

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

TÂMERA TAIS DE LIMA SOUZA

**ESTUDO DA HEMOGLOBINA EM FILMES NANOESTRUTURADOS COMO
MEDIADOR ELETROQUÍMICO NA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES**

Sorocaba
2012

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

TÂMERA TAIS DE LIMA SOUZA

**ESTUDO DA HEMOGLOBINA EM FILMES NANOESTRUTURADOS COMO
MEDIADOR ELETROQUÍMICO NA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES**

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-orientador: Prof. Dr.(a) Marli L. de Moraes

Sorocaba
2012

Souza, Tâmera Tais de Lima
S729e Estudo da hemoglobina em filmes nanoestruturados como mediador
eletroquímico na aplicação em biossensores / Tâmera Tais de Lima Souza. –
– Sorocaba, 2012.
80 f. : il. (color.) ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, *Campus*
Sorocaba, 2012

Orientador: Marystela Ferreira

Banca examinadora: Antônio Riul, Margarida Juri Saeki

Bibliografia

1. Filmes automontados. 2. Biossensores. 3. Mediadores eletroquímicos. I.
Título. II. Sorocaba - Universidade Federal de São Carlos.

CDD 620.11

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS DE SOROCABA

Rodovia João Leme dos Santos, km 110
Bairro Itinga
Telefone: (15) 3229-5941
CEP 18052-780 - Sorocaba - São Paulo - Brasil
<http://www.ppgcm.ufscar.br/> : ppgcm@ufscar.br



ATA GERAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE TÂMERA TAÍS DE LIMA SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS, CURSO DE MESTRADO, DO CCTS - CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE – UFSCAR / CAMPUS SOROCABA.

Aos vinte e quatro dias do mês de fevereiro de 2012, às 14.00h na Sala de reuniões do CCTS – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, UFSCar - campus Sorocaba, reuni-se a Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros: Prof^ª. Dr^ª. Marystela Ferreira, da Universidade Federal de São Carlos/campus Sorocaba, Prof. Dr. Antonio Riul Jr., da Universidade Federal de São Carlos/campus Sorocaba, Prof^ª. Dr^ª. Margarida Juri Saeki, da Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho" - Unesp, campus Botucatu, sob a presidência do primeiro, para a Defesa de Dissertação de TÂMERA TAÍS DE LIMA SOUZA, intitulada: "Estudo da Hemoglobina em Filmes Nanoestruturados como Mediador Eletroquímico na Aplicação em Biossensores", de acordo com o regulamento do Programa, tendo o(a) candidato(a) recebido o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof^ª. Dr^ª. MARYSTELA FERREIRA


Prof. Dr. ANTONIO RIUL JR.


Prof^ª. Dr^ª. MARGARIDA JURI SAEKI



DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Nelson e Maria;
A minha irmã Tamires e ao
meu namorado Vagner pelo
incentivo e carinho constantes!*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por ter me ajudado a chegar até aqui e por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

À Profa. Dra. Marystela Ferreira pela orientação, amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada no meu trabalho.

À Profa. Dra. Marli Leite de Moraes, minha co-orientadora, pela dedicação em transferir seus conhecimentos enquanto esteve me orientando.

A CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

A toda minha família, em especial ao meu namorado, pelo amor, paciência e conselhos.

À todos os Professores que fazem parte do curso, por terem contribuído para minha formação.

À todos os meus amigos de sala.

Ao pessoal do Laboratório de Física.

A todos meus agradecimentos!

RESUMO

SOUZA, Tâmera Tais de Lima. *Estudo da hemoglobina em filmes nanoestruturados como mediador eletroquímico na aplicação em biossensores*. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2012.

A técnica de automontagem ou *layer-by-layer* é uma das mais utilizadas na imobilização de moléculas de interesse biológico. Essa técnica é empregada na fabricação de eletrodos modificados utilizados, como por exemplo, os biossensores. Um dos desafios no desenvolvimento de biossensores é eliminar interferentes de espécies eletroativas dentro do sistema de detecção. Esse problema pode ser solucionado com a introdução de mediadores de elétrons inorgânicos ou orgânicos. Nessa dissertação foram realizados estudos sistemáticos para a aplicação da hemoglobina atuando como mediadora de elétrons. A técnica de automontagem foi utilizada para a imobilização da hemoglobina, testada com dois polieletrólitos, obtendo filmes uniformes, mantendo sua atividade por 15 dias e sem respostas aos possíveis interferentes fosfolipídios. A automontagem também foi utilizada para imobilizar a enzima colesterol oxidase, alternada com diferentes polieletrólitos. Os filmes finos apresentaram um bom desempenho como biossensor amperométrico na detecção de colesterol em baixas concentrações tais como 10^{-5} M. O bom funcionamento do biossensor deve-se ao emprego da hemoglobina com mediador excluindo os efeitos dos interferentes ácido úrico e ácido ascórbico. Também foram realizados testes com amostras reais utilizando a gema de ovo obtendo bons resultados. A alta sensibilidade e seletividade dos biossensores foram atribuídas à natureza do filme automontado e à capacidade de reconhecimento das biomoléculas. Este estudo abre caminho para novas tecnologias de dispositivos para análises de alimentos.

Palavras-chave: Hemoglobina. Layer-by-Layer. Colesterol oxidase. Colesterol.

ABSTRACT

The layer-by-layer technique is one of the most used in the immobilization of molecules of biological interest, being largely employed in the fabrication of modified electrodes for biosensors. One of the main challenges in the development of biosensors is to eliminate interfering electroactive species within the detection system, therefore, this problem can be solved with the introduction of inorganic or organic electron mediators. Here, we carried out systematic studies for the application of hemoglobin acting as an electron mediator, and the self-assembly technique was used to immobilize haemoglobin in nanostructured thin films. The LbL films were tested with two polyelectrolytes, obtaining uniform films with activity kept during 15 days, without responses to possible interfering phospholipids. The layer-by-layer technique was also used to immobilize the enzyme cholesterol oxidase, alternated with different polyelectrolytes. The thin films showed a good performance as an amperometric biosensor for the detection of cholesterol at low concentrations (10^{-5} M), with the functioning of the biosensor attributed to the use of hemoglobin in mediating the effects of excluding interfering ascorbic acid and uric acid. Some tests were also performed in real samples using egg yolk, with good results obtained. The high sensitivity and selectivity of the biosensor have been attributed to the nanostructured thin nature of the films, despite recognition capability of the biomolecules used, with a strong potential to contribute for new device technologies for food analysis.

Keywords: Hemoglobin. Layer-by-Layer. Cholesterol oxidase. Cholesterol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –Representação esquemática do desenvolvimento da fabricação dos filmes automontados através da técnica LbL.....	14
Figura 2 –Representação idealizada de um filme automontado LbL.....	14
Figura 3 –Elementos e componentes de um típico biossensor.....	16
Figura 4 –Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico.....	18
Figura 5 –Representação esquemática do funcionamento de um sistema mediado.....	19
Figura 6 –Molécula de Hemoglobina e estrutura química do grupo heme da Hemoglobina.....	21
Figura 7 –Esquema de ligação do O ₂ com o grupo heme da Hemoglobina.....	21
Figura 8 –Reação de catálise da enzima colesterol oxidase com oxidação do colesterol na presença de oxigênio produzindo colesteno e H ₂ O ₂	23
Figura 9 –Representação esquemática da membrana celular.....	25
Figura 10 –Representação esquemática dos fosfolipídios, da estrutura e tipo dos lipossomos.....	26
Figura 11 –Molécula quaternária da Hemoglobina.....	27
Figura 12 –Estruturas dos polieletrólitos poli(etilenoimina) (PEI), cloreto de poli(alilamônio) (PAH) , poli(vinil sulfato) (PVS).....	28
Figura 13 - Estrutura terciária da enzima colesterol oxidase e estruturas químicas do analito colesterol.....	29
Figura 14 –Estruturas químicas dos fosfolipídios DPPC, DPPG, POPG e EggPG.....	29
Figura 15 –Representação esquemática da preparação do colesterol incorporado em lipossomos.....	32
Figura 16 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos; referência, trabalho e contra eletrodo.....	35
Figura 17 –Espectro de UV-visível da hemoglobina em tampão PBS.....	38
Figura 18 - Espectro de fluorescência (excitação em 280 e 410 nm) da hemoglobina em tampão PBS.....	38

Figura 19 –Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PAH/Hb (A) e o aumento do máximo de absorção (B) em 410 nm do filme PAH/Hb em função do número de bicamadas depositadas.....	40
Figura 20 - Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PEI/Hb (A) e o aumento do máximo de absorção (B) em 410 nm do filme PEI/Hb em função do número de bicamadas depositadas.....	40
Figura 21 –Espectros de fluorescência (excitação em 280) de 10 bicamadas do filme PAH/Hb (A) e espectro de emissão fluorescente (B) da Hb em solução e em filme automontado PEI/Hb 10 bicamadas.....	42
Figura 22 –Espectros de fluorescência (excitação em 280) de 10 bicamadas do filme PEI/Hb (A) e espectro de emissão fluorescente (B) da Hb em solução e em filme automontado PEI/Hb 10 bicamadas.....	43
Figura 23 –Voltametria cíclica do filme PEI/Hb10 bicamadas para a detecção do H ₂ O ₂	45
Figura 24 –Representação esquemática da estrutura idealizada do filme PAH/Hb e PEI/Hb	46
Figura 25 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/(PAH/Hb) ₂ (A), ITO/(PAH/Hb) ₅ (B) e ITO/(PAH/Hb) ₁₀ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL H ₂ O ₂ 0,001 mol/L.....	47
Figura 26 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/(PEI/Hb) ₂ (A), ITO/(PEI/Hb) ₅ (B) e ITO/(PEI/Hb) ₁₀ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL H ₂ O ₂ 0, 001 mol/L.....	49
Figura 27 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/(PEI/Hb) ₂ (A), ITO/(PEI/Hb) ₅ (B) e ITO/(PEI/Hb) ₁₀ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL H ₂ O ₂ 0, 001 mol/L.....	51
Figura 28 - Estabilidade dos biossensores PAH/Hb (A) e PEI/Hb (B) 10 bicamadas estocado em tampão acetato de sódio a 4°C.....	52
Figura 29 –Estrutura idealizada para os filme (PEI/Hb) ₂	53
Figura 30 –Espectros de absorção (A) e emissão (B) da COX livre em tampão tris.....	54
Figura 31 –Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PAH/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 280 nm do filme PAH/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).....	55
Figura 32 –Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PEI/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 280 nm do filme PEI/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).....	56

Figura 33 –Espectros de fluorescência de 10 bicamadas do filme PAH/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 330 nm do filme PAH/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).....	57
Figura 34 –Espectros de fluorescência de 10 bicamadas do filme PEI/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 330 nm do filme PEI/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).....	57
Figura 35 - Representação esquemática do filmes PAH ou PEI/COX sobre ITO modificado com Hb (A). Mecanismo envolvido na detecção do colesterol com geração de H ₂ O ₂ (B).....	59
Figura 36 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PAH/COX) ₅ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL de ácido úrico 0,01 mmol/L.....	60
Figura 37 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PEI/COX) ₅ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL de ácido úrico 0,01 mmol/L.....	61
Figura 38 –Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de colesterol dos biossensores ITO/HB/(PAH/COX) ₅ e ITO/HB/(PEI/COX) ₅	62
Figura 39 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PAH/COX) ₅ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL de ácido úrico 0,01 mmol/L.....	63
Figura 40 –Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PEI/COX) ₅ . Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 µL de ácido úrico 0,01 mmol/L.....	63
Figura 41 –Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de ácido úrico dos biossensores ITO/HB/(PAH/COX) ₅ e ITO/HB/(PEI/COX) ₅	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A Absorbância

CH Quitosana

COX Colesterol Oxidase

DNA Acido desoxirribonucleico

DPPC Dipalmitoil fosfatidil Colina

DPPG Dipalmitoil fosfatidil Glicerol

EggPG Glicerol de ovo de galinha

GOD Glicose Oxidase

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

Hb Hemoglobina

HCl Acido Clorídrico

ITO Óxido de Índio dopado com Estanho

KH₂PO₄ Fosfato de Potássio monobásico

LB Langmuir-Blodgett

LbL Layer-by-Layer

LUV Vesículas Unilamelares Grandes (*Large unilamellar vesicles*)

MLV Vesículas Multilamelares Grande (*Multilamellar large vesicles*)

Na₂HPO₄ Fosfato de Sódio dibásico

NaCl Cloreto de Sódio

NH₄OH Hidróxido de Amônia

O₂ Oxigênio

PAH Cloreto de poli(alilamônio)

PB Azul da Prússia (*Prussian Blue*)

PBS Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PDDA Poli(dialildimetil amônio)

PEI Poli(etileno imina)

PLL Poli-L-lisina

POPG Palmitoil Fosfatidil Glicerol

PPy-PVS Polivinil sulfato

PVS Poli(vinil sulfonato de sódio)

SAM Automontagem Monocamada

SCE Eletrodo Saturado de Calomelano

SUV Vesículas Unilamelares Pequenas (*Small unilamellar vesicles*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1. FILMES NANOESTRUTURADOS.....	13
2.1.2. Filme Automontado camada por camada (<i>Layer-by-layerLbL</i>).....	13
2.1.2. Filme Automontado de materiais biológicos.....	15
2.2. BIOSENSORES.....	16
2.2.1 Biossensores Eletroquímicos	17
2.3. MEDIADOR ELETROQUÍMICO.....	19
2.3.1 Hemoglobina.....	20
2.4. ENZIMA COLESTEROL OXIDASE.....	23
2.5. BIOSENSORES DE COLESTEROL.....	24
2.6. COLESTEROL.....	24
3 METODOLOGIA/MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAIS.....	27
3.1.1. Hemoglobina.....	27
3.1.2. Polieletrólitos.....	27
3.1.3. Enzima e Analito.....	28

3.1.4. Lipossomos.....	29
3.1.5. Substratos.....	30
3.2. SOLUÇÕES.....	30
3.2.1. Tampão PBS	30
3.2.2. Tampão Tris-HCl.....	30
3.2.3. Polieletrólitos	31
3.2.4. Hemoglobina.....	31
3.2.5. Enzima e Analito.....	31
3.3. MÉTODOS.....	31
3.3.1. Preparação e incorporação do colesterol em lipossomos.....	31
3.3.2. Preparação dos filmes camada por camada (LbL).....	32
3.3.2.1. Filmes PEI/Hb e PAH/Hb.....	33
3.3.2.2. Filmes PEI/COX e PAH/COX.....	33
3.3.3. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV-vis)	33
3.3.4. Espectroscopia de Fluorescência Molecular.....	34
3.3.5. Medidas Eletroquímicas.....	35

3.3.5.1. Medidas Amperométricas.....	36
3.3.5.2. Voltametria Cíclica (VC).....	36
4 RESULTADOS E DISCUÇÕES.....	37
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES AUTOMONTADOS CONTENDO HEMOGLOBINA.....	37
4.1.1. Filmes PAH/Hb e PEI/Hb caracterizados por UV-vísivel.....	39
4.1.2. Filmes PAH/Hb e PEI/Hb caracterizados por Fluorescência.....	41
4.1.3. Medidas de Voltametria Cíclica.....	44
4.1.4. Filmes Automontados por Amperométria.....	45
4.1.4.1. Filmes PAH/Hb caracterizados por Amperometria.....	46
4.1.4.2. Filmes PEI/Hb caracterizados por Amperometria.....	48
4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES AUTOMONTADOS DA ENZIMA COLESTEROL OXIDASE.....	53
4.2.1. Filmes PAH/COX e PEI/COX caracterizados por UV-vísivel.....	54
4.2.2. Filmes PAH/COX e PEI/COX caracterizados por Fluorescência.....	56
4.2.3. Filmes automontados por Amperometria.....	58
5 CONCLUSÕES.....	65

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos os diagnósticos de doenças relacionadas ao excesso de colesterol no soro humano, vem despertando interesse nos pesquisadores para estudarem dispositivos capazes de detectar o colesterol, isso pelo fato de que a doença quando detectada inicialmente, pode ser controlada com medicamentos e dietas sem maiores riscos ao paciente¹. Esses dispositivos de diagnósticos também chamados de biossensores vêm sendo estudados e alguns desses já estão em uso. Tais sensores têm sido utilizados em diferentes aplicações, incluindo os cuidados de saúde, alimentação e monitoramento ambiental². Os dispositivos funcionalizados têm origem como princípio de detecção a combinação de processos físicos e químicos, como transferência de energia ou elétrons e transformações químicas³.

A fabricação desses sensores depende principalmente da montagem de filmes ultrafinos⁴. Os métodos mais utilizados para a construção de filmes ultrafinos de materiais orgânicos e biológicos são as técnicas de: Langmuir-Blodgett (LB)⁵, monocamadas automontadas (*self-assembly monolayer*, SAM)^{6,7} e automontagem (*Layer-by-Layer*, LbL)^{8,9}.

