambda = 344$ nm, como ilustra a FIG. 20, o que confere com a banda de emissão da enzima pura. O *inset* ilustra o gráfico da intensidade vs. o número de bicamadas em $\lambda = 344$ nm e o coeficiente de correlação (R^2) é = 0,95.

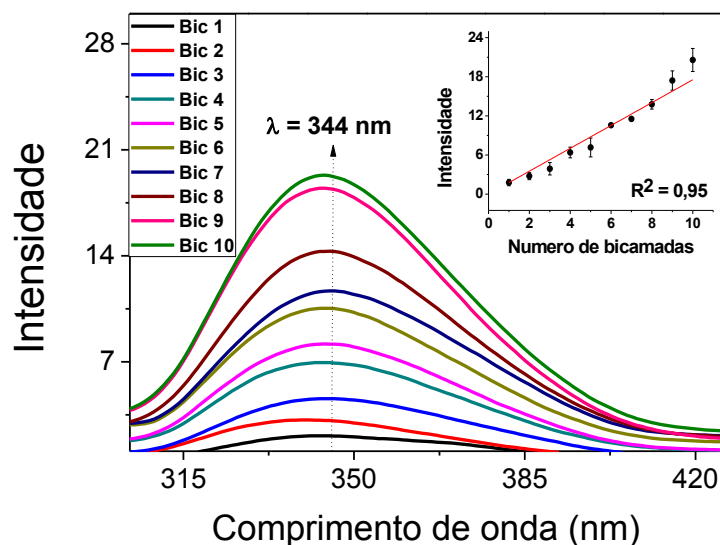


FIGURA 20 - Espectros de emissão do filme (PEI/ β -Gal)₁₀ excitado em $\lambda = 280$ nm. O *inset* ilustra os valores de emissão para cada bicamada monitorada em $\lambda = 344$ nm.

4.1.3. Filmes PAH/ β -Gal

Os espectros de absorção do filme (PAH/ β -Gal)₁₀ estão apresentados na FIG. 21. O *inset* da figura ilustra o gráfico de absorbância em função do número de bicamadas. O crescimento do filme é linear fixando o comprimento de onda em 280 nm, da mesma forma que o filme (PEI/ β -Gal)₁₀ e solução enzimática, o que afirma a presença da enzima no filme. O coeficiente de correlação foi de (R^2) $\epsilon = 0,97$.

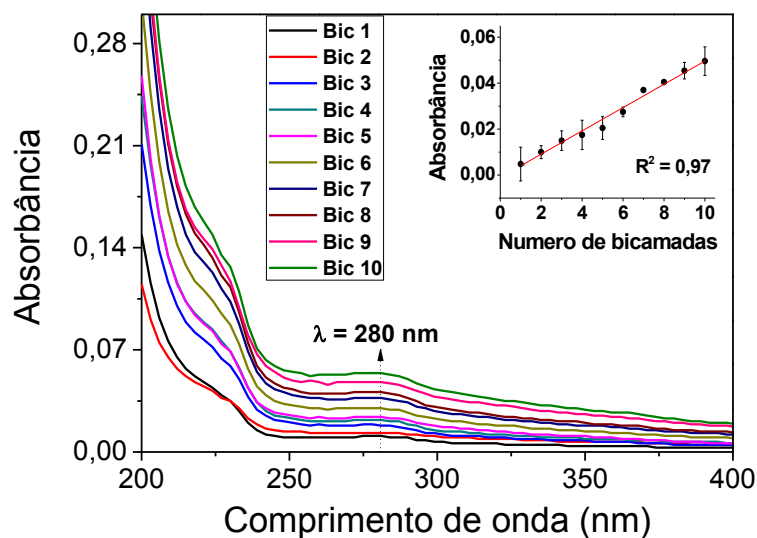


FIGURA 21 - Espectros de absorção do filme (PAH/ β -Gal)₁₀. O *inset* ilustra a absorbância monitorada em $\lambda = 280$ nm em função do número de bicamadas.

Os espectros de emissão do filme (PAH/ β -Gal)₁₀ apresentou uma forte banda por volta de $\lambda = 344$ nm, coincidindo com o filme (PEI/ β -Gal)₁₀ e com a solução enzimática em tampão, confirmando a presença da enzima no filme, como ilustra a FIG. 22. O *inset* ilustra a intensidade vs. número de bicamadas e o coeficiente de correlação (R^2) é = 0,96.

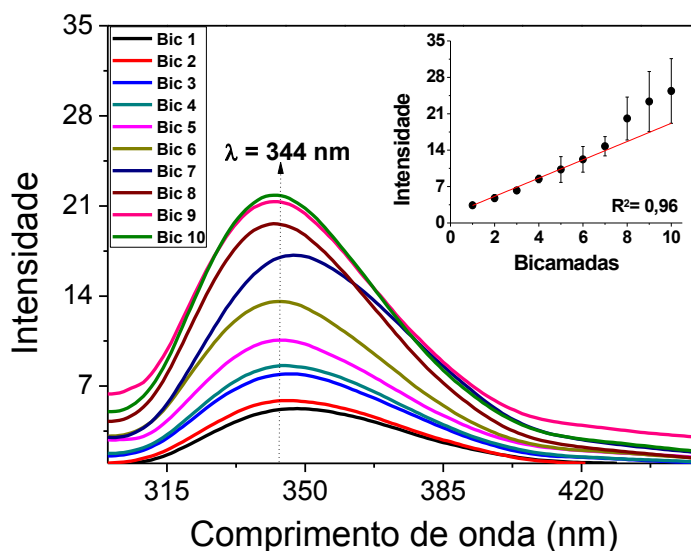


FIGURA 22 - Espectros de emissão do filme (PAH/ β -Gal)₁₀ excitado em 280 nm. O *inset* ilustra os valores de emissão para cada bicamada monitorada em 344 nm.

4.1.4. FTIR

A técnica espectroscópica de FTIR foi aplicada para estudar a estrutura do filme (PEI/PVS) e como ele suporta a β -Gal imobilizada no substrato sólido. Os espectros dos filmes (PEI/PVS)₃, (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁, e β -Gal dispersa em matriz de KBr estão ilustrados na FIG. 23.