Neste trabalho a técnica LbL foi escolhida devido a sua praticidade, versatilidade e baixo custo. A técnica de automontagem foi desenvolvida por Decher e colaboradores⁸ e baseia-se, principalmente, na atração eletrostática entre moléculas de cargas opostas. Esta técnica não depende de instrumentação sofisticada, bastam alguns béqueres, pinça e utilizam moléculas geralmente solúveis em água. Os filmes fabricados por esse método têm maior quantidade de moléculas adsorvidas no substrato e maior estabilidade. Maiores detalhes da técnica estão descritos no item 2.1.1.

Além do processo de fabricação, para um bom funcionamento do sensor é necessário o uso de mais de um molécula no sistema para combinar propriedade desejáveis, fornecendo maior estabilidade ou melhorar a montagem das biomoléculas, bem como para viabilizar a aplicação do sistema como dispositivos eletrônicos^{10,11,12}. Além disso, dispositivos exigem controle na organização e orientação molecular em escala de moléculas, geralmente nanométrica. Esta é mais uma vantagem da técnica de automontagem, pois em condições ideais permite o controle da montagem de nanoestruturas com diferentes compostos.

Os filmes ultrafinos podem ser caracterizados por diversas técnicas experimentais, tais como espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV-vis) e espectroscopia de fluorescência. A identificação das interações químicas dos componentes dos filmes automontados pode ser feita por espectroscopia vibracional, ou por alterações nas propriedades elétricas e eletroquímicas desses filmes. Estas últimas técnicas, em particular, também podem ser aplicadas para testar o potencial dos filmes ultrafinos como sensores¹³.

Em um sistema de detecção o analito pode ser determinado indiretamente pela detecção eletroquímica com base no monitoramento do consumo de oxigênio ou a taxa de produção de peróxido de hidrogênio por uma reação enzimática¹⁴. No entanto, o potencial necessário para a oxidação do peróxido de hidrogênio pode levar à interferências causadas por outras substâncias eletroativas. Para resolver esse problema, o uso de mediadores vem sendo empregado para eliminar interferentes que sofram oxidação ou redução nos mesmos intervalos de potenciais que a substância de interesse, ou seja, na detecção do analito¹⁵.

Uma gama de mediadores de elétrons tem sido empregada em sensores e biossensores para detectar O₂ e H₂O₂. Entre os vários mediadores, os hexacianoferratos, em particular o Azul da Prússia (*Prussian Blue*, PB) - hexacianoferrato (II) férrico¹⁶- e as proteínas, peroxidases¹⁷ e mais recentemente a hemoglobina¹⁸, têm sido usados para preparar eletrodos modificados a fim de minimizar efeitos de interferentes. Em virtude do interesse em desenvolver novos tipos de mediadores, pesquisadores têm estudado proteínas redox, a fim de conseguir superar métodos já existentes de transferência direta de elétrons na aplicação em biossensores^{19,20}. Entre as várias proteínas, a hemoglobina (Hb) é um modelo ideal de mediador de elétrons através do grupo heme²¹ sendo mais estável e de menor custo em comparação com outros mediadores. O uso da Hb como mediador vem sendo amplamente empregado em sensores para detecção de compostos fenólicos²², nitratos²², peróxido de hidrogênio²³ e colesterol²⁴, entre outros.

Neste trabalho foram estudados filmes nanoestruturados de materiais de interesse biológico, usando a técnica de automontagem para imobilização da proteína Hb. O objetivo da imobilização da Hb é utilizá-la como mediador de elétrons nas medidas eletroquímicas como a voltametria cíclica (VC) e amperometria. A segunda etapa consiste na fabricação do biossensor de colesterol imobilizando através da técnica LbL a enzima colesterol oxidase (COX). Para isso os lipossomos foram utilizados para incorporar o colesterol utilizado como analito nas medidas eletroquímicas, uma vez que o analito não é

solúvel em água. Posteriormente esse biossensor será utilizado para detecção do colesterol em gema de ovo de galinha.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. FILMES NANOESTRUTURADOS

Técnicas de fabricação de filmes ultrafinos vêm sendo amplamente explorada, devido ao forte interesse em se obter estruturas organizadas, com controle de espessura e aproveitando as propriedades em escala molecular. Dois dos métodos mais utilizados para a fabricação desses filmes são de Langmuir-Blodgett (LB)²⁵ e de automontagem LbL do inglês ‘*Layer-by-Layer*’²⁶, por propiciar filmes finos com moléculas extremamente organizadas em uma arquitetura completamente ordenada²⁷, permitindo, assim controlar propriedades finais dos filmes e também a variação da espessura das camadas. O fortalecimento para o desenvolvimento dessas técnicas deve-se também a sua aplicação em diferentes áreas, pois envolvem profissionais das áreas de química, física, biologia e ciência e engenharia de materiais.

2.1.1. Filmes Automontados LbL

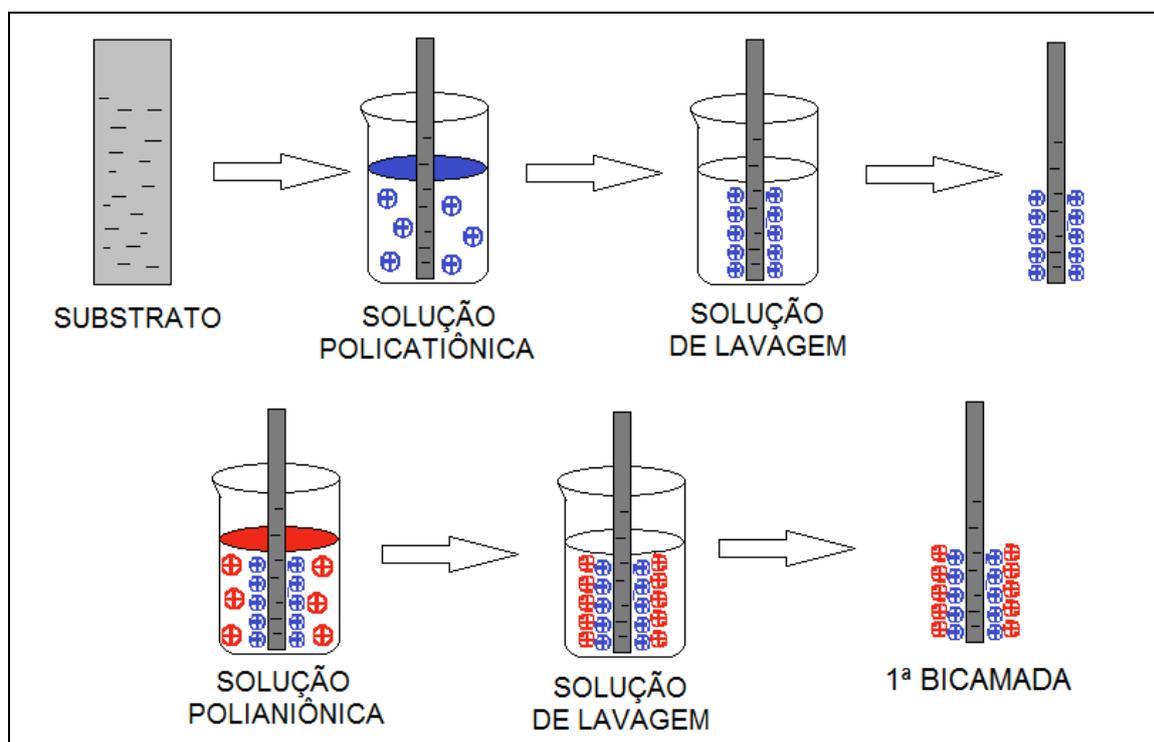
O princípio dessa técnica de automontagem primeiramente foi proposto por Iler e colaboradores²⁸, na década de 1960, mas nessa época não houve grande interesse no desenvolvimento da técnica de automontagem. No início da década de 1980, Sagiv e colaboradores^{29,30} desenvolveram a técnica de automontagem por adsorção química através de ligações covalentes, porém, a desvantagem atribuída a essa técnica deve-se a necessidade de síntese de moléculas com funcionalidade específica para a construção dos filmes automontados.

Partindo do princípio da técnica desenvolvida por Iler, Decher e seus colaboradores desenvolveram a técnica de automontagem⁸. Esta técnica é baseada na interação física, ou seja, interações eletrostáticas entre moléculas carregadas positivamente e negativamente. Ao contrário da técnica desenvolvida por Sagiv não são necessárias nenhuma ligação química ou covalente para a construção dos filmes finos.

O mecanismo de fabricação do filme automontado através da interação eletrostática entre um polication e um poliânion, está representado na FIG. 1. O polieletrólito catiônico é adsorvido na superfície de um substrato sólido (substrato) carregado negativamente, após essa absorção do polication as cargas da superfície negativas se ligam

eletrostaticamente com o polieletrólito catiônico. Em seguida, este substrato é imerso em solução contendo o poliânion que gera uma nova rede de cargas positivas na superfície. Como resultado, obtém-se uma bicamada de polieletrólito sobre um substrato³¹. O desenvolvimento desses filmes depende da neutralização da carga precedente pela adsorção de uma dada camada e subsequente formação de uma nova, oposta e suficientemente carregada. Este processo pode ser repetido várias vezes, possibilitando a fabricação de filmes contendo multicamadas com estruturas e espessuras desejadas. Como a espessura de uma bicamada de polieletrólito é geralmente de cerca de 1 nm⁸, a técnica de automontagem permite controle da espessura do filme em escala nanométrica.

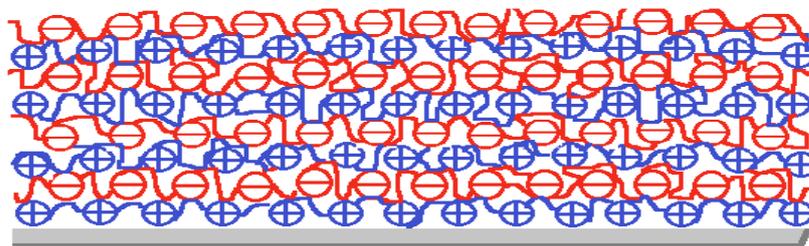
FIGURA 1 – Representação esquemática da fabricação dos filmes automontados através da técnica LbL.



Fonte: Figura adaptada de Decher⁸.

Após várias bicamadas formadas observa-se, conforme FIG. 2, as camadas de polications e poliânions adsorvidas sobre o substrato sólido.

FIGURA 2 – Representação idealizada de um filme automontado LbL.



Fonte: Figura adaptada de Decher⁸.

A principal função dos filmes ultrafinos é serem altamente permeáveis para pequenas moléculas e íons, tornando um sistema apropriado para funções baseadas na interação entre biomoléculas imobilizadas e substâncias livres em solução, sistema utilizado no desenvolvimento de biossensores³.

2.1.2. Filme Automontado de materiais biológicos

O uso de biomoléculas para a fabricação de filmes nanoestruturados vem sendo amplamente pesquisado, devido à possibilidade de se utilizar esses filmes em biotecnologia e biossensores³². Vários materiais têm sido utilizados para fabricação de filmes automontados, como por exemplo: proteínas, enzimas, sistemas anticorpo-antígeno, peptídeos e nucleotídeos³³, mantendo sua atividade biológica³². Isso só é possível porque, proteínas solúveis em água possuem excesso de cargas na superfície e a desnaturação de biomoléculas tende a diminuir durante o processo de imobilização, que pode ser realizado em condições ótimas de pH e temperatura⁴. Esses filmes automontados com biomoléculas são bastante permeáveis facilitando interações com pequenas moléculas, assim sendo um ótimo sistema para algumas funções como, por exemplo, biossensor, onde ocorrem interações entre a biomolécula imobilizada e substâncias livres em solução³.

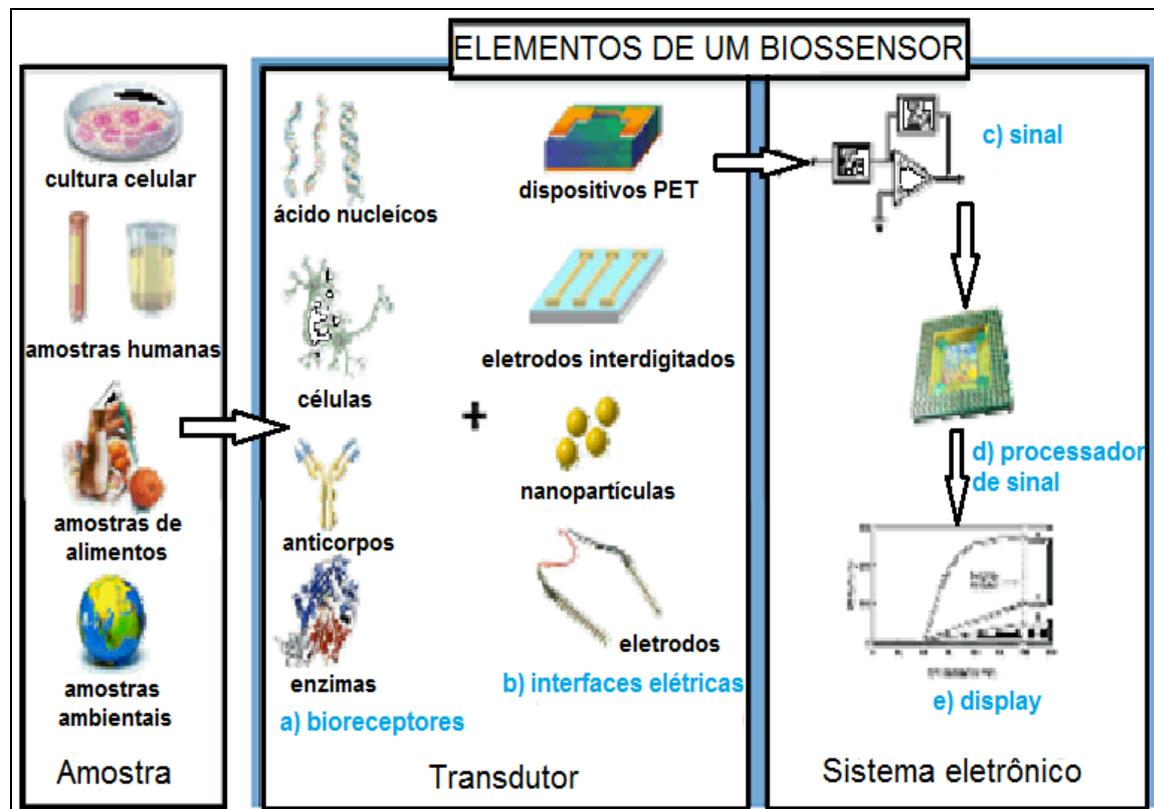
Os primeiros pesquisadores que utilizaram filmes nanoestruturados de biomoléculas foram Sukhorukov e colaboradores³⁴ e Montrel e colaboradores³⁵. Nessa linha, pesquisadores utilizaram o ácido desoxirribonucléico (DNA) alternado com os polieletrólitos poli(etileno imina) (PEI), poli-L-lisina (PLL) e cloreto de poli(alilamônio) (PAH) para a fabricação dos filmes. Os autores investigaram a estrutura do DNA imobilizado nesses filmes, através de espectroscopia vibracional e eletrônica. Mostraram também que a força atuante nos filmes era eletrostáticas entre os grupos fosfatos

carregados negativamente do DNA e polication carregado positivamente, mantendo a bioatividade do DNA³⁶.

2.2. BIOSSENSORES

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo para detecção de um analito que combina um componente biológico com um componente detector físico-químico. Esses dispositivos são análogos funcionais que são baseados no acoplamento direto de um composto biologicamente ativo imobilizado, com um transdutor que gera um sinal proporcional a concentração do analito. A principal função de um transdutor é converter a alteração físico-química resultante da interação do material biologicamente ativo com o analito em um sinal elétrico ou óptico³⁸. Esses biossensores podem ser aplicados em diversas amostras, tais como fluidos humanos (sangue, urina e saliva), amostras de alimentos, culturas celulares e em amostras ambientais (solo, ar, e água) (FIG. 3).

FIGURA 3 – Elementos e componentes de um típico biossensor.



Fonte: Figura adaptada de Grieshaber e colaboradores³⁸.

Nos dias atuais diversos tipos de biossensores são encontrados nos laboratórios do mundo todo, incluindo biossensores utilizados para auxílio em diagnósticos de doenças.

Um dos biossensores mais popular é de glicose³⁹ que utiliza filmes nanoestruturados contendo a enzima glicose oxidase (GOD). Onda e colaboradores³⁷ estudaram a estabilidade e atividade da enzima GOD imobilizada juntamente com polieletrólito poli(etileno imina) (PEI) e de poli(dialildimetil amônio) (PDDA). Os pesquisadores utilizaram uma série de reações enzimáticas e a atividade da GOD foi monitorada por mudanças espectrais de absorção. Os resultados indicaram que apenas 20% da atividade da GOD diminuía com sua imobilização, não causando alta desnaturação da enzima e sua atividade foi mantida por 14 semanas estocada em tampão a 4°C. Após esse trabalho inúmeras pesquisas vêm sendo realizada utilizando proteínas e enzimas.