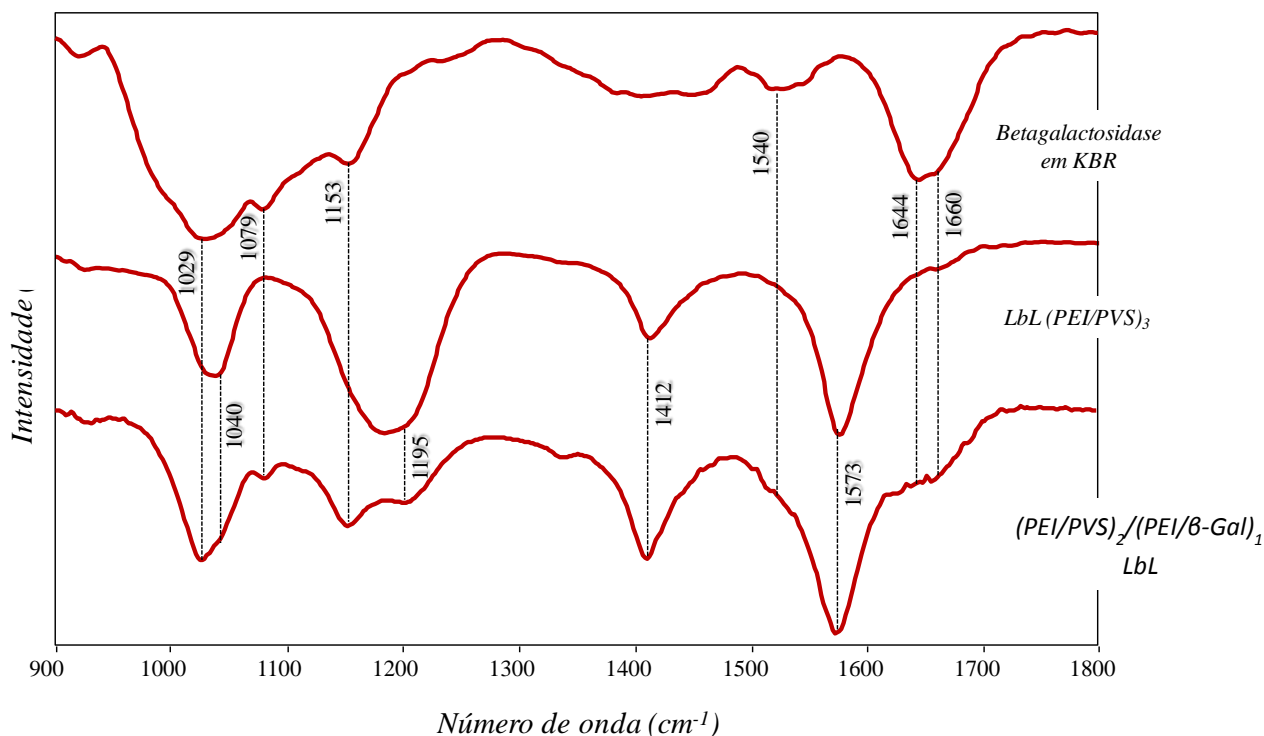


FIGURA 23 – Espectros FTIR dos filmes (PEI/PVS), (PEI/PVS)₂/(PEI/β-Gal)₁, e da β-Gal pura dispersa em matriz de KBr, com suas respectivas bandas características.

O filme (PEI/PVS)₃ exibiu bandas em 1040, 1195, 1412 e 1573 cm⁻¹, relacionadas ao estiramento simétrico do grupo SO, deformação angular C-H das cadeias poliméricas e a deformação angular do grupo NH, respectivamente (OUYANG et al., 2007), (KIM; URBAN, 1998), (VINHOLA et al., 2012). Os estiramentos do grupo SO estão relacionados ao polímero PVS, as deformações dos grupos NH são estritamente relacionadas ao polímero PEI (OUYANG et al., 2007) e a deformação angular das ligações C-H podem ser atribuídas aos dois polímeros (OUYANG et al., 2007).

O espectro do filme LbL (PEI/PVS)₂/(PEI/β-Gal)₁ indica que todas as bandas observadas são uma totalização das bandas presentes no filmes LbL (PVE/PVS)₃ e na β-Gal em KBr, revelando que a enzima foi imobilizada com sucesso no topo dos filmes LbL poliméricos que suporta outras aplicações neste sistema nanoestruturado. Nenhum deslocamento de banda foi observado no filme (PEI/PVS)₂/(PEI/β-Gal)₁, e nem o aparecimento de bandas novas quando comparado aos seus precursores, o que torna possível sustentar que as interações entre a enzima e o filme polimérico ocorrem por interações secundárias. No entanto, essa ligação deve ser forte o suficiente para manter a enzima ligada ao filme polimérico, mesmo em meio aquoso. As bandas observadas no espectro de FTIR da FIG. 23 estão organizadas na Tabela 2.

TABELA 2 – Principais bandas observadas no espectro de FTIR do filme (PEI/PVS)₃ e da β -Gal.

Banda do filme (PEI/PVS) ₃	Banda da β -Gal	Atribuição
1040 cm ⁻¹	--	Estiramento simétrico do grupo SO
1195 cm ⁻¹	--	Estiramento simétrico do grupo SO
1412 cm ⁻¹	--	Deformação angular C-H das cadeias poliméricas
--	1540 cm ⁻¹	Amida II
1573	--	Deformação angular do grupo NH relacionado ao PEI
--	1644 cm ⁻¹	Estrutura do tipo <i>random coil</i> (enovelamento aleatória)
--	1660 cm ⁻¹	Amida I - α -hélice

4.1.5. Espectroscopia por Geração de Soma de Frequência (SFG)

A espectroscopia por geração de soma de frequências (SFG) foi utilizada devido ao seu intrínseco caráter seletivo a interfaces para avançar na caracterização do sistema (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁. As medições foram realizadas em uma interface ar-sólido para as amostras feitas sobre CaF₂ e as amostras analisadas foram PEI/PVS e (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ imersos em solução tampão ou solução de lactose, totalizando quatro amostras. Esse esquema foi estudado para simular os processos sensoriais quando estes filmes LbL com e sem a enzima são expostos à solução de lactose e de forma semelhante ao modo como foi feito ao FTIR. Os resultados do SFG estão ilustrados na FIG. 24, para as quatro amostras analisadas.

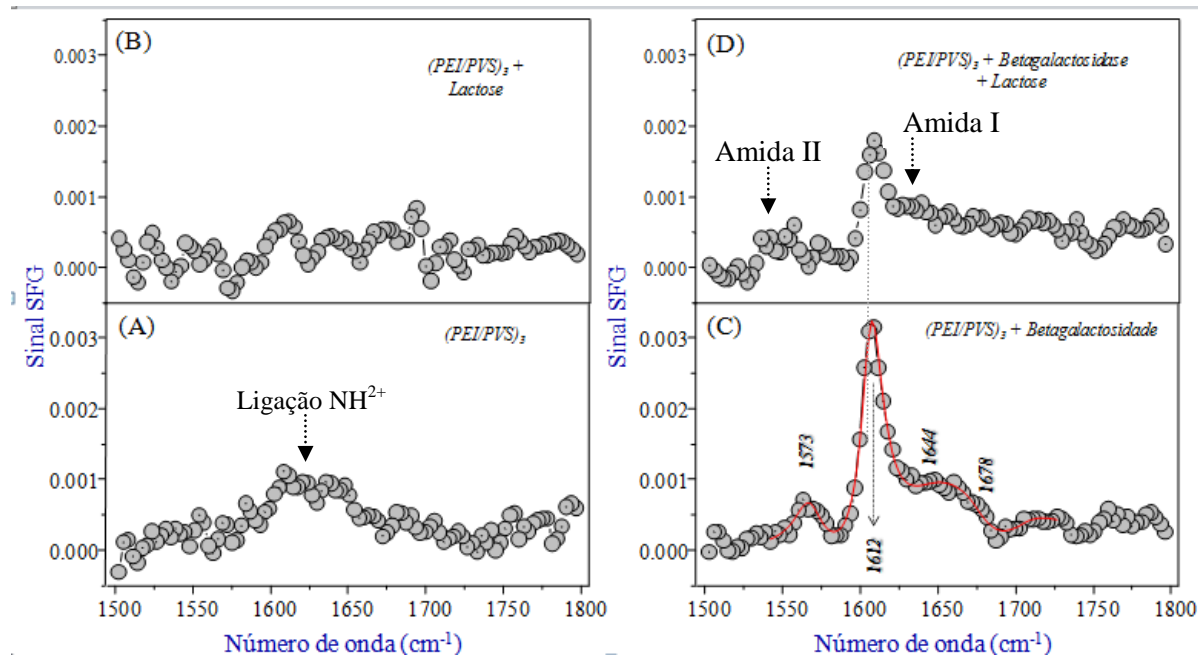


FIGURA 24 – Espectroscopia SFG para as amostras de PEI/PVS (a) imerso em tampão acetato de sódio (b) imerso em solução de lactose (c) $(PEI/PVS)_2/(PEI/\beta\text{-Gal})_1$ imerso em tampão acetato de sódio (d) $(PEI/PVS)_2/(PEI/\beta\text{-Gal})_1$ imerso em solução de lactose. As medidas foram realizadas numa configuração de polarização PPP, onde os filmes PEI/PVS eram compostos por três bicamadas cada. A Figura (c) apresenta uma curva ajustada (linha vermelha) com todos os picos centrados utilizados como parâmetros no processo de montagem.

Os resultados dos experimentos de controle mostram que o $(PEI/PVS)_3$ (FIG. 24A) exibiu uma banda larga e de baixa intensidade na região de 1600 a 1650 cm^{-1} . Essa banda pode ser atribuída à deformação do NH^{2+} , uma forma ionizada que se originada pela interação do polímero com a água (KIM; URBAN, 1998) (COLTHUP; DALY; WIBERLEY, 1990).

Quando o filme PEI/PVS LbL é imerso na solução de lactose, como ilustra a FIG. 24B, há uma perda da banda presente na medida anterior, uma vez que o sinal é reduzido a flutuações em torno de zero. Para o SFG gerar um sinal é necessário que haja um orientação molecular, portanto é possível que a orientação simétrica tenha sido perdida após a imersão do filme em lactose.

O filme contendo $(PEI/PVS)_2/(PEI/\beta\text{-Gal})_1$ (FIG. 24C) exibiu quatro bandas em seu espectro, as quais estão identificadas na figura: a banda em 1573 cm^{-1} , uma banda estreita e intensa com máximo em 1612 cm^{-1} , e outras duas bandas em 1644 e 1678 cm^{-1} que só foram identificadas no espectro após o ajuste do resultado experimental através de uma curva teórica simulada com 4 bandas (*fitting*) realizado com o programa OriginPro 8.0. A banda em 1573 cm^{-1} já foi atribuída no FTIR como sendo uma deformação angular do grupo NH. Esta banda deve ter aparecido somente nesta amostra devido à interação do filme com a enzima: a interação entre eles pode ter induzido uma reorientação dos grupos NH deixando-os com uma

orientação preferencial no plano da interface. Comparando com as experiências do controle (FIG. 24A e 24B) este modo de vibração não foi observado, provavelmente devido à falta de interação com a enzima resultando na ausência de orientação.

As bandas em 1644 e 1678 cm^{-1} são atribuídas à enzima. A banda em 1644 cm^{-1} foi também observada no FTIR e está relacionada a uma estrutura do tipo *random coil* (enovelamento aleatória). A segunda banda em 1678 cm^{-1} (ausente no FTIR) é atribuída a estruturas do tipo β -turns e/ou β -sheets, segundo trabalhos da literatura envolvendo peptídeos (ARRONDO et al., 1989) (MUGA et al., 1993) (LIU et al., 2013). Podemos então especular que houve uma mudança da estrutura da proteína quando ela foi solubilizada e imobilizada sobre o filmes de (PEI/PVS)₃. Essa especulação ganha força pela atribuição da banda intensa em 1612 cm^{-1} , que segundo autores pode ser atribuída a uma forma agregada da enzima chamada de *aggregated strands*, ou ainda a interações intramoleculares que levam à formação da estrutura β -sheet (ADOCHITEI; DROCHIOIU, 2011) (CLARK; SAUNDERSON; SUGGETT, 1981) (LIU et al., 2013). É importante verificar que ela sofreu alteração na sua estrutura imobilizada sobre o filme LbL se comparada com estrutura inicial determinada pelo FTIR (pó disperso em KBr), podendo-se supor que a enzima sofreu modificações na sua estrutura inicial depois de ser imobilizada sobre o filme LbL.

A FIG. 24D ilustra o espectro para o filme (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ imersa na solução de lactose, e revela que a enzima continua adsorvida ao filme mesmo após ser exposta a outro meio líquido que não seja sua solução original, uma vez que o pico da enzima em 1612 cm^{-1} ainda pode ser observado. Uma nova banda em torno de 1540 cm^{-1} tornou-se notável e provavelmente é atribuído à amida II da enzima e certamente está relacionada a exposição/interação da enzima com a lactose. No entanto, a tentativa de estabelecer qualquer tipo de modelo para a interação entre a enzima e lactose é impraticável uma vez que os sinais SFG e FTIR são muito pequenos. É possível, em trabalhos futuros, se aprofundar no estudo das interações entre enzima/filme e enzima/lactose com a realização de medidas usando diferentes concentrações de soluções, outras estruturas de filme LbL, variar o substrato e usar outras combinações de polarização.

Com todos os resultados espectroscópicos apresentados aqui é possível afirmar que a enzima foi imobilizada com sucesso sobre o topo dos filmes poliméricos (PEI/PVS)₃, formando o sistema de (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁. Além disso, essa imobilização é forte o suficiente para suportar as medidas eletroquímicas em soluções que contenham lactose e tampão, como também nas aplicações em biossensoriamento. Trabalhos futuros devem ser

feitos para entender melhor o processo de interação entre a lactose e β -Gal, assim como as alterações da estrutura da enzima quando interagindo com a lactose.

4.2. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

4.2.1. Deposição do PB

A voltametria cíclica do ITO/PB, como ilustrado na FIG. 25, indica que o processo de deposição do PB ocorreu de acordo com a literatura, pois apresentou boa estabilidade eletroquímica nos 20 ciclos e os picos de redução e oxidação representados pelas letras A, B, C e D, mostrando que o filme passou pelas etapas PW, BG e PB (LUPU et al., 2002) (OLIVEIRA, R. F., 2010). O teste foi realizado em solução 1:1 de KCl ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) + HCl ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), com varredura de 0,0 a 1,0 V, taxa de varredura de $0,05 \text{ V.s}^{-1}$, em eletrodo recoberto com PB em aproximadamente 1 cm^2 . Algumas diferenças entre a voltametria cíclica da FIG. 4 e da FIG. 25 ocorreram devido a diferentes condições de realização do teste.