O primeiro sensor relatado na história foi realizado por Clark em 1955/56⁴⁰. Ele construiu um eletrodo capaz de detectar oxigênio. Posteriormente, por volta de 1962⁴¹, partindo do princípio do eletrodo de oxigênio, foram realizadas algumas modificações no mesmo, chegando ao primeiro sensor de glicose, utilizando sensores eletroquímicos com um transdutor baseado em enzima. Em 1975 a Yelow Spring Instrument Company obteve e desenvolveu essa tecnologia levando ao lançamento comercial do primeiro biossensor de glicose⁴². Desde então, várias formas de biossensores de glicose foram e vem sendo desenvolvidas⁴³, logo a base para o desenvolvimento de muitas outras tecnologias de dispositivos⁴⁴.

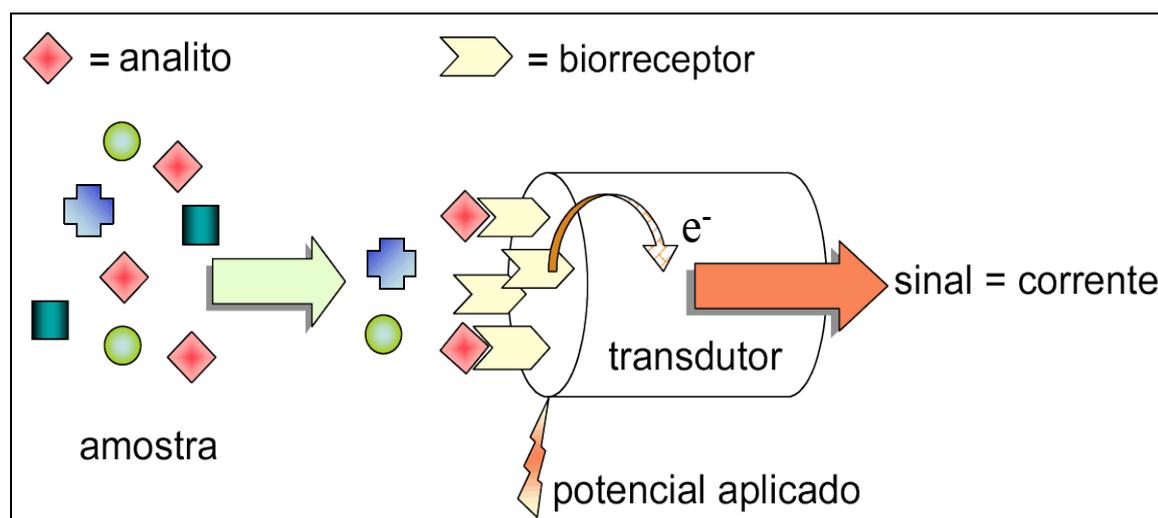
Baseado no tipo de técnica utilizada para traduzir o processo bioquímico em sinal analógico, os biossensores podem ser classificados como: sensores óticos⁴⁵, piezelétricos⁴⁶, calorimétricos⁴⁷, eletroquímicos³⁸ e elétricos⁴⁸. Os biossensores eletroquímicos têm sido os mais utilizados, uma vez que eles são rápidos, fáceis de manusear e de baixo custo. Estes foram desenvolvidos para superar a maior parte das desvantagens, que limitam o uso de outros tipos de biossensores, como por exemplo, nos biossensores óticos que apesar de serem muito sensíveis, não podem ser operados em meio de comunicação turva.

2.2.1. Biossensores Eletroquímicos

Biossensor eletroquímico é a classe mais utilizada entre os diferentes tipos de biossensores. Estes são baseados na catálise enzimática de uma reação que produz ou consome elétrons, por exemplo, as enzimas oxido-redutase⁴⁹. Os sistemas de sensoriamento contem três eletrodos, sendo eles: (a) um eletrodo de referência, que mantém o potencial constante, (b) um contra eletrodo e (c) um eletrodo de trabalho, onde ocorre a reação enzimática. O composto a ser analisado (analito) reage na superfície do eletrodo de trabalho e os íons produzidos geram sinal elétrico e mensurável.

Dependendo dos métodos eletroquímicos a serem utilizados no sistema de detecção, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como biossensores amperométricos e potenciométricos. Os biossensores amperométricos baseiam-se na medida de corrente em função do tempo, quando o eletrodo é mantido a um potencial apropriado e constante, enquanto o potenciométrico, é a medida de potencial em uma corrente constante⁴⁸. A mudança da corrente e ou potencial registrada é proporcional à quantidade de espécies eletro-reduzidas/oxidadas, ou seja, proporcional à concentração do analito. A FIG. 4 representa o princípio de funcionamento de um típico biossensor amperométrico.

FIGURA 4 – Representação esquemática do funcionamento de um biossensor amperométrico.



Fonte: Figura adaptada de Belluzo e colaboradores⁵⁰.

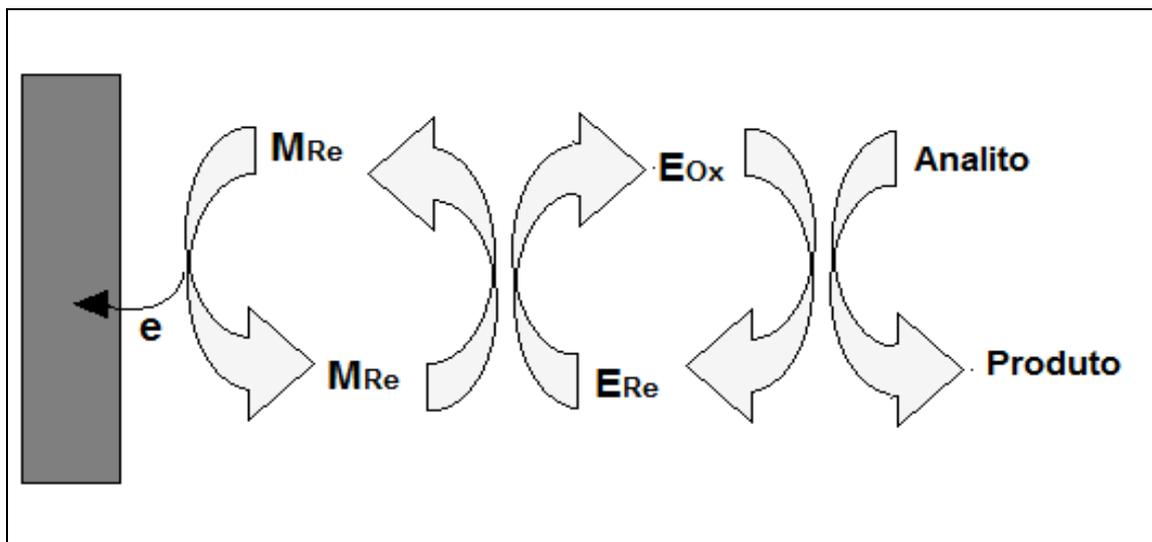
As moléculas de O_2 e H_2O_2 são as espécies eletroativas, que quando em contato com o eletrodo de trabalho em altos potenciais oxidam e/ou reduzem espontaneamente, gerando um sinal elétrico. Usando este princípio, pesquisadores constroem eletrodos com enzimas

oxidases que geram H_2O_2 detectado em altos potenciais⁵¹. Embora os biossensores amperométricos tenham a vantagem de ser altamente sensíveis, apresentarem resposta rápida e serem de baixo custo, em comparação aos biossensores ópticos, calorimétricos e piezelétricos, esses biossensores estão sujeitos a interferência de outras espécies eletroativas, tais como ácido úrico e ácido ascórbico, que também são oxidados em altos potenciais. Uma alternativa para eliminar os efeitos desses interferentes é o uso de mediadores de elétrons com o intuito de diminuir o potencial de oxidação/redução do analito.

2.3. MEDIADOR ELETROQUÍMICO

Os biossensores amperométricos podem ser divididos em três classes principais ou gerações: os que não fazem uso de mediadores (primeira geração), aqueles que utilizam mediadores (segunda geração), e os baseados na transferência direta de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo (terceira geração)⁸⁴. O desenvolvimento de biossensores amperométricos eficientes podem ser alcançados através do desenvolvimento de métodos baseados em "mediadores" processos de direta transferência de elétrons. Isso deve se ao fato de que as enzimas redox utilizadas na fabricação desses biossensores contém centros eletroativos que normalmente são encontrados dentro de sua estrutura. Para um melhor entendimento, levando em conta que o centro ativo da enzima redox, e o eletrodo pode ser considerado como um par doador-aceitador, pode se dizer que existe uma camada espessa bloqueando a eficiência de uma transferência de elétrons no centro eletroativo da enzima. Esse isolamento do centro ativo normalmente pode impedir qualquer transferência eletrônica direta com eletrodo⁵². A comunicação eletrônica direta entre as enzimas redox e eletrodos pode ser estabelecida pela adição artificial de portadores de cargas (ou seja, transferência de elétrons mediada) como intermediários (FIG. 5). Os mediadores possuem uma ampla gama de estruturas, propriedades e de potenciais redox. No processo de transferência de carga, o mediador é responsável pelos repetidos ciclos entre seus estados oxidado e reduzido⁵³. A condição obrigatória é que o mediador promova reação rápida entre a enzima com o eletrodo.

FIGURA 5 – Representação esquemática do funcionamento de um sistema mediado.



Fonte: Figura adaptada de Lojou e colaboradores⁵⁴.

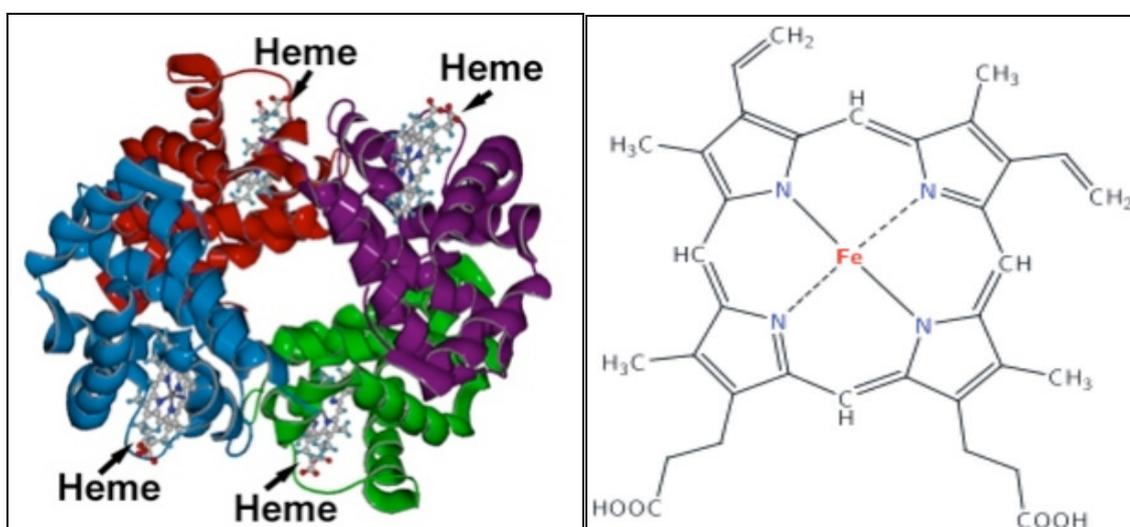
Dentre os vários compostos utilizados como mediador eletroquímico estão as proteínas redox, como por exemplo: ferritina, citocromo c, mioglobina, hemoglobina e várias outras proteínas. O estado redox do analito ou de uma espécie relacionada pode ser alterado por um intermediário no centro ativo da enzima, que pode ser grupos prostéticos de proteínas, como, por exemplo, o grupo heme da hemoglobina. As proteínas redox são regeneradas por uma direta transferência de elétrons final entre o grupo prostético e o eletrodo, levando a uma medida de corrente em correlação com a concentração do analito. Os biossensores de terceira geração possuem muitas vantagens, e a principal delas é a presença de mediadores, proporcionando ao biossensor seletividade superior quando comparado aos biossensores convencionais, uma vez que operam em uma janela de potencial mais próxima do potencial redox da enzima, sendo assim menos propenso a interferências⁵⁵.

2.3.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) é uma metaloproteína (proteína que contém um ou mais íons metálicos), contendo ferro presente nos glóbulos vermelhos (hemácias) e que permite o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório. A estrutura da Hb (FIG. 6) é composta de tetrâmero composto de dois tipos de cadeias polipeptídicas um deles contém 141 aminoácidos e o outro contém 146 aminoácidos. Cada cadeia polipeptídica está ligada a um grupo heme; estes possuem um íon de ferro no seu centro, que forma seis ligações

coordenadas: quatro com átomos de nitrogênio do grupo planar de porfirina, uma a um átomo de nitrogênio da proteína e outras a uma molécula de O_2 . É uma proteína alostérica (refere-se a qualquer alteração na estrutura terciária ou quaternária de uma enzima protéica induzida pela ação de uma molécula ligante, que pode ser um ativador, um inibidor, um substrato, ou os três), pois a ligação e a liberação do oxigênio é regulada por mudanças na estrutura provocadas pela própria ligação do oxigênio ao grupo heme de cadeias adjacentes. Esta proteína globular, tendo aproximadamente 55 Å de diâmetro e massa molecular de aproximadamente 64000 daltons²¹.

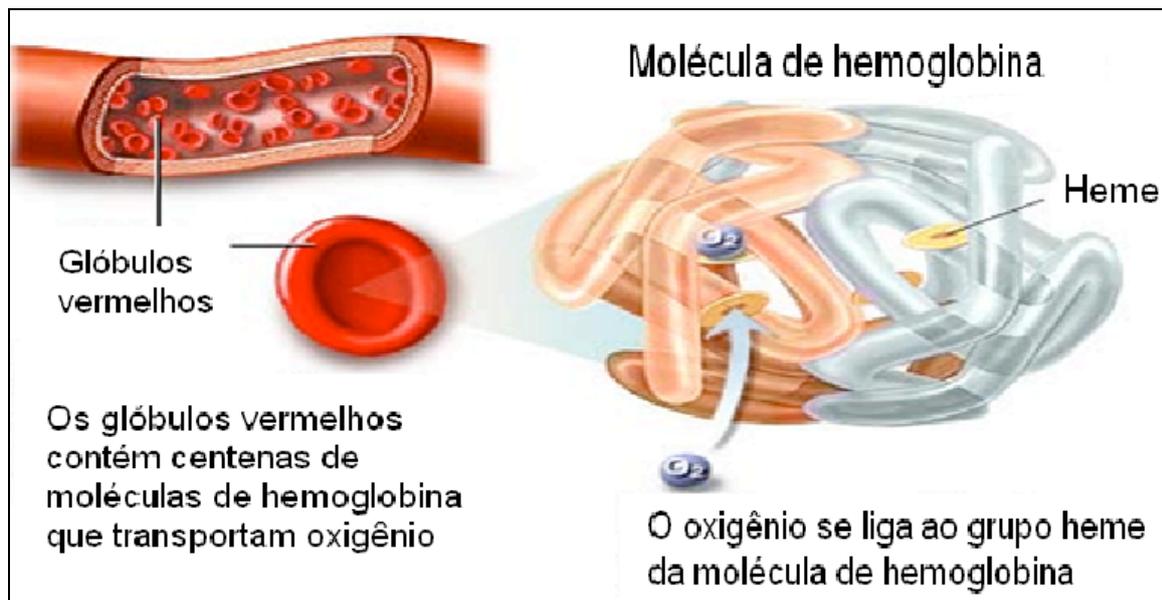
FIGURA 6 – Molécula de Hemoglobina e estrutura química do grupo heme da Hemoglobina.



Fonte: <http://umaquimicairresistivel.blogspot.com/2011/07/nossa-quimica.html>⁵⁶ e <http://misodor.com/HEMOGLOBINA.php>⁵⁷.

A característica mais importante da molécula de hemoglobina é de se combinar com O_2 , visto que a sua função primária, é captar O_2 nos pulmões, transportar e liberar nos tecidos, de modo que essa combinação é reversível e totalmente rápida (FIG. 7). Contudo, a Hb é ideal para estudo de reações de transferência de elétrons devido também a sua disponibilidade comercial e custo moderado⁵⁸.

FIGURA 7 – Esquema de ligação do O₂ com o grupo heme da Hemoglobina.