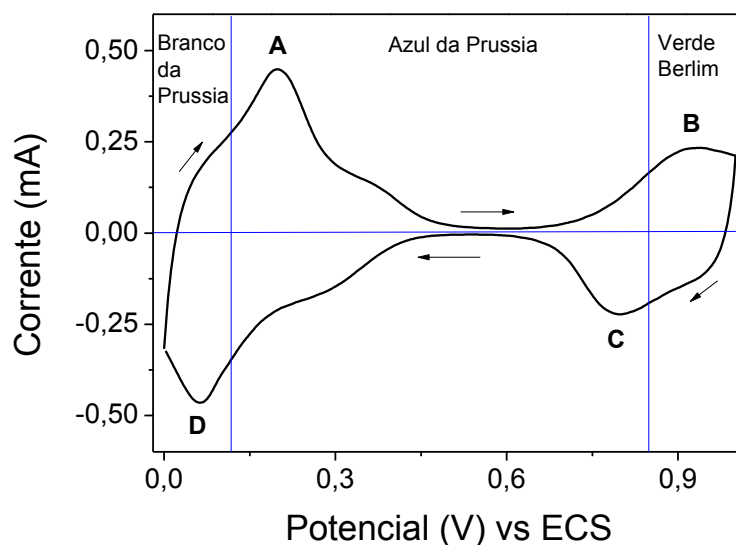


FIGURA 25 - Voltamograma cíclico do ITO/PB varrendo de 0 a 1 V (vs ECS) – 50 mV. Exibiu os picos de redução e oxidação indicados pelas letras.

4.2.2. Teste do branco

Para assegurar que a resposta do biossensor pela técnica amperométrica ocorreria devido às reações enzimáticas, um teste branco foi feito apenas com um eletrodo ITO/PB, contendo a GOx ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) em solução eletrolítica. Quando a lactose ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) foi

adicionada à célula não houve queda na corrente, o que já era esperado. O teste pode ser mais bem visualizado na FIG. 26 com uma ampliação à direita, a corrente só caiu com a titulação do peróxido de hidrogênio.

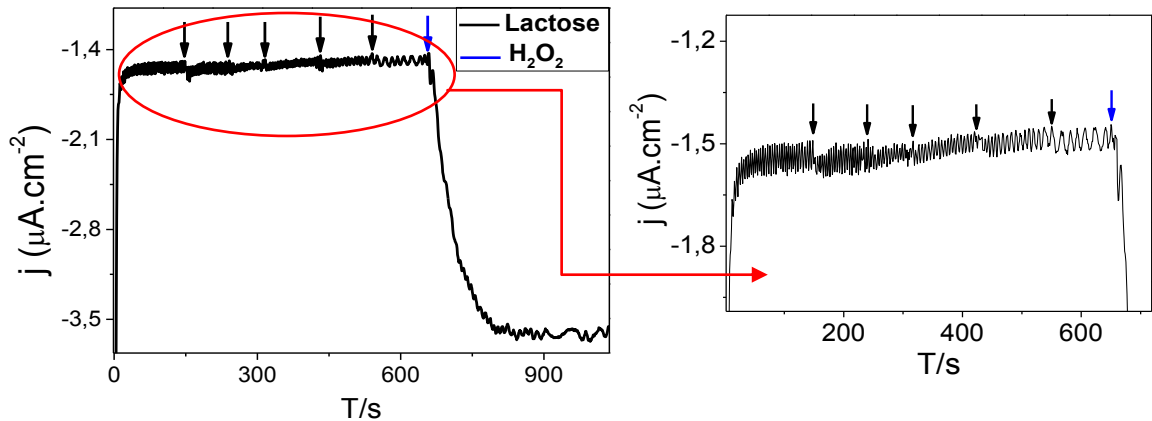


FIGURA 27 - Teste amperométrico sem a presença da β -Gal, não houve queda na corrente

4.2.3. Filmes de β -gal

Inicialmente os filmes ITO/PB/(PEI/ β -Gal) e ITO/PB/(PAH/ β -Gal) ambos com dez bicamadas foram testados por amperometria com solução de GOx ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) na solução eletrolítica. O ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₁₀ alcançou uma sensibilidade média de $0,061 \text{ } \mu\text{A.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, FIG. 27, enquanto o ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₁₀ $0,051 \text{ } \mu\text{A.mmol}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, FIG. 28, em ambas as figuras o *inset* ilustra a variação da corrente em função da concentração da lactose.

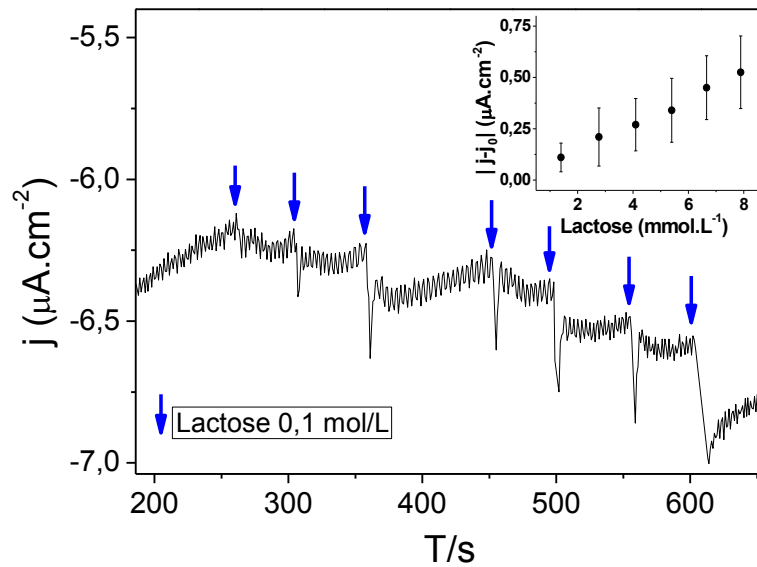


FIGURA 28 – Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₁₀. A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O *inset* ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose

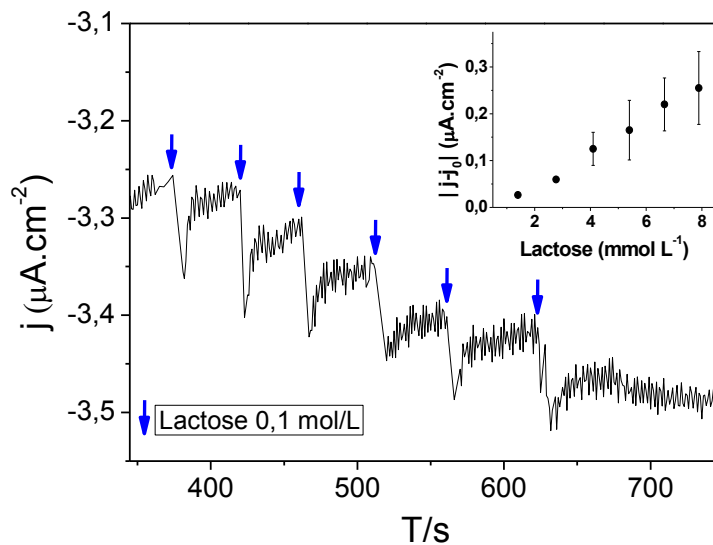


FIGURA 29 - Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₁₀. A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O *inset* ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose

A fim de melhorar a sensibilidade do biossensor, uma nova arquitetura de filme foi testada, com 30 bicamadas por amperometria com solução de GOx ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) na cela eletrolítica, FIG. 29, o *inset* apresenta a variação da corrente em função da concentração da lactose. O filme ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₃₀ apresentou maior sensibilidade do que o filme composto de ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₁₀, que foi $0,31 \mu\text{A}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. Uma explicação é que uma

maior quantidade de enzima tenha sido imobilizada no filme de 30 bicamadas, aumentando o sinal. A diferença na sensibilidade dos dois filmes pode ser visualizada na FIG. 30. Na literatura existem outros exemplos de biossensores feitos com a técnica LbL que têm a sensibilidade aumentada de forma linear com o número de bicamadas (FERREIRA et al., 2004) (SAADATI et al., 2012).