Fonte: A.D.A.M.⁵⁹

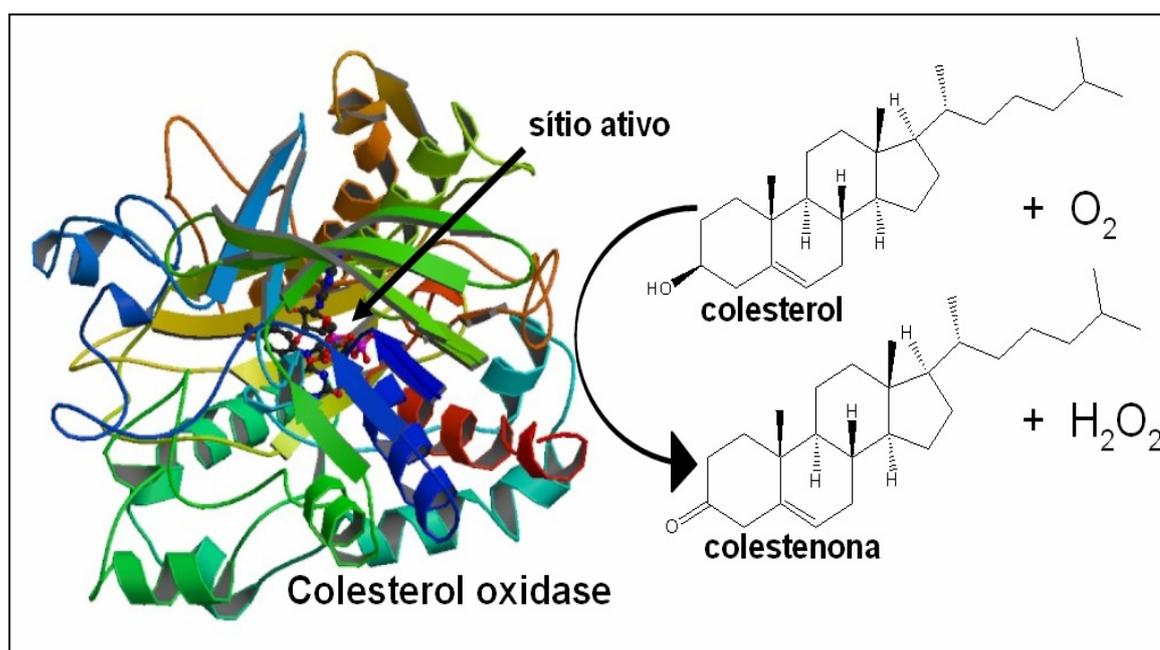
Vários métodos vêm sendo estudados para preparação de eletrodos modificados com a Hb, a fim de melhorar suas propriedades eletroquímicas^{60,61}. Um deles foi desenvolvido por Kafı e colaboradores que⁶⁰ que fabricaram um biossensor capaz de detectar compostos fenólicos usando a Hb como mediador de elétrons imobilizada em uma matriz sol – gel sobre um eletrodo de carbono, usando a atividade peroxidase da Hb. O biossensor apresentou resposta significativa a vários tipos de compostos fenólicos com um potencial aplicado de 0,0 mV vs. Ag/AgCl. A linearidade da detecção dos fenóis foi de 5 µM a 50 µM. O biossensor apresentou resposta por 30 dias com 80% da sua eficácia inicial, com tempo de resposta de 10 s.

Em um outro estudo desenvolvido por Changzhi e colaboradores⁶² foi construído um biossensor para detecção de colesterol usando a Hb como mediadora de elétrons. A Hb e colesterol oxidase foram imobilizados em matriz de quitosana sobre um eletrodo de carbono. O peróxido de hidrogênio produzido pela oxidação catalítica do colesterol pela enzima colesterol oxidase foi reduzido eletrocataliticamente pela Hb imobilizada e usada para obter uma resposta amperométrica sensível para colesterol. A resposta linear em concentrações de colesterol variou de $1,00 \times 10^{-5}$ para $6,00 \times 10^{-4}$ mol/L, com um coeficiente de correlação de 0,9969 e o limite de detecção do colesterol foi de 9,5 µmol/L. O biossensor para colesterol pôde excluir a interferência de espécies eletroativas tais como ácido ascórbico, ácido úrico, dopamina e adrenalina, sendo satisfatório na determinação de colesterol nas amostras de soro humano.

2.4. ENZIMA COLESTEROL OXIDASE

A enzima colesterol oxidase (COX) tem sido amplamente utilizada em dispositivos como biossensores capaz de detectar colesterol devido à permanência da sua bioatividade depois de imobilizada. O desenvolvimento de métodos viáveis para detecção colesterol no sangue é um parâmetro fundamental para identificar distúrbios como hipercolesterolemia⁶³. Além disso, é importante para controlar a quantidade de colesterol em alimentos para o consumo humano. O colesterol é um esterol encontrado em ovos, carnes, queijos amarelos e derivados. A enzima colesterol oxidase catalisa a reação química do colesterol, que na presença de oxigênio produz colestenoa e H_2O_2 (FIG. 8).

FIGURA 8 – Reação de catálise da enzima colesterol oxidase com oxidação do colesterol na presença de oxigênio produzindo colestenoa e H_2O_2 .



Fonte: Figura adaptada de RAM⁶⁴.

2.5. COLESTEROL

O colesterol é um sólido cristalino, branco, insípido e inodoro, membro da família dos esteróides (lipídios de cadeia complexa), um composto essencial para a vida, pois está presente nos tecidos de todo o corpo, além de fazer parte da estrutura das membranas celulares, é também um reagente de partida para a biossíntese de vários hormônios, do ácido biliar (produzido pelo fígado, atua diretamente sobre as gorduras como detergente

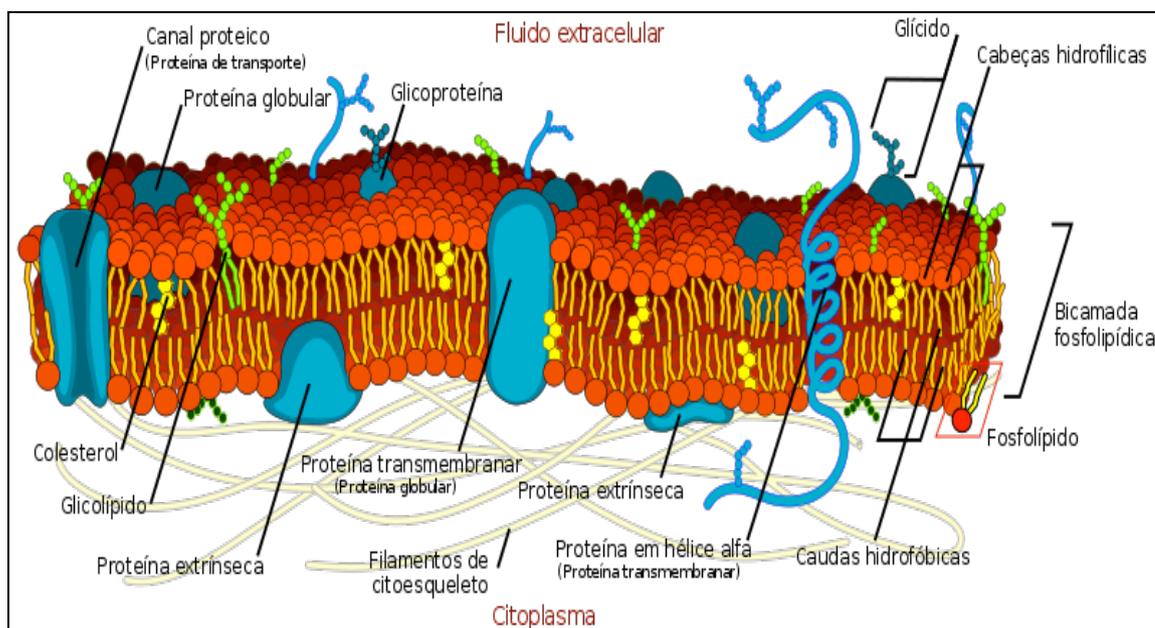
permitindo a ação das enzimas sobre as gorduras transformando-as em moléculas menores permitem a passagem através das células do intestino) e da vitamina D⁷⁰.

A maior parte do colesterol presente no corpo é sintetizada pelo próprio organismo, sendo apenas uma pequena parte adquirida pela alimentação. O colesterol é mais abundante nos tecidos que mais sintetizam ou têm membranas densamente agrupadas em maior número, como o fígado, medula espinhal, cérebro e placas ateromatosas (nas artérias). O fígado sintetiza o colesterol, em um processo regulado por um sistema compensatório: quanto maior for a ingestão de colesterol vindo dos alimentos, menor é a quantidade sintetizada pelo fígado⁷¹.

Essa molécula é insolúvel em água e, conseqüentemente, insolúvel no sangue. Para ser transportado através da corrente sanguínea ele liga-se a diversos tipos de lipoproteínas, partículas esféricas que tem sua superfície exterior composta principalmente por proteínas hidrossolúveis. Existem vários tipos de lipoproteínas, e elas são classificadas de acordo com a sua densidade. As duas principais lipoproteínas usadas para diagnóstico dos níveis de colesterol são: "Low-Density Lipoproteins", ou LDL, que é a classe maléfica ao ser humano: são capazes de transportar o colesterol do sítio de síntese, o fígado, até as células de vários outros tecidos. Uma outra classe de lipoproteínas, as "High Density Lipoproteins", ou HDL, podem transportar o excesso de colesterol dos tecidos de volta para o fígado, onde é utilizado para a síntese do ácido biliar⁷³.

O colesterol é necessário para construir e manter as membranas celulares, regula a fluidez da membrana em diversas faixas de temperatura. O grupo hidroxil presente no colesterol interage com as cabeças fosfato da membrana celular, enquanto a maior parte dos esteróides e da cadeia de hidrocarbonetos estão mergulhados no interior da membrana. A membrana celular (FIG. 9) é formada por uma bicamada lipídica na presença de proteínas, as moléculas lipídicas são anfipáticas, pois possuem uma extremidade hidrofílica ou polar (solúvel em meio aquoso) e uma extremidade hidrofóbica ou apolar (insolúvel em água). Os três principais grupos de lipídios da membrana são os fosfolipídios, o colesterol e os glicolipídios⁷².

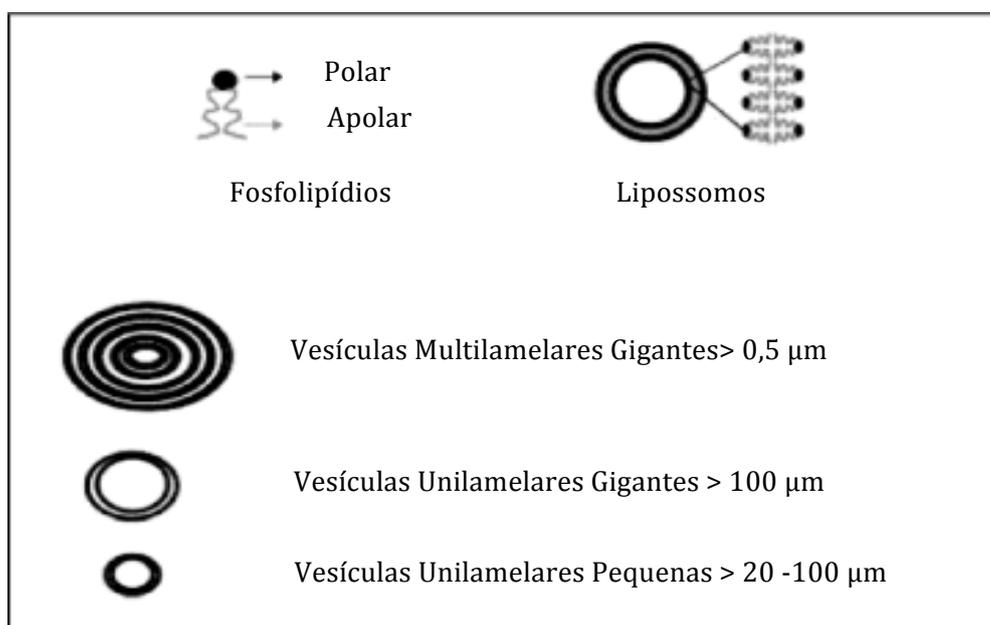
FIGURA 9 – Representação esquemática da membrana celular.



Fonte: http://pt.wikibooks.org/wiki/Citologia/Membrana_Celular⁷¹.

Para simular o ambiente natural do colesterol os lipossomos são utilizados. Os lipossomos consistem de uma ou mais bicamadas lipídicas que circundam um meio aquoso e mimetizam uma membrana celular. Os lipossomos podem ser constituídos por lipídios naturais e/ou sintéticos, tais como os fosfolípídios e os esfingolípídios, e podem apresentar, também, outros componentes da membrana celular, como colesterol e proteínas⁷⁴(FIG.10).

FIGURA 10 – Representação esquemática dos fosfolipídios, da estrutura e tipo dos lipossomos.



Fonte: <http://www.avantilipids.com/>⁷⁵.

O tamanho dos lipossomos pode variar de vesículas muito pequenas (0,025 µm) a grandes (2,5 µm), apresentando uma única ou múltiplas bicamadas. Com relação ao tamanho e o número de bicamadas, os lipossomos podem ser classificados em vesículas multilamelares gigantes (Multilamellar large vesicles - MLV); vesículas unilamelares gigantes (Large unilamellar vesicles - LUV) e vesículas unilamelares pequenas (Small unilamellar vesicles – SUV)⁷⁴ (FIG. 10).

2.6. BIOSSENSORES DE COLESTEROL

Colesterol e seus ésteres de ácidos graxos são componentes importantes de nervos e células, sendo precursores de substâncias biológicas, tais como o ácido biliar e hormônios esteróides. No entanto, o acúmulo de colesterol no soro fisiológico está fortemente correlacionado com doença coronária, arteriosclerose, infarto do miocárdio, trombose cerebral, disfunção do metabolismo lipídico, hipertensão, etc.⁶⁵.

Biossensores de colesterol têm atraído grande interesse em análises bioquímicas devido à sua boa seletividade, resposta rápida, baixo custo, portabilidade e longa estabilidade. Os biossensores de colesterol descritos na literatura em sua maioria são focados para diagnosticar doenças e no controle de alimentos⁶⁶. Basu e colaboradores⁶⁷ desenvolveram um biossensor com co-imobilização das enzimas colesterol

esterase e colesterol oxidase. As enzimas foram imobilizadas por reticulação, com glutaraldeído e albumina de soro bovina sobre um substrato de ouro. Este sensor apresentou resposta linear de 2 a 50 mg/dL de colesterol, numa faixa que permite aplicação em amostras reais de alimentos. Porém, neste estudo o colesterol foi detectado na presença de Triton X-100 e não em amostras reais, como por exemplo soro humano ou amostras alimentícias.

Um outro exemplo de biossensor de colesterol foi proposto por Bansi e colaboradores⁶⁸, usando nanopartículas de CeO₂ (nanoCeO₂) em matriz de quitosana (CH) e a enzima COX imobilizada sobre ITO. Observou-se que o bioeletrodo COX/nanoCeO₂-CH/ITO exibiu propriedade excelentes para detecção de colesterol devido ao aumento do sítio ativo do nanocompósito e forneceu um microambiente favorável para o transporte de elétrons. O biossensor apresentou faixa de detecção de 10 – 400 mg/dL, limite de detecção de 5mg/dL, tempo de resposta de 10 s e coeficiente de correlação de 0,994.

Yildirmogles e colaboradores⁶⁹ propuseram um biossensor amperométrico de colesterol com a imobilização da COX em filme de polipirrol – polivinil sulfato (PPy-PVS) na superfície de um eletrodo de platina. As técnicas utilizadas foram de voltametria cíclica com faixa de -1,0 e 2,0 V(vs. Ag/AgCl) com velocidade de varredura de 100 mV, e amperometria com potencial de 0,4 V vs Ag/AgCl. Os efeitos de pH, temperatura, estabilidade e tempo de vida do biossensor foi investigado e os melhores parâmetros foram pH = 7,25, temperatura de 35° C tendo como resultado 32% de resposta, que foi mantido em 19 ensaios, e 43% de sua atividade foi mantida por 45 dias armazenado em solução tampão a 4° C.

Apesar dos dois biossensores relatados acima apresentaram respostas favoráveis, não foram testados em amostra reais e não foi pesquisado a presença de interferentes. Contudo, há um grande interesse na obtenção de biossensores que não sofram os efeitos dos interferentes, que sejam de baixo custo e tenha estabilidade para aplicação em amostras reais.

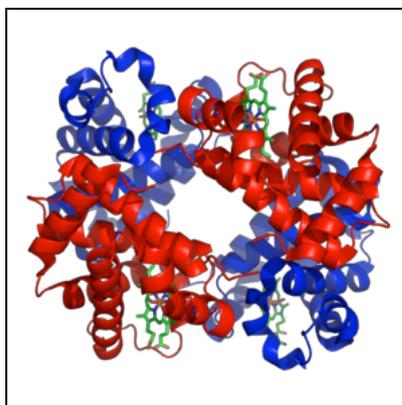
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Hemoglobina

A hemoglobina (Hb) de soro bovino (massa molecular média, MW média = 64500 g/mol), adquirida comercialmente da Sigma, foi utilizada como mediadora eletroquímica do peróxido de oxigênio.

FIGURA 11 – Estrutura quaternária da Hemoglobina.

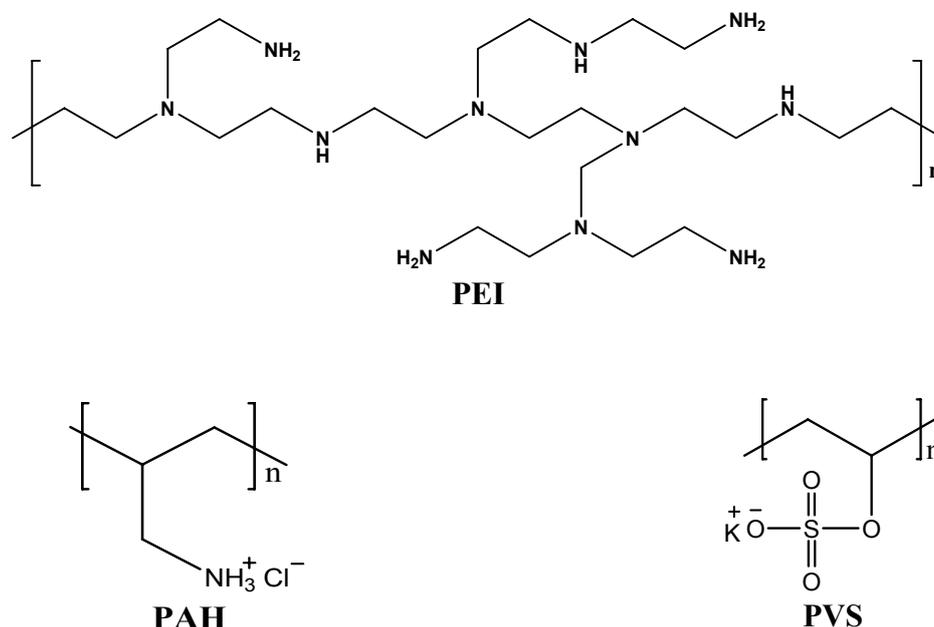


Fonte: <http://www.rcsb.org>⁷⁶

3.1.2. Polieletrólitos

Os filmes contendo Hb e a enzima COX foram fabricados com a utilização dos polieletrólitos cloreto de poli(alilamônio) (PAH) e poli(etilenoimina) (PEI). Antes da primeira bicamada depositada dos filmes, foi depositado sobre o substrato um filme contendo os polímeros PAH ou PEI e poli(vinilsulfonato de sódio) (PVS), que atua como camada intermediária para diminuir efeitos do substrato, como por exemplo, a porosidade do substrato [85]. Os polieletrólitos poli(etilenoimina) (PEI) (MW média = 25000 g/mol), poli(alilamina) (PAH) (MW média = 60000 g/mol) e poli(vinil sulfato de disódioclorado) (PVS) (25% da massa total, wt, em H₂O), foram adquiridos comercialmente da Sigma. A FIG. 12 representa as estruturas químicas dos polieletrólitos descritos anteriormente.

FIGURA 12 – Estruturas dos polieletrólitos poli(etilenoimina) (PEI), cloreto de poli(alilamônio) (PAH) , poli(vinil sulfato) (PVS).

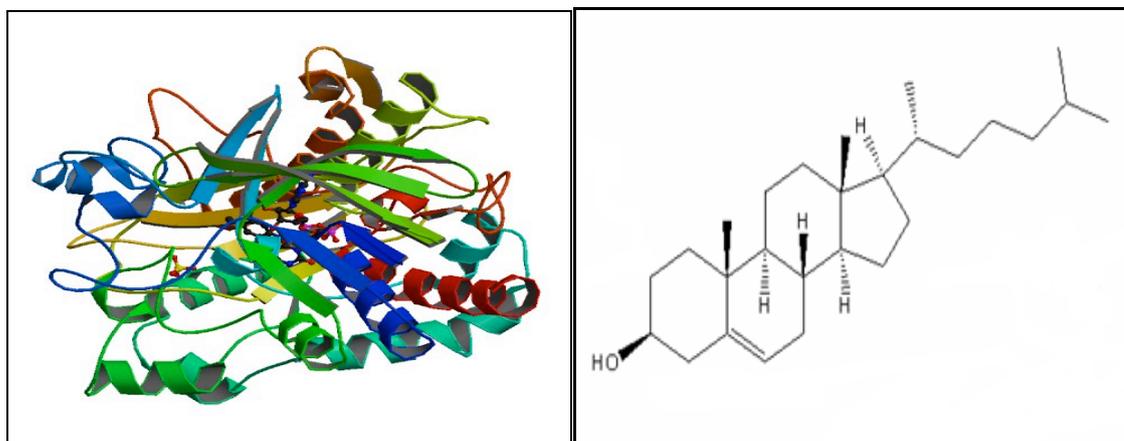


Fonte: Aldrich Sigma⁷⁷

3.1.3. Enzima e Analito

A enzima oxidoreductase colesterol oxidase (EC 1.1.3.6) (100 unidades/mg, PI = 4,6 - 5,2) e o colesterol (99% de pureza, MW = 386,65 g/mol), foram obtidos comercialmente da Aldrich Sigma e Avanti Polar Lipids, respectivamente. O colesterol tem pouca solubilidade em água, devido a esse fato um sistema biomimético foi utilizado, ou seja, o colesterol foi imobilizado em lipossomos. A gema natural de ovo de galinha utilizada nas análises de colesterol foi obtida comercialmente da marca Label Rouge. A concentração do colesterol na gema foi calculada a partir das informações nutricionais fornecidas pelo produtor. A FIG. 13 ilustra as estruturas terciária da enzima e estrutura química do colesterol.

FIGURA 13 – Estrutura terciária da enzima colesterol oxidase e estruturas químicas do analito colesterol.

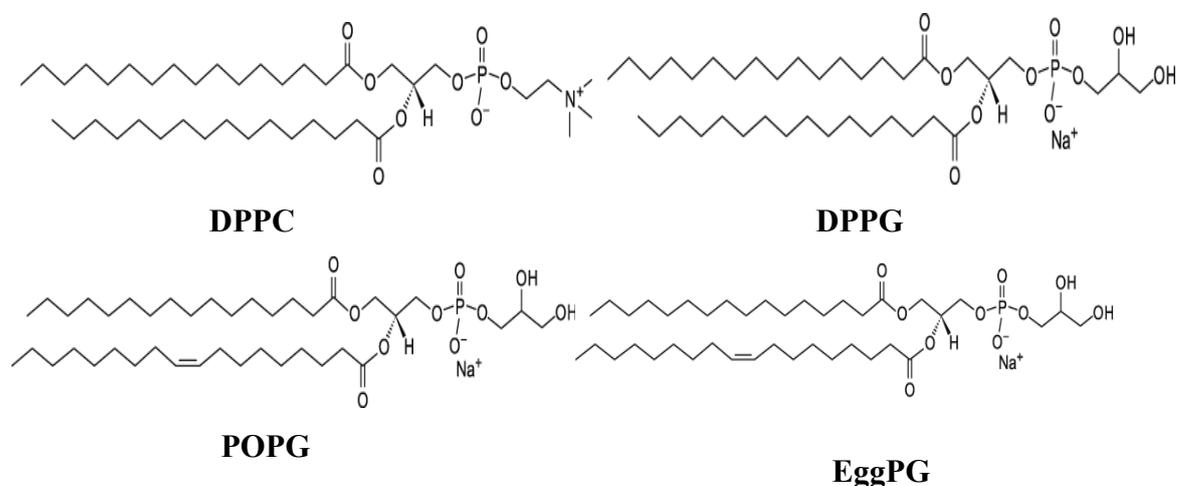


Fonte: <http://www.rcsb.org>⁷⁶ e <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/colesterol.html>⁷².

3.1.4. Lipossomos

Os lipossomos foram preparados a partir dos fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil colina, (DPPC) (MW = 734,05 g/mol), dipalmitoil fosfatidil glicerol, (DPPG) (MW = 744,96 g/mol), glicerol de ovo de galinha (EggPG) (MW = 771 g/mol) e palmitoil Fosfatidil Glicerol (POPG), adquiridos comercialmente da Avanti Polar Lipids. Os reagentes metanol e clorofórmio da marcas Vetec e Quimis respectivamente, foram utilizados para a solubilização dos fosfolipídios. A FIG. 14, mostra as estruturas químicas dos fosfolipídios descritos acima.

FIGURA 14 – Estrutura químicas dos fosfolipídios DPPC, DPPG, POPG e EggPG.



Fonte: Avanti Polar Lipids⁷⁵.

3.1.5. Substratos

Os substratos utilizados para a imobilização dos filmes automontados foram escolhidos de acordo com as técnicas de caracterização empregadas. O substrato utilizado para medidas espectroscópicas de UV-vis e fluorescência foi o quartzo. O monitoramento da absorção e emissão de cada camada depositada da proteína e enzima, foi por volta de 250-500 nm e 300-500 nm, respectivamente. Para as medidas amperométricas e de voltametria cíclica os filmes foram imobilizados em substrato de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio ITO do inglês indium tin oxide da marca Delta, com uma área de 1,972 cm². O substrato de quartzo foi previamente tratado com solução de hidrofilição, onde o substrato foi imerso em uma solução básica contendo NH₄OH: H₂O₂: H₂O (1:1:5) por 10 minutos à temperatura de 70-80°C, e então lavado com água Milli-Q. Em seguida adicionado na solução ácida HCl:H₂O₂:H₂O p(1:1:6) por mais 10 minutos a 70-80°C e novamente lavado com água ultra pura.

3.2. SOLUÇÕES

3.2.1. Tampão PBS

O tampão fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS) foi preparado com fosfato de sódio dibásico, Na₂HPO₄, (6 mmol/L) e cloreto de sódio, NaCl, (150 mmol/L). O pH foi ajustado com uma solução de fosfato de potássio monobásico, KH₂PO₄, (150 mmol) até atingir o pH de 7,4. O PBS foi utilizado em todas as soluções contendo a proteína hemoglobina.

3.2.2. Tampão Tris-HCl

O tampão Tris-HCl 10 mM foi preparado a partir da diluição de uma solução estoque de tris(hidroximetil)aminometano 100 mM. O pH foi ajustado para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) concentrado. O tampão Tris-HCl foi utilizado em todas as soluções relacionadas com a enzima colesterol oxidase.

3.2.3. Polieletrólitos

Todas as soluções contendo os polieletrólitos PAH, PEI e PVS, utilizados na montagem dos filmes automontados, foram preparadas na concentração de 1 mg/mL diluídos em água ultra pura, do sistema de purificação Milli-Q com resistividade 18,2 MΩ e pH ~ 5,7 marca Direct-Q Millipore.

3.2.4. Hemoglobina

A solução de hemoglobina utilizada na deposição dos filmes automontados, atuando como mediador eletroquímico foi preparado com concentração de 5mg/mL dissolvida em tampão PBS (pH 7,4).

3.2.5. Enzima e Analito

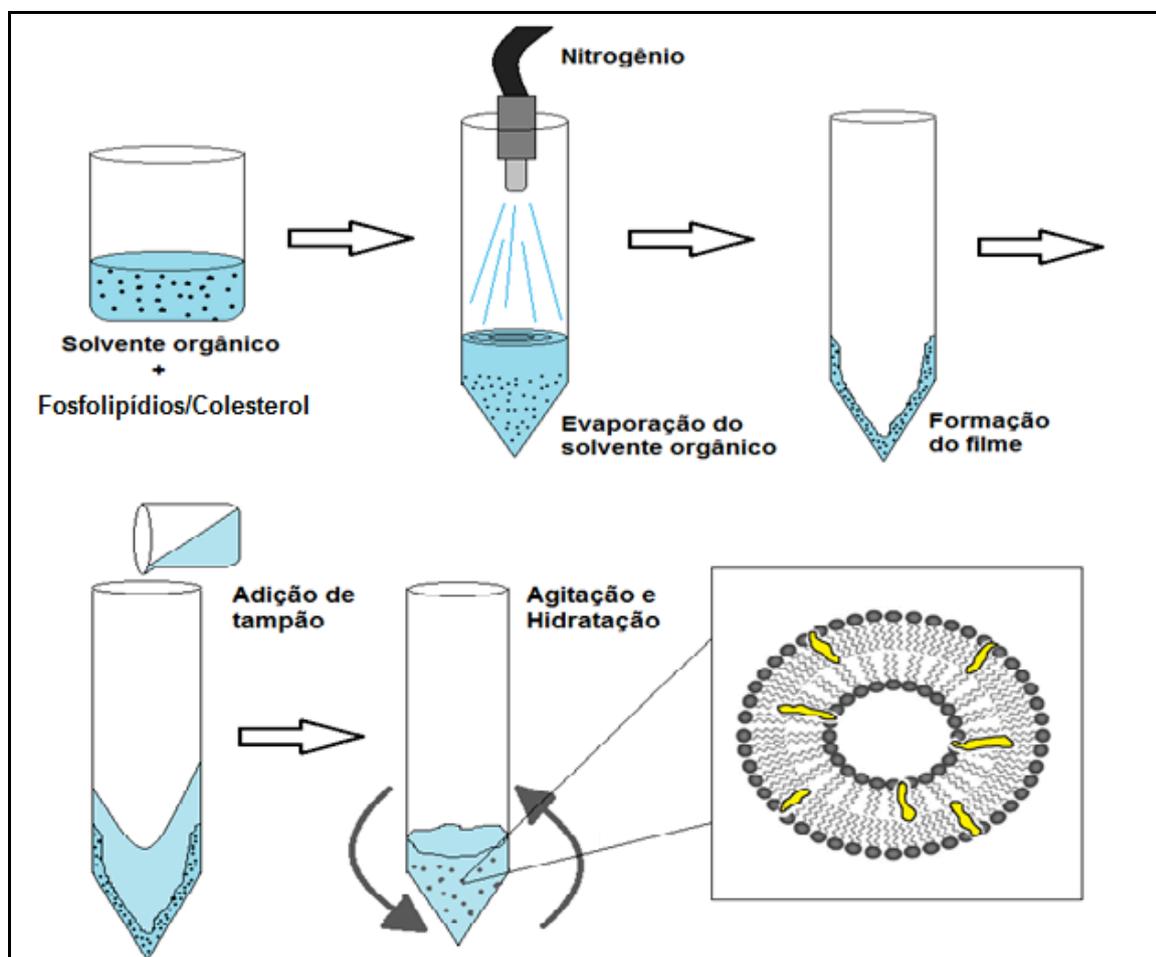
A enzima colesterol oxidase com a concentração de 0,2 mol/L foi diluída em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,4). O analito colesterol foi preparado juntamente com os fosfolipídios DPPC/DPPG/POPG/EggPG, então dissolvidos em metanol/clorofórmio (1:9) nas proporções fosfolipídios (1 mM) e colesterol (0,1 mM). A mistura foi evaporada com auxílio de nitrogênio até formação de um filme ao redor do frasco, em seguida este filme foi hidratado com tampão Tris-HCl 10 mM por 2 horas.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Preparação e incorporação do colesterol em lipossomos

Os fosfolipídios DPPC/DPPG/POPG/EggPG foram preparados primeiramente sozinhos, dissolvendo-se 1mM dos fosfolipídios em metanol/clorofórmio (1:9). O solvente foi evaporado com nitrogênio até formar um filme em torno do tubo Falcon, e posteriormente, hidratado com água ultrapura por 2 horas no ultra-som, assim obtendo-se as vesículas multilamelares (MLVs). O colesterol foi incorporada em lipossomos dissolvendo 1 mM dos fosfolipídios em metanol/clorofórmio (1:9) e 0,1 mM de colesterol em metanol. As soluções foram misturadas e o solvente foi evaporado seguindo o mesmo processo descrito anteriormente e que está representado na FIG. 15.

FIGURA 15 – Representação esquemática da preparação do colesterol incorporado em lipossomos.



Fonte: Figura adaptada de Avanti Polar Lipids⁷⁵.

3.3.2. Preparação dos filmes camada por camada (LbL)

Os filmes automontados foram imobilizados sobre um substrato previamente tratado com solução de hidrofílicação. O substrato previamente tratado foi imerso na solução de polication (PAH e PEI), durante o tempo necessário para que as moléculas fossem totalmente adsorvidas na superfície do substrato, para a formação de uma camada completa. O substrato era então lavado com solução tampão ou água Milli-Q, para que pudesse ser retirado todo o excesso de moléculas do polication. Em seguida, o substrato foi imerso na solução contendo poliânion (proteína e enzima), promovendo a adsorção do mesmo na camada previamente adsorvida pelo polication, e depois imerso na solução de lavagem. Este procedimento foi repetido até se obter o número de bicamadas desejadas.

3.3.2.1. Filmes PEI/Hb e PAH/Hb

Os filmes automontados contendo hemoglobina foram testados com dois polycations PAH e PEI. O tempo de imersão em PAH ou PEI foi de 3 minutos. Após a adsorção completa do polycation o filme foi lavado com água Milli-Q. Em seguida, o substrato foi imerso na solução de hemoglobina durante o tempo de 10 minutos, e então lavado em tampão PBS, os tempos de imersão para os polieletrólitos e Hb foram baseados em outros trabalhos, nos quais esses tempos foram de 3 minutos para os polycations e 10 minutos para enzima/proteína⁸³. Nesse sistema PAH/Hb e PEI/Hb todas as soluções foram preparadas em água ultrapura e o filme foi produzido à temperatura ambiente (~22°C). O monitoramento do crescimento dos filmes a cada camada depositada foi realizada através de espectroscopia de fluorescência e UV-visível.