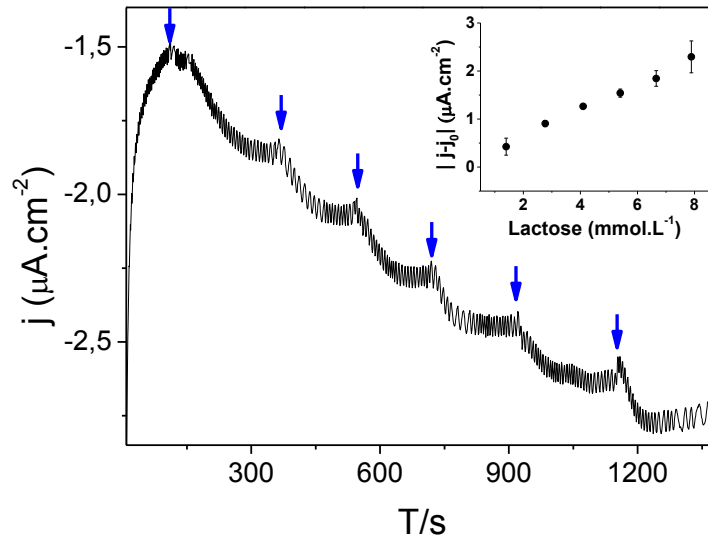


FIGURA 30 - Resposta amperométrica do biossensor ITO/PB/(PEI/β-Gal)₃₀. A cada titulação de lactose há uma variação na densidade de corrente. O inset ilustra a curva analítica da variação da corrente em função da concentração de lactose

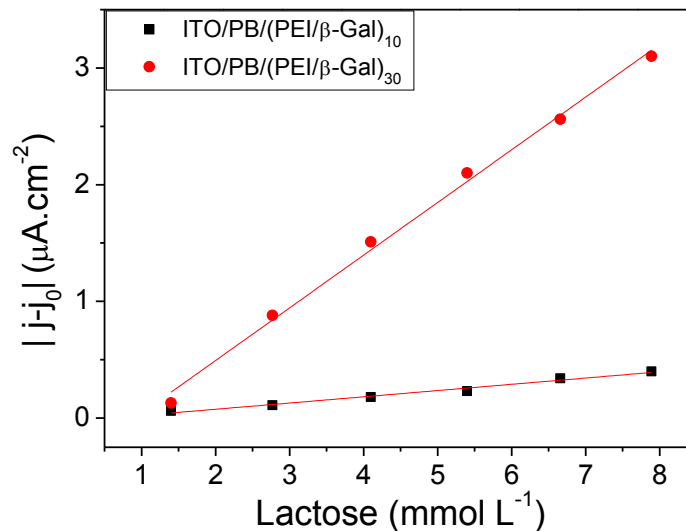


FIGURA 31 – Curvas analíticas mostrando a variação de corrente dos biossensores ITO/PB/(PEI/β-Gal)₁₀ e ITO/PB/(PEI/β-Gal)₃₀ em função da concentração da lactose

Testou-se também um filme de 30 bicamadas com o polieletrólito PAH, ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₃₀, a fim de avaliar seu comportamento frente aos resultados já obtidos. A amperometria foi realizada com as mesmas condições anteriores, com 7 mL de tampão na cela eletroquímica + 500 μ L de solução de GOx (0,5 mg.mL⁻¹). Durante as titulações de lactose (0,1 mol.L⁻¹), sob agitação magnética, não houve variação na corrente, o que indica que o PAH não está sendo eficiente nesta configuração de biossensor e que neste caso o PEI é a melhor opção. Outros autores já compararam esses dois polieletrólitos em sistemas diferentes. Um biossensor para colesterol foi construído com ambos os polieletrólitos, e apresentou uma maior eficiência com o uso do PEI (SOUZA; MORAES; FERREIRA, 2013), em outro trabalho a enzima urease foi imobilizada através da LbL em microcanais de silício, com a combinação de vários polieletrólitos, entre eles o PVS, PAH, PDDA - Poli(cloreto de dialidimentilamônio) e PSS - Poli (estireno sulfonado de sódio), e o melhor resultado foi obtido com a combinação de PEI/PSS (FORREST; ELMORE; PALMER, 2005). Isso pode ocorrer para testes eletroquímicos pela estrutura ramificada do PEI, o que foi observado em um trabalho onde foram estudados vários polieletrólitos, comparando a espessura e a permeabilidade dos filmes multicamadas, usando moléculas eletroativas com diferentes tamanhos, através da voltametria cíclica, e os filmes de PEI não alteraram a permeabilidade dos elementos eletroativos, provavelmente pela sua característica de formar um filme mais esponjoso (ELŻBIECIAK-WODKA; WARSZYŃSKI, 2013). O fato de o PEI formar mais poros no filme faz com que a enzima seja menos pressionada e forme ligações com o polieletrólito em apenas algumas partes de si mesma, dessa forma sua estrutura se mantém mais ordenada, tendo uma menor porcentagem de deformação e conserva com mais facilidade sua atividade catalítica.

4.2.4. Filmes de β -Gal e GOx

Os filmes contendo a GOx imobilizadas não deram variação na corrente conforme as alíquotas de lactose foram adicionadas à célula. Isto pode ter ocorrido pelos filmes serem feitos com poucas bicamadas de cada enzima, logo que o melhor resultado foi com filme de 30 bicamadas de β -Gal e a GOx em solução, pode também ter acontecido de uma enzima interferir no funcionamento da outra, ou mesmo pela estrutura do filme que de alguma forma não contribuiu com o bom funcionamento do biossensor. Fato semelhante foi observado por Oliveira, R. F., 2010, o qual trabalhou com as enzimas GOx e Invertase (INV) em diversas

configurações para a detecção de sacarose e glicose e obteve sucesso para a detecção de sacarose apenas com a INV imobilizada e a GOx em solução eletrolítica.

4.2.5. Limite de detecção

O limite de detecção obtido para o filme ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₃₀ foi 1,13 mmol.L⁻¹ enquanto para o filme ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₁₀ foi 4,22 mmol.L⁻¹ e o ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₁₀ foi 2,99 mmol.L⁻¹. Outros biossensores relatados na literatura podem ser visualizados na tabela 3 para comparação, com seus respectivos métodos e limites de detecção. É possível verificar que o biossensor desenvolvido neste trabalho possui um limite de detecção maior que os demais, porém diferentes métodos e materiais foram empregados em cada trabalho, sendo comum resultados diferentes. Outro fator importante é saber qual a aplicação desejada, pois alguns alimentos possuem alta concentração de lactose, o leite, por exemplo, possui uma concentração aproximada de 100 mmol.L⁻¹ (AMMAM, 2010).