3.3.2.2. Filmes PEI/COX e PAH/COX

A enzima colesterol oxidase também foi testada com os dois tipos de polieletrólitos usados para a fabricação dos filmes contendo hemoglobina. Primeiramente, a COX foi automontada separadamente com PAH e PEI, para o monitoramento de seu crescimento através das técnicas de espectroscopia de fluorescência e UV-visível, pois se o filme fosse depositado sobre a Hb, não seria possível acompanhar o crescimento da COX, porque a Hb possui intensidade diferente da COX. O tempo de imersão do PAH-PEI foi de 3 minutos. Após a adsorção completa do polycation o filme foi lavado com água Milli-Q. Em seguida, o substrato foi imerso na solução de COX durante o tempo de 10 minutos, e então lavado em tampão tris, os tempos de imersão para os polieletrólitos e COX foram baseados em outros trabalhos, nos quais esses tempos já tinham sido determinados⁸³. Nesse sistema PAH/Hb e PEI/Hb todas as soluções foram preparadas em água ultrapura e o filme foi produzido à temperatura ambiente (~22°C).

3.3.2.2. Filmes PEI/Hb/COX e PAH/Hb/COX

Os filmes automontados contendo polycations, Hb e COX foram fabricados para as medidas amperometricas. Primeiramente o substrato foi imerso em PAH ou PEI por 3 minutos. Após a adsorção completa do polycation o filme foi lavado com água Milli-Q. Em seguida, o substrato foi imerso na solução de hemoglobina durante o tempo de 10

minutos, e então lavado em tampão PBS. Após a deposição PAH ou PEI com Hb, foram depositadas camadas de policações PAH ou PEI com COX, com tempos de imersão de 3 e 10 minutos, respectivamente. Nesse sistema PAH/Hb/COX e PEI/Hb/COX todas as soluções foram preparadas em água ultrapura e o filme foi produzido à temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$).

3.3.3. Espectroscopia de absorção na região do Ultravioleta/Visível (UV-vis)

A espectrometria de absorção molecular nas regiões do ultravioleta e do visível é amplamente utilizada para determinação quantitativa de um grande número de espécies inorgânicas, orgânicas e biológicas, dependendo da estrutura eletrônica das moléculas. A absorção de energia é quantizada através da passagem da molécula do estado fundamental para o estado excitado, envolvendo uma mudança na configuração eletrônica molecular nos orbitais de fronteira. A espectrometria de absorção molecular é baseada na medida de transmitância T ou absorbância A de soluções/filmes contidas em celas ópticas (vidro ou quartzo) com caminho óptico de b cm. Geralmente, a concentração de um analito que absorve está relacionada linearmente com a absorbância, seguindo a lei de Beer:

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

onde ϵ é a absorvidade molar e c é concentração da molécula adsorvente⁷⁸.

A técnica de espectroscopia de UV-vis foi utilizada para a caracterização dos filmes LbL. O crescimento desses filmes foi acompanhado através da absorbância em função do número de bicamadas depositadas, assim, a quantidade de material adsorvido foi observada. As medidas foram realizadas no equipamento de espectroscopia de UV-vis da marca Termo Scientific modelo Genesys 6 e espectrofotômetro da marca Hitachi modelo FL 4.500 sendo que os filmes foram imobilizados em substrato de quartzo.

3.3.4. Espectroscopia de Fluorescência Molecular

Em condições normais a maior parte das moléculas se encontram no nível energético vibracional mais baixo do estado eletrônico (estado fundamental). A absorção de um quantum de luz promove a passagem dos elétrons a níveis superiores de energia. Durante o retorno ao estado fundamental, uma parte da energia absorvida é reemitida, sendo este

fenômeno conhecido como luminescência. Se a energia é reemitida a partir do estado singleto excitado, o fenômeno corresponde à fluorescência.

A fluorescência corresponde, em princípio, ao processo inverso do fenômeno de absorção, uma vez que se produz sempre pela emissão de energia a partir do nível mais baixo do primeiro singleto excitado.

Três tipos de espectros de fluorescência podem ser obtidos para cada amostra, em função do tipo de informação desejada: o espectro de emissão, espectro de excitação e espectro de excitação/emissão sincronizado.

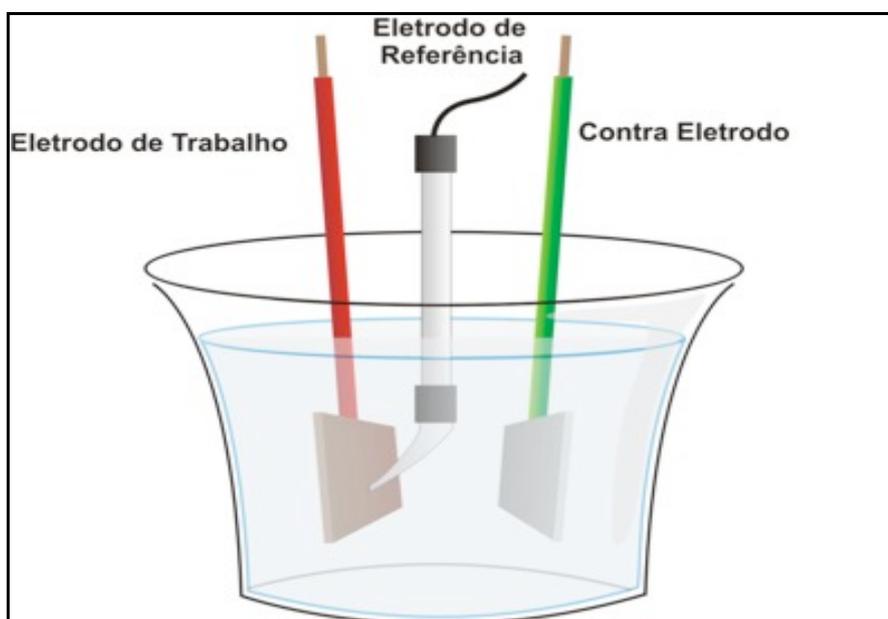
A fluorescência de um composto depende da sua estrutura molecular e esta quase sempre associada ao sistema eletrônico. A espectroscopia de fluorescência é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo estrutural de macromoléculas, como proteínas e polímeros. A técnica baseia-se na propriedade que algumas moléculas possuem de emitir luz devido às transições eletrônicas entre estados eletrônicos excitados e estados de menor energia⁷⁹.

Os espectros de emissão também foram utilizados para monitoramento e acompanhamento do crescimento dos filmes automontados contendo a proteína e enzima, através do aumento da intensidade fluorescente no máximo da banda correspondente em função da concentração e os filmes foram imobilizados em substrato de quartzo. O equipamento utilizado nas medidas de fluorescência foi um espectrofluorímetro da marca Shimadzu, modelo RF-5301 PC.

3.3.5. Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab PGSTAT 30. A célula eletroquímica é uma célula convencional de três eletrodos: referência, contra eletrodo e trabalho (Figura 7). O eletrodo de referência é o de calomelano saturado (saturated calomel electrode, SCE) Hg/Hg₂Cl₂/KCl(sat.). Uma lâmina de platina de 1,5 cm² foi usada como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo e o eletrodo de trabalho utilizado nas medidas foram os filmes automontados depositados sobre o substrato de ITO.

FIGURA 16 – Representação esquemática de uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos; referência, trabalho e contra eletrodo.



Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato>⁸⁰

3.3.5.1. Medidas Amperométricas

As medidas amperométricas foram realizadas em temperatura ambiente, em uma célula eletroquímica convencional contendo 10mL de solução eletrolítica (tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,4). O potencial foi fixado em 0,0 V vs SCE e o eletrodo de trabalho foi o filme PAH/Hb, PEI/HB, PAH/Hb/PAH/COX e PEI/Hb/PEI/COX e a cada estabilização da corrente foram adicionados 100 μ L da solução de H₂O₂, DPPC, DPPG e EggPG na presença e ausência de colesterol para os filmes contendo a Hb. Para os filmes contendo a enzima COX foram adicionados alíquotas de POPG na presença e ausência de colesterol, ácido úrico e ácido ascórbico. As medidas amperométricas foram usadas para caracterizar a resposta do biossensor ao colesterol e seus interferentes.

3.3.5.2. Voltametria Cíclica (VC)

A voltametria cíclica consiste da ciclagem entre intervalos definidos de potencial a uma velocidade de varredura linear constante em um sistema de três eletrodos: o eletrodo de trabalho, onde as reações irão ocorrer; o eletrodo de referência, com potencial fixo; e o eletrodo auxiliar, utilizado para captar a corrente gerada. A aplicação de um potencial programado e controlado gera uma resposta de corrente (entre o eletrodo de trabalho e o

eletrodo auxiliar) em função do potencial aplicado (entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho)⁷⁸. A corrente que é observada corresponde às mudanças geradas por oxidação e redução do eletrodo de trabalho quando o potencial é alterado. À medida que este potencial é alterado, a corrente aumenta exponencialmente, consumindo as espécies nas proximidades do eletrodo. Esta corrente não aumenta indefinidamente, mas atinge um valor máximo, que é limitado pelo transporte de massa nas proximidades do eletrodo. Quando a varredura de potencial é invertida, os produtos formados na superfície do eletrodo são transformados através de processos de redução ou oxidação dependendo do sentido de varredura de potenciais.

4 RESULTADOS E DISCUÇÕES

4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES AUTOMONTADOS CONTENDO HEMOGLOBINA

Neste trabalho foram estudadas rotas para o desenvolvimento de um biossensor capaz de detectar colesterol, utilizando a hemoglobina como mediador eletroquímico, através da técnica de automontagem camada por camada (LbL). Considerando que o filme automontado depende, principalmente, de materiais com cargas opostas para a construção camada por camada através de interações eletrostáticas, a escolha da Hb para fazer parte dos filmes automontados deve-se também ao fato de que proteínas em pHs próximos do fisiológico (neutro) estão carregadas negativamente⁸¹. Os polieletrólitos PAH e PEI foram escolhidos para esse estudo devido ao seu caráter positivo em pHs neutros⁸², carga oposta a proteína escolhida, isso facilitaria a montagem dos filmes automontados trabalhando em mesmo pH.

Primeiramente foram obtidos espectros na região do UV-visível e fluorescência da hemoglobina para avaliação da solubilidade e emissão fluorescente da hemoglobina em solução. A FIG. 17 mostra o espectro de absorção no UV-visível da hemoglobina solubilizada em tampão PBS, que apresenta duas bandas em destaque, uma em 280 nm e outra em 410 nm. A banda em 280 nm é proveniente dos resíduos de aminoácidos triptofano, fenilalanina e tirosina presente em proteínas. A banda em 410 nm é característica do grupo heme presente na hemoglobina. O espectro de emissão (FIG. 18) também foi obtido com a hemoglobina em solução em excitada em 280 nm com uma emissão em 330 nm, também proveniente dos resíduos de triptofanos, fenilalanina e tirosina.

FIGURA 17 – Espectro de UV-visível da hemoglobina em tampão PBS.

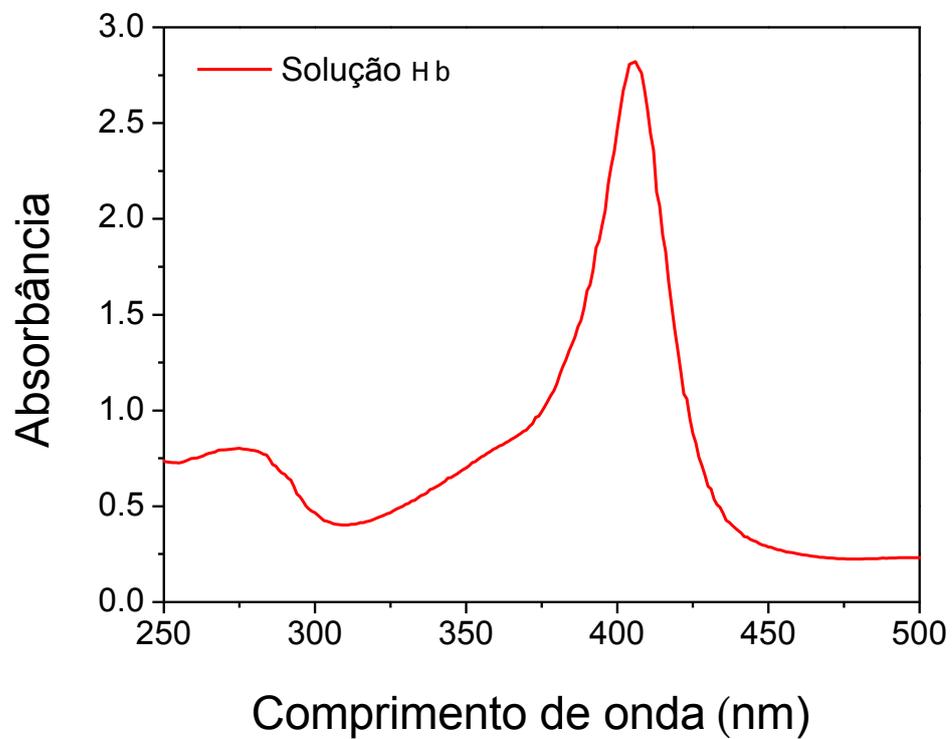
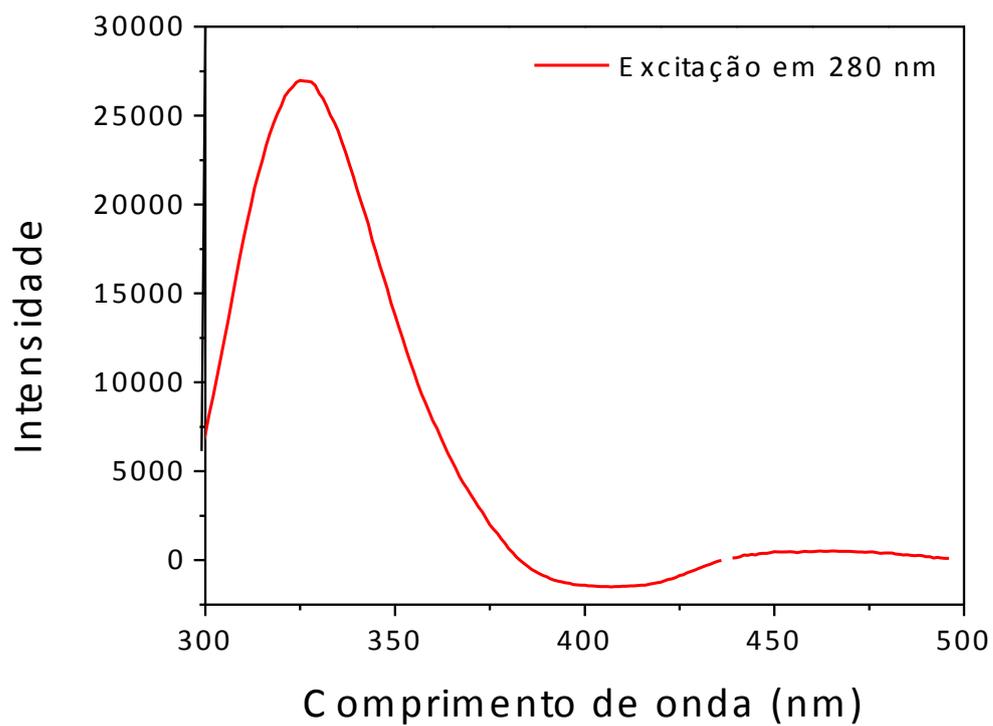


FIGURA 18 – Espectro de fluorescência (excitação em 280 nm) da hemoglobina em tampão PBS.



4.1.1. Filmes PAH/Hb e PEI/Hb caracterizados por UV-vísivel

O crescimento dos filmes PAH/Hb e PEI/Hb foi monitorado por espectroscopia de UV-vísivel observando a banda em 410 nm, como ilustrado nas FIG. 19 e 20, respectivamente. Os filmes foram depositados sobre substrato de quartzo com 10 bicamadas. O filme PAH/Hb apresentou um crescimento linear em sua absorção com o número de bicamadas depositadas, o máximo de absorção em sua última bicamada depositada foi de 0,0675 e um coeficiente de correlação de, $R = 0,95$. A figura mostra que o crescimento é irregular e isso pode ser atribuído a conformação das moléculas durante o crescimento. O filme PEH/Hb foi monitorado a cada deposição de uma bicamada até a décima bicamada e apresentou um crescimento exponencial na absorção com o número de bicamadas, o um máximo de absorção em sua última bicamada depositada foi de 0,118 e um coeficiente de correlação de, $R^2 = 0,99$. Como pode-se observar a taxa de crescimento com filme do filme PEI/Hb foi maior, visto que o máximo de absorção para esse filme foi maior e seu coeficiente de correlação foi mais próximo de um, o que indica que um maior número de moléculas estão sendo adsorvidas.

FIGURA 19 – Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PAH/Hb (A) e o aumento do máximo de absorção (B) em 410 nm do filme PAH/Hb em função do número de bicamadas depositadas.

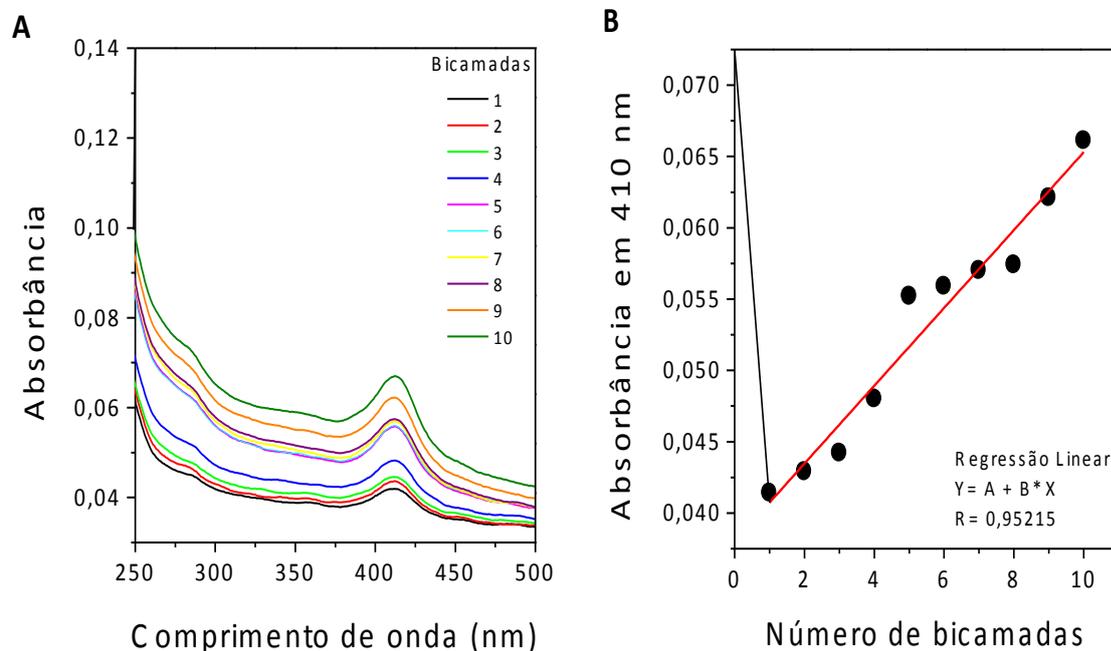
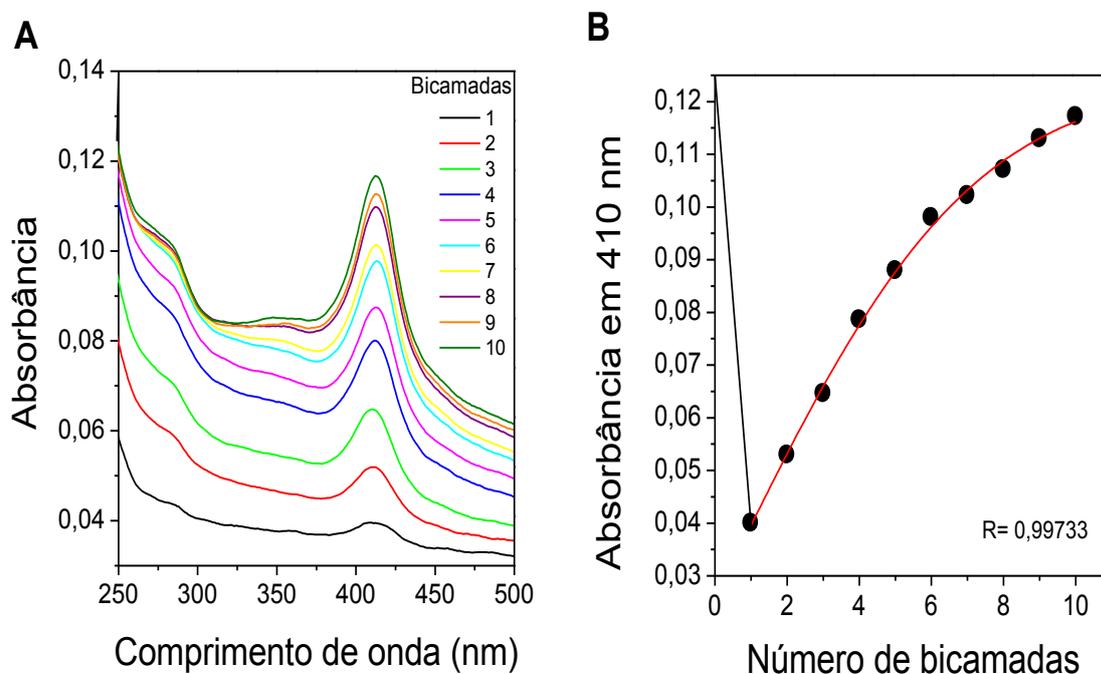


FIGURA 20 – Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PEI/Hb (A) e o aumento do máximo de absorção (B) em 410 nm do filme PEI/Hb em função do número de bicamadas depositadas.



4.1.2. Filmes PAH/Hb e PEI/Hb caracterizados por Fluorescência

O crescimento do filme automontado PAH/Hb e PEI/Hb foi confirmado por espectroscopia de fluorescência (FIG. 21 e 22). O filme foi excitado em 280 nm e esse comprimento de onda foi escolhido pela emissão dos resíduos aminoácidos, como a fenilalanina e o triptofano da proteína.

Em ambos os processos de crescimento não foi observada uma linearidade conforme deposição da Hb sobre o substrato sólido. Esse comportamento pode estar atribuído a erros experimentais ocasionados ao modo como a luz incide na hora em que o filme está sendo excitado durante o experimento. Ou seja, o filme tem que estar no mesmo lugar quando a coleta dos espectros é realizada. Isso é quase impossível, uma vez que o ajuste é feito manualmente no suporte. Esses desvios ocorrem devido à espessura muito pequena dos filmes automontados.

O espectro de emissão da solução de Hb apresentou uma banda em 330 nm quando excitado em 280 nm o que condiz com a literatura. Porém em ambos os filmes automontados a emissão foi em 360 nm, ocorrendo um deslocamento de 30nm. Esse deslocamento é ocasionado pela agregação das moléculas comum em filmes. Portanto, com os resultados obtidos por fluorescência pode-se concluir que a Hb está presente no filme e o crescimento depende do tipo de polieletrólito utilizado.

FIGURA 21 – Espectros de fluorescência (excitação em 280nm) de 10 bicamadas do filme PAH/Hb (A) e espectro de emissão fluorescente (B) da Hb em solução e em filme automontado PAH/Hb 10 bicamadas.

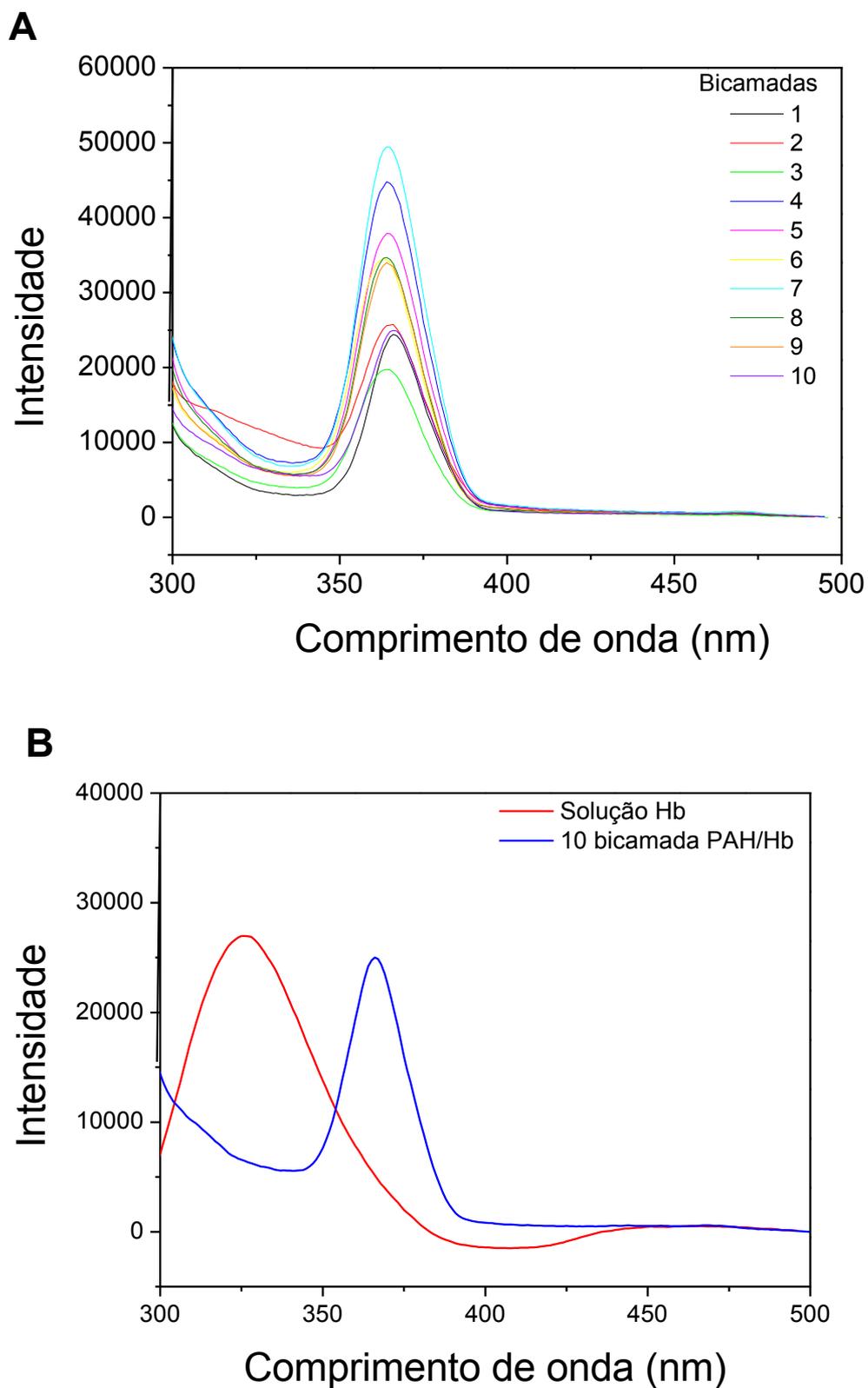
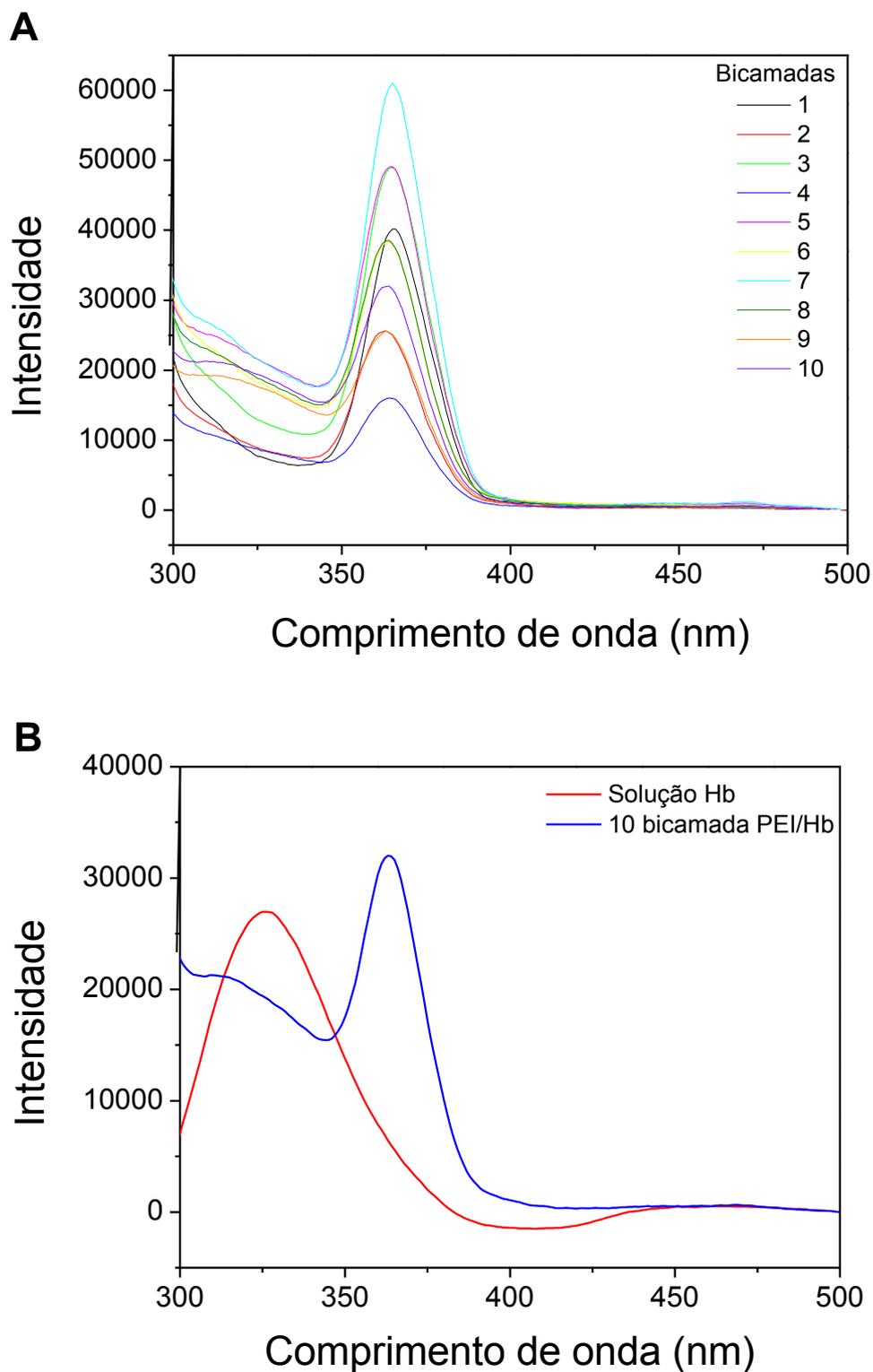


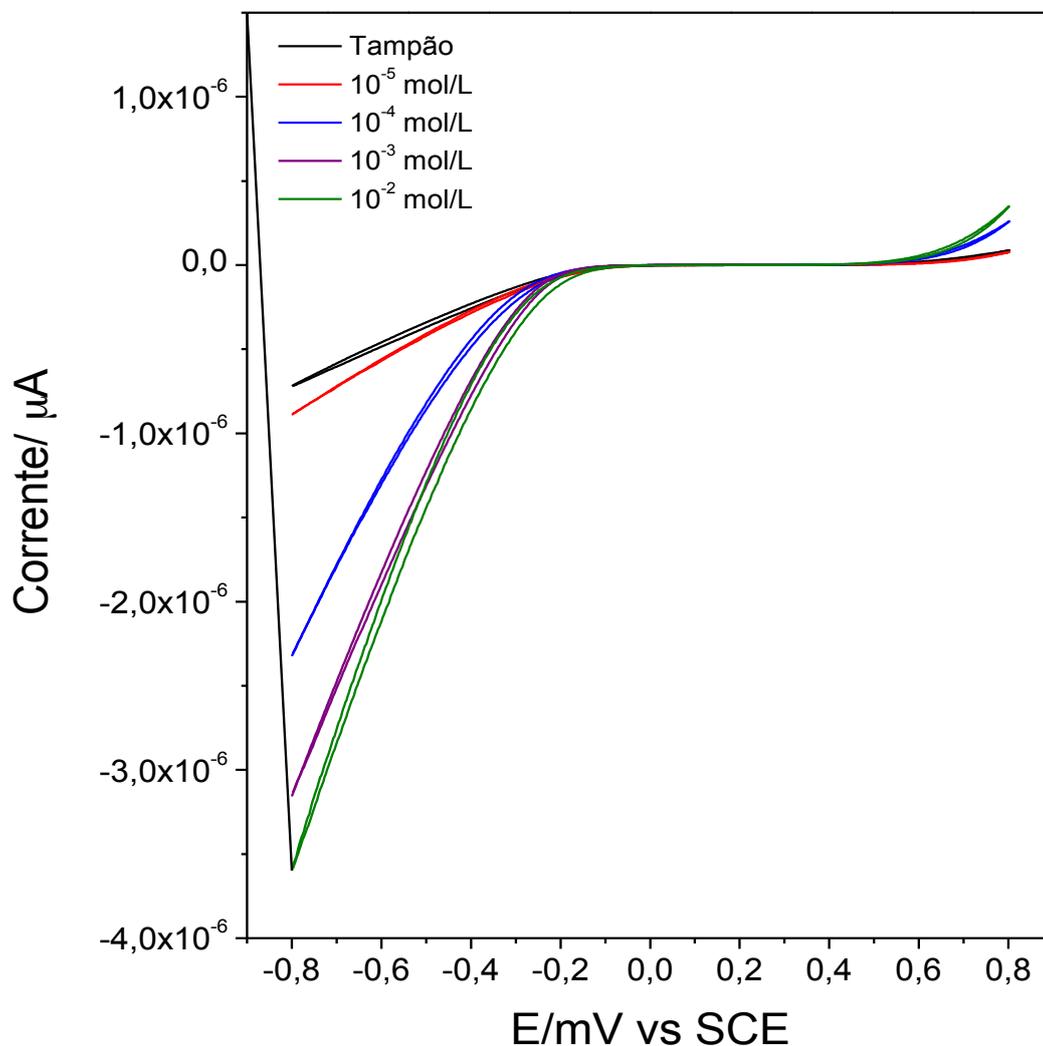
FIGURA 22 – Espectros de fluorescência (excitação em 280nm) de 10 bicamadas do filme PEI/Hb (A) e espectro de emissão fluorescente (B) da Hb em solução e em filme automontado PEI/Hb 10 bicamadas.