TABELA 3 – Biossensores para detecção de lactose

Authors	Method of detection	Limit of detection
Conzuelo et al., 2010	Amperometric	4.6 x 10 ⁻⁴ mmol L ⁻¹
Fornera; Yazawa; Walde, 2011	Spectrometric	0.1 mmol L ⁻¹
Göktuğ; Sezgintürk; Dinçkaya, 2005	Amperometric	0.58 mmol L ⁻¹

4.2.6. Teste de interferentes

A FIG. 31 apresenta uma análise dos possíveis interferentes que podem estar presente em amostras reais, onde foi titulado lactose (0,1 mol.L⁻¹) em azul, sacarose em vermelho (0,1 mol.L⁻¹), tampão acetato de sódio como foi utilizado em todas as soluções (0,05 mol.L⁻¹) em verde, ácido úrico (1 mmol.L⁻¹) em roxo, ácido ascórbico (0,1 mol.L⁻¹) em laranja e glicose (0,1 mol.L⁻¹) em verde piscina, para todos o volume de injeção foi o mesmo, 100 μ L. Como já era esperado, a glicose causou uma grande queda na corrente pois a GOx estava livre na cela eletrolítica, portanto, para melhor visualização foi necessário ampliar o gráfico à direita. Nele é possível notar o decréscimo na corrente pela adição da lactose, e que com a sacarose, tampão e ácido úrico não há variação considerável. Com a adição do ácido ascórbico há uma

elevação da corrente, como já descrito na literatura, a qual pode ser facilmente diferenciada (MORAES, 2008). Quanto a interferência da glicose, o problema poderia ser contornado fazendo-se uma medida apenas da glicose antes da lactose, com um biossensor de glicose acoplado ao da lactose (CONZUELO et al., 2010).

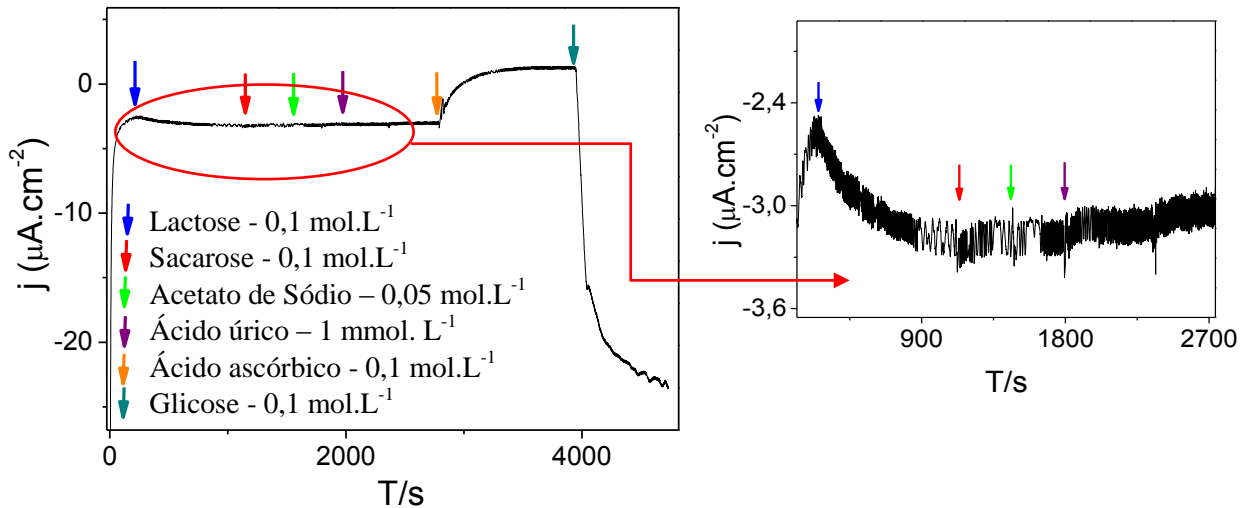


FIGURA 32 – Teste de interferentes como sacarose, tampão, ácido úrico, ácido ascórbico e glicose.

4.2.7. Teste de estabilidade

O filme ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₃₀ foi armazenado em geladeira, em aproximadamente 4°C, em microtubo ou bécker com tampão acetato de sódio, pH 5,5. As medidas foram feitas em dias alternados e em 6 medidas mesmo com a variação de sensibilidade os biossensores apresentaram resultado, como está indicado na FIG. 32, porém a partir da sétima medida conforme a lactose era titulada a corrente não estabilizava mais.

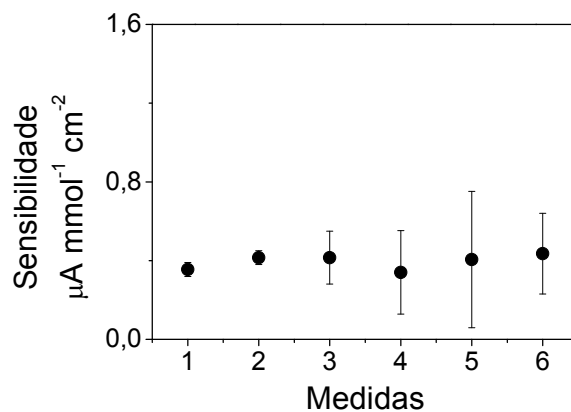


FIGURA 33 – Estabilidade do biossensor ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₃₀ estocado em tampão acetato de sódio por 12 dias por 4°C, medido em dias alternados.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS/ CONCLUSÕES

A imobilização da β -Gal foi realizada de forma satisfatória pela técnica LbL como pôde ser observado nas espectroscopias de UV-vis e fluorescência, para ambos os polieletrólitos, com a banda de absorção e emissão em concordância com os espectros da enzima pura e com a deposição de material de forma crescente entre as bicamadas. Portanto as condições de crescimento para esses filmes puderam ser empregadas na fabricação dos eletrodos modificados para os testes amperométricos.

As configurações de filmes ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₁₀ e ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₁₀ foram testadas por amperometria e responderam às titulações de lactose em uma amostra padrão. A sensibilidade alcançada por ambos biossensores foram valores próximos e abaixo da expectativa, isso pode ter ocorrido devido à quantidade de enzima imobilizada ser pequena. Então eletrodos foram construídos com uma maior quantidade de bicamadas e o ITO/PB/(PEI/ β -Gal)₃₀ mostrou um aumento na sensibilidade e proporcionalmente alcançou um menor limite de detecção, em relação aos eletrodos de dez bicamadas. Por outro lado o ITO/PB/(PAH/ β -Gal)₃₀ não respondeu às titulações de lactose, o que pode ser atribuído às estruturas dos polímeros, sendo o PEI ramificado é possível que haja uma maior permeabilidade dos elementos do sistema através do filme até alcançar o ITO. Os filmes contendo a GOx imobilizada juntamente com a β -Gal também não funcionaram, possivelmente pela própria estrutura do filme.

Vários elementos foram testados como possíveis interferentes como ácido úrico, sacarose, tampão acetato de sódio, ácido ascórbico e glicose, sendo que esses dois últimos interferiram na resposta, como já era esperado. Porém, isso pode ser contornado com o uso de outro biossensor acoplado ao da lactose e detectar a glicose separadamente, enquanto que o ácido ascórbico pode ser facilmente diferenciado. Os testes amperométricos feitos sem a enzima (branco) garantiram que nenhum dos outros elementos presentes no sistema interfere no funcionamento do biossensor. A vida útil do biossensor foi em torno de 12 dias com medidas em dias intercalados.

Pelos espectros de FTIR várias bandas de grupamentos químicos foram identificadas e diferenciadas entre os polieletrólitos e a β -Gal de forma que as bandas resultantes do (PEI/PVS)₂/(PEI/ β -Gal)₁ comprovaram que realmente a imobilização da enzima está sendo realizada com sucesso. É provável que as interações entre a enzima e o filme sejam por

ligações secundárias e estas sejam fortes o suficiente para manter o filme. As medidas de SFG também identificaram diversas bandas características nas várias configurações de filmes testados, que indicaram certas interações ocorridas entre os elementos do filme, mas de forma geral revelam que a enzima continua adsorvida no filme mesmo estando em contato com meios líquidos e corrobora com os resultados do FTIR que a imobilização é forte o suficiente para suportar as medidas eletroquímicas e as aplicações de biossensoriamento.

Dessa forma foi possível o desenvolvimento de um biossensor que faz a detecção da lactose de forma eficiente e com uma técnica de fácil realização e baixo custo. Todos os experimentos realizados convergem para comprovar que a LbL foi adequada para a construção do biossensor e que a detecção da lactose pode ser feita e em níveis de concentração próximos à de amostras reais.

Perspectivas para trabalhos futuros

É possível prosseguir com os estudos e aprimorar o biossensor proposto neste trabalho através da construção do dispositivo com outras arquiteturas, contendo a GOx e a β -Gal imobilizadas, ou apenas a β -Gal, com a variedade do número de bicamadas e o teste de outros tipos de solução tampão. É possível também um aprofundamento nos estudos espectroscópicos de FTIR e SFG para compreender melhor a interação enzima/polímeros e enzima/lactose com a realização de medidas usando diferentes concentrações de soluções, outras estruturas de filme LbL, variar o substrato e usar outras combinações de polarização. Em trabalhos futuros esperamos dar continuidade aos testes em amostras reais de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ADOCHITEI, A.; DROCHIOIU, G. Rapid characterization of peptide secondary structure by FT-IR spectroscopy. **Rev Roum Chim**, v. 56, p. 783–791, 2011.
- AMIM, J. et al. Filmes ultrafinos de ésteres de celulose: preparo, caracterização e imobilização de proteínas. **Química Nova**, v. 33, p. 2064–2069, 2010.
- AMMAM, ET AL. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 148, n. 2, p. 583–589, 15 jul. 2010.
- ANDERSSON, M. M.; HATTI-KAUL, R. Protein stabilising effect of polyethyleneimine. **Journal of biotechnology**, v. 72, n. 1, p. 21–31, 1999.
- ARRONDO, J. R. L. et al. An infrared spectroscopic study of β -galactosidase structure in aqueous solutions. **Febs Letters**, v. 252, n. 1,2, p. 118–120, 1989.
- BANICA, F.-G. **Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and applications**. 1. ed. [s.l.] Editora Wiley, 2012.
- BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009.
- BOZA, Y.; GOMES, R. A. R.; BLUMER, P. Indústria de laticínios. **Revista Laticínios**, n. 104, p. 66, 2013.
- CALLISTER, W. D. **Ciência dos Materiais**. Rio de Janeiro: LTC, 2006.
- CHOI, J.; RUBNER, M. F. Influence of the Degree of Ionization on Weak Polyelectrolyte Multilayer Assembly. **Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 116–124, 2005.
- CLARK, A. H.; SAUNDERSON, D. H. P.; SUGGETT, A. Infrared and Laser-Raman Spectroscopic Studies of Thermally-Induced Globular Protein Gels. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 17, n. 3, p. 353–364, 1981.
- CLARK, L.; LYONS, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–&, 1962.
- COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. 3^o. ed. Boston: Academic Press, 1990.
- CONZUELO, F. et al. An Integrated Amperometric Biosensor for the Determination of Lactose in Milk and Dairy Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 12, p. 7141–7148, 2010.
- CRAVEN, ET AL. Purification, Composition, and Molecular Weight of the β -Galactosidase of Escherichia coli K12. **Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 6, p. 2468–2477, 1 jun. 1965.

CRESPILHO, F. N. et al. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. **Electrochemistry Communications**, v. 8, n. 10, p. 1665–1670, 2006.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1–2, p. 41–69, 2003.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.

DRUZIAN, J. I.; DOKI, C.; SCAMPARINI, A. R. Simultaneous determination of sugars and polyols in low calorie ice creams (diet/light) by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 279–284, 2005.

DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. 1. ed. [s.l.] ArtLiber, 2006.

ELŻBIECIAK-WODKA, M.; WARSZYŃSKI, P. Effect of deposition conditions on thickness and permeability of the multilayer films formed from natural polyelectrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 104, p. 348–357, 2013.

F. JAMES HOLLER; DOUGLAS A. SKOOG; STANLEY R. CROUCH. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. [s.l.] Bookman, 2009.

FAEDO, R. et al. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associadas à hidrólise enzimática. **Revista CIATEC-UPF**, v. 5, n. 1, p. 44–54, 2013.

FERREIRA, M. et al. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1611–1615, 2004.

FISCHER, J. et al. Optimization and modeling of lactose hydrolysis in a packed bed system using immobilized β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 178–186, 2013.

FORREST, S.; ELMORE, B. B.; PALMER, J. D. Activity and lifetime of urease immobilized using layer-by-layer nano self-assembly on silicon microchannels. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 85–91, 2005.

FreeStyle Lite® Blood Glucose Monitoring System. Disponível em: <<https://www.myfreestyle.com/products/freestyle-lite-overview.html>>. Acesso em: 9 jan. 2012.

GÄNZLE, M. G.; HAASE, G.; JELEN, P. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685–694, 2008.

GORNISCHEFF, A.; RINKEN, T. Calculating the output signal parameters of a lactose biosensing system from the transient phase response. **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences**, v. 60, n. 2, p. 136, 2011.

GRIESHABER, D. et al. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

G-TECH Free. Disponível em: <<http://www.glicomed.com.br/ver2/medidores-de-glicose/medidor-de-glicose-g-tech-free-1.html>>. Acesso em: 3 mar. 2014.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7. ed. [s.l.] GEN, 2008.

HELLER, A. Amperometric biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 50–54, 1996.

HEURISON DE SOUZA SILVA. **Estudo da adsorção de polieletrólitos e do ordenamento molecular de filmes poliméricos automontados através da óptica não-linear**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2010.

HOUTS, S. Lactose-Intolerance. **Food Technology**, v. 42, n. 3, p. 110–113, 1988.

HUBER, R. E.; GUPTA, M. N.; KHARE, S. K. The active site and mechanism of the β -galactosidase from *Escherichia coli*. **International journal of biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 309–318, 1994.

HUSAIN, Q. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 37–43, 2011.

ITAYA, K.; ATAKA, T.; TOSHIMA, S. Spectroelectrochemistry and Electrochemical Preparation Method of Prussian Blue Modified Electrodes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 18, p. 4767–4772, 1982.

JURADO, E. et al. A new kinetic model proposed for enzymatic hydrolysis of lactose by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 300–309, Agosto 2002.

KARYAKIN, A. A. et al. Prussian Blue Based Nanoelectrode Arrays for H₂O₂ Detection. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 2, p. 474–478, 2004.

KIM, H.; URBAN, M. W. Reactions of Thrombresistant Multilayered Thin Films on Poly(vinyl chloride) (PVC) Surfaces: A Spectroscopic Study. **Langmuir**, v. 14, n. 25, p. 7235–7244, 1998.

KUMAR, S. Infrared Difference Spectroscopy as a Physical Tool to Study Biomolecules. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 49, n. 3, p. 187–200, 2014.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. DNA-modified electrodes: a new alternative for electroanalysis. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 417–424, 1999.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. New York, N.Y.: Springer, 2006.

LAMBERT, A. G.; DAVIES, P. B.; NEIVANDT, D. J. Implementing the Theory of Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy: A Tutorial Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 40, n. 2, p. 103–145, 2005.

- LISBOA, C. R. et al. Synthesis of galactooligosaccharides from lactose using commercial β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 30–40, 2012.
- LIU, Y. et al. Molecular Orientation of Enzymes Attached to Surfaces through Defined Chemical Linkages at the Solid–Liquid Interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 34, p. 12660–12669, 2013.
- LOURENÇO, R. J. M.; SERRALHEIRO, M. L. M.; REBELO, M. J. F. Development of a new amperometric biosensor for lactose determination. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 21, n. 2, p. 171–177, 2003.
- LUPU, S. et al. Electrochemical preparation and characterisation of bilayer films composed by Prussian Blue and conducting polymer. **Electrochemistry Communications**, v. 4, n. 10, p. 753–758, 2002.
- MAHONEY, R. R. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p. 147–154, 1998.
- MAIA, F. C. B. **Estudo da interação interfacial entre polímeros semicondutores e metais ou surfactantes**. Tese de doutorado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2011.
- MAITANI, Y. et al. Polyethylenimine combined with liposomes and with decreased numbers of primary amine residues strongly enhanced therapeutic antiviral efficiency against herpes simplex virus type 2 in a mouse model. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 2, p. 139–146, 2013.
- MANAN, D. M. .; ABD KARIM, A.; KIT, W. . Lactose content of modified enzyme-treated “dadih”. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 439–443, 1999.
- MARIOTTI, M. P. et al. Hydrolysis of whey lactose by immobilized Galactosidase. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 6, p. 1233–1240, 2008.
- MARQUES, P. R. B. DE O.; YAMANAKA, H. Biosensors based on the enzymatic inhibition process. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, jan. 2008.
- MENDHAM, J; BARNES, J. D.; DENNEY, R. C. **Análise química quantitativa**. [s.l.] Editora LTC, 2002.
- MIAO, S.; ROOS, Y. H. Crystallization kinetics and x-ray diffraction of crystals formed in amorphous lactose, trehalose, and lactose/trehalose mixtures. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. E350–E358, 2005.
- MIRANDA, P. B. et al. **Thin solid films**. [s.l: s.n.].
- MOHY ELDIN, M. S. et al. Covalent immobilization of β -galactosidase onto amino-functionalized PVC microspheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 3, p. 1724–1735, 2012.
- MORAES, M. L. **Filme nanoestruturados de materiais de interesse biológico: ênfase na interação com modelos de membrana e aplicações em biossensores**. Tese de doutorado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2008.

MORAES, M. L. et al. Polymeric scaffolds for enhanced stability of melanin incorporated in liposomes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, n. 1, p. 268–274, 2010.

MUGA, A. et al. Structural and Functional Studies on the Interaction of Sodium Dodecyl Sulfate with β -Galactosidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 1, p. 451–457, 1993.

NETZER, L.; SAGIV, J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 3, p. 674–676, Fevereiro 1983.

NEU, M.; FISCHER, D.; KISSEL, T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives. **The Journal of Gene Medicine**, v. 7, n. 8, p. 992–1009, 2005.

OLIVEIRA, R. F. **Filmes nanoestruturados para detecção de glicose e sacarose em bebidas comerciais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Materiais)—Sorocaba: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2010.

OUYANG, W. et al. Preparation and Enantiospecific Binding of Chiral Polyelectrolyte Multilayers: An In-Situ ATR-FTIR Study. **Macromolecular Symposia**, v. 254, n. 1, p. 180–187, 2007.

PAPAYANNAKOS, N.; MARKAS, G.; KEKOS, D. Studies on modelling and simulation of lactose hydrolysis by free and immobilized β -galactosidase from *Aspergillus niger*. **The Chemical Engineering Journal**, v. 52, n. 1, p. B1–B12, Agosto 1993.

PETRI, L.; FERREIRA, M.; MORAES, M. L. Toward Preserving the Structure of the Antigenic Peptide p17-1 from the HIV-1 p17 Protein in Nanostructured Films. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 8, p. 6705–6709, 2011.

RECHNITZ, G. A. et al. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. **Analytica Chimica Acta**, v. 94, n. 2, p. 357–365, 1977.

RICCI, F. et al. Electroanalytical Study of Prussian Blue Modified Glassy Carbon Paste Electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 14, p. 1204–1211, 2003.

RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 3, p. 389–407, 2005.

SAADATI, S. et al. Layer by layer assembly of catalase and amine-terminated ionic liquid onto titanium nitride nanoparticles modified glassy carbon electrode: Study of direct voltammetry and bioelectrocatalytic activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 753, p. 32–41, 2012.

SANTOS, A. N. **Aspectos bioeletroquímicos de dendrímeros como nanoplataformas para aplicações clínicas**. Dissertação de mestrado—Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2008.

SCHOELER, B. et al. Polyelectrolyte Films Based on Polysaccharides of Different Conformations: Effects on Multilayer Structure and Mechanical Properties. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 2065–2071, 2006.

SHARMA, S. K. et al. Lactose biosensor based on Langmuir–Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 3, p. 651–657, 2004.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8-9, p. 1289–1307, 2007.

SHEN, Y. R. **Surface Science**, p. 551–562, 1994.

SIQUEIRA, B. K.; MERCÊS, E. S.; PINHO, C. P. Embrapa Gado de Leite: Panorama do Leite. n. 75, 2013.

SOUZA, T. T. L.; MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 178, p. 101–106, 2013.

STEFANI, G. P. et al. Presença de corantes e lactose em medicamentos: avaliação de 181 produtos. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, v. 32, n. 1, 2009.

TAMM, L. K.; TATULIAN, S. A. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 30, n. 04, p. 365–429, 1997.

TANG, Z. et al. Biomedical Applications of Layer-by-Layer Assembly: From Biomimetics to Tissue Engineering. **Advanced Materials**, v. 18, n. 24, p. 3203–3224, 2006.

TERAMOTO, M. et al. Effect of Addition of Polyethyleneimine on Thermal-Stability and Activity of Glucose-Dehydrogenase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 203–208, 1992.

THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999.

VINHOLA, L. et al. Self-assembled films from chitosan and poly (vinyl sulfonic acid) on Nafion® for direct methanol fuel cell. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 3, p. 531–537, 2012.

WALSH, G. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.] Wiley, 2001.

WANG, J. Nanomaterial-Based Amplified Transduction of Biomolecular Interactions. **Small**, v. 1, n. 11, p. 1036–1043, 2005.

WITT, M. A. **Obtenção e caracterização de filmes finos de multicamadas de polieletrólito depositados por Layer-by-Layer**. Tese de doutorado—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ZAIA, D. A.; ZAIA, C. T. B.; LICHTIG, J. Determination of total protein by spectrophotometry: advantages and disadvantages of proposed methods. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZOU, Y. et al. Amperometric glucose biosensor prepared with biocompatible material and carbon nanotube by layer-by-layer self-assembly technique. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 12, p. 4089–4095, 2008.