4.1.3. Medidas de Voltametria Cíclica

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas com o filme PEI/Hb com 10 bicamadas sobre o substrato de ITO como eletrodo de trabalho para a detecção do H_2O_2 em diferentes concentrações: 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} M. O filme PEI/Hb foi escolhido para essa medida, por seu crescimento em ambos os métodos UV-vis e fluorescência terem sido melhores. Os voltamogramas foram obtidos em tampão tris 10 mM em pH 7,4 no intervalo de potenciais de -0,8 a 0,8 V, aplicando-se uma varredura de potencial de 0,0 V a 1,0 V (vs ECS) a 50 mV/s até 3 ciclos. Na FIG.23 estão apresentados os voltamogramas do filme em solução tampão e com diferentes concentrações de H_2O_2 . Os voltamogramas do filme PEI/Hb contendo H_2O_2 com diferentes concentrações não apresentaram uma boa eletroatividade, uma vez que não há pico de redução e oxidação bem definidos, porém verificou-se uma mudança na intensidade de corrente, o que evidencia que o filme é sensível as diferentes concentrações de H_2O_2 .

FIGURA 23 – Voltamogramas cíclicos do filme PEI/Hb contendo 10 bicamadas sobre ITO em tampão Tris 10 mM, pH 7,4, com velocidade de varredura de 50mV/s para a detecção do H₂O₂ em diferentes concentrações.

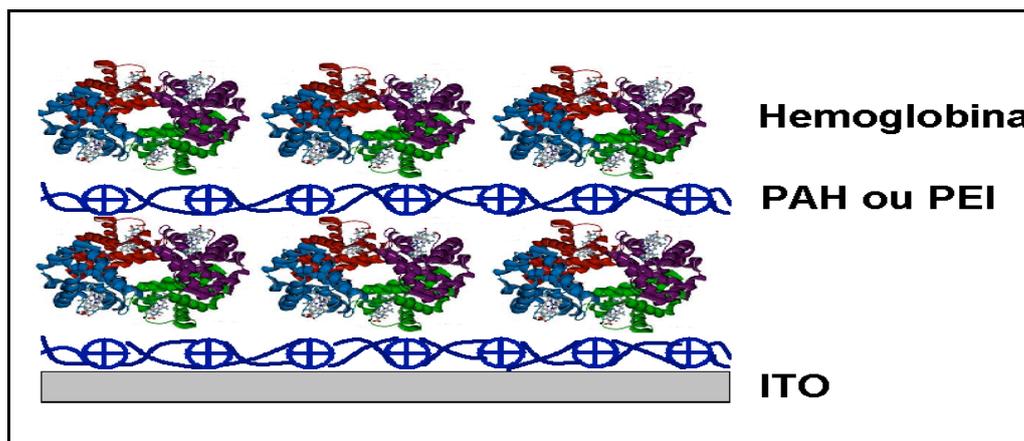


4.1.4. Filmes Automontados por Amperometria

Os filmes PAH/Hb e PEI/Hb imobilizados sobre substrato de ITO (FIG. 24) foram testados como biossensores para detecção de H₂O₂ utilizando como método de detecção a amperometria. As medidas foram conduzidas em baixo potencial (0,0 V), mesmo não tendo nenhuma potencial de redução ou oxidação obtidos nas medidas de VC. Esse potencial foi utilizado para diminuir os efeitos de interferentes que oxidam ou reduzem em altos potenciais e que podem estar presentes nas amostras a serem analisadas, por exemplo, os fosfolípidios. O eletrólito suporte é tampão tris (10 mL) e o potencial aplicado foi de 0,0 V (vs. SCE). Após a corrente estabilizar foram adicionadas alíquotas

de H_2O_2 , tampão, fosfolipídios (DPPC, DPPG e EggPG) com e sem colesterol. Os fosfolipídios foram utilizados nessas medidas, uma vez que, posteriormente, nas medidas realizadas com a enzima colesterol oxidase o analito colesterol seria incorporado em fosfolipídios. Portanto, os fosfolipídios serão testados como interferentes.

FIGURA 24 – Representação esquemática da estrutura idealizada do filme PAH/Hb e PEI/Hb .

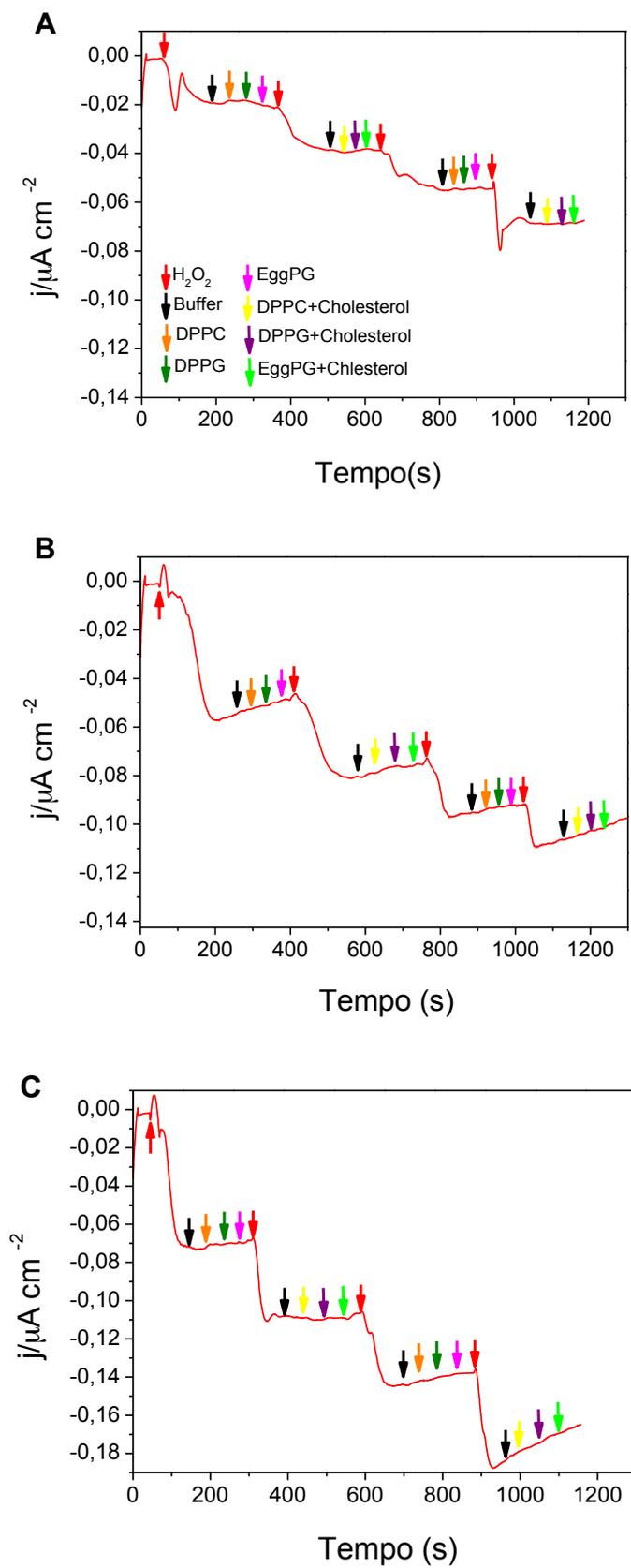


4.1.4.1. Filmes PAH/Hb caracterizados por Amperometria

Os filmes automontados da Hb com PAH foram estudados de três formas diferentes, com 2, 5 e 10 bicamadas de deposição de PAH/Hb ilustradas nas FIG. 25 (A), (B) e (C), respectivamente. Os biossensores com diferentes números de bicamadas apresentaram respostas distintas: cada adição de $100 \mu\text{L H}_2\text{O}_2$ promove um decréscimo na corrente. Para os filmes com 2, 5 e 10 bicamadas esse decréscimo consiste em uma redução de corrente de aproximadamente $0,02 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, $0,05 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ e $0,07 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectivamente. Nota-se que o número de bicamadas influencia na sensibilidade, ou seja, quanto mais espesso o filme maior sensibilidade.

Ressalta-se que o crescimento do filme com o polieletrólito PAH apresentou um crescimento com menor porcentagem de deposição quando comparado ao PEI, esse efeito pode interferir nas respostas eletroquímicas para o analito. Nesse caso, observou-se um tempo de resposta maior para filmes mais espessos, enquanto que a sensibilidade foi decorrente da quantidade de material adsorvido. Os possíveis interferentes fosfolipídicos utilizados na imobilização do colesterol não apresentaram respostas eletroquímicas.

FIGURA 25 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/(PAH/Hb)₂(A), ITO/(PAH/Hb)₅ (B) e ITO/(PAH/Hb)₁₀ (C). Cada decréscimo da corrente corresponde ao aumento de 100 μ L H₂O₂ 0,001 mol/L.

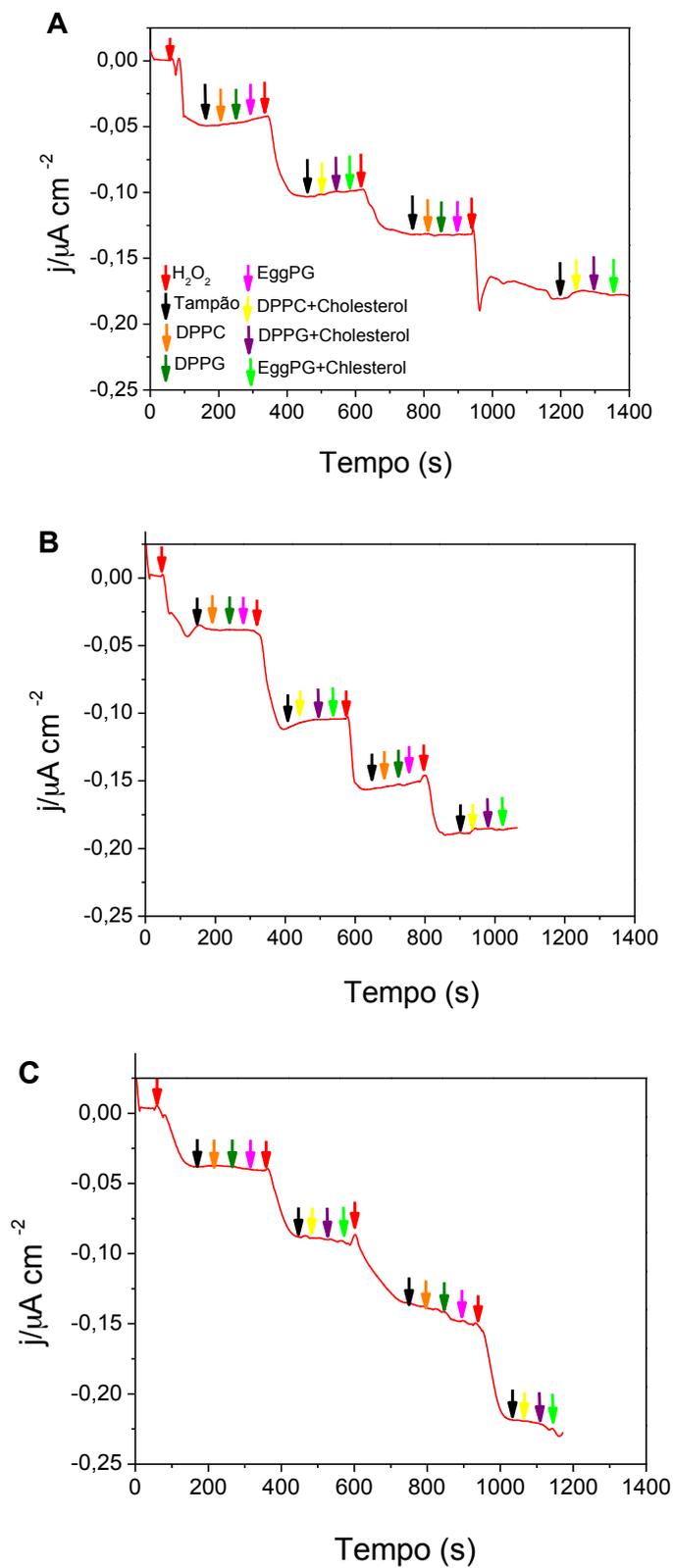


4.1.4.2. Filmes PEI/Hb caracterizados por Amperometria

Os filmes automontados da Hb intercalados com PEI também foram estudados com diferentes números de bicamadas, sendo elas 2, 5 e 10 bicamadas de deposição de PEI/Hb como representado nas FIG 26 (A), (B) e (C).

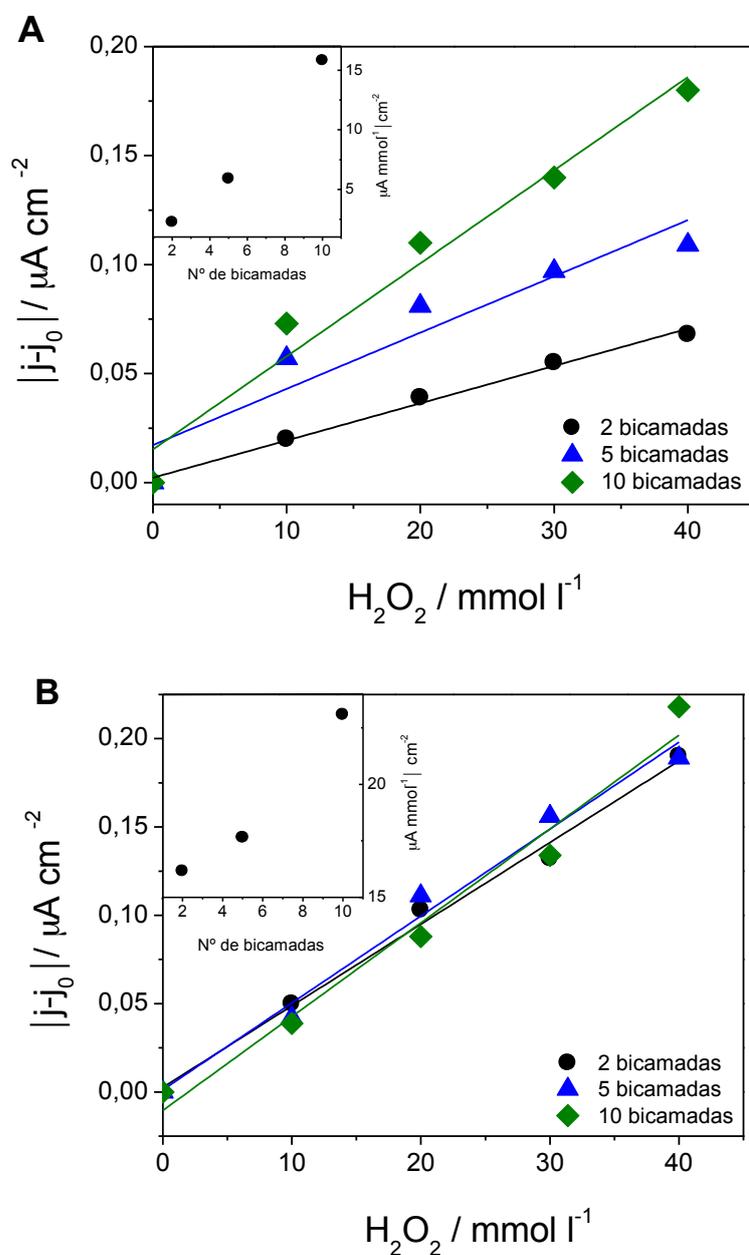
Os biossensores com diferentes números de bicamadas apresentaram respostas similares, cada adição de H_2O_2 , esse o decréscimo de corrente foi de aproximadamente $0,05 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Essa redução de corrente similar para todos números de bicamadas, leva a indícios que os diferentes número de bicamadas para ambos os casos tem o mesmo comportamento. Ressalta-se que o crescimento dos filmes com o polieletrólito PEI foi melhor quando comparado ao polieletrólito PAH. Esse melhor crescimento pode influenciar na resposta eletroquímica fazendo com que a resposta ao analito H_2O_2 seja constante, ou seja, independente do número de camadas. Aliquotas de tampão, fosfolípidios DPPC, DPPG e EggPG na ausência e na presença do colesterol foram adicionadas e não houve resposta eletroquímica.

FIGURA 26 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/(PEI/Hb)₂(A), ITO/(PEI/Hb)₅ (B) e ITO/(PEI/Hb)₁₀ (C). Cada decréscimo da corrente corresponde ao aumento de 100 μ L H₂O₂ 0,001 mol/L.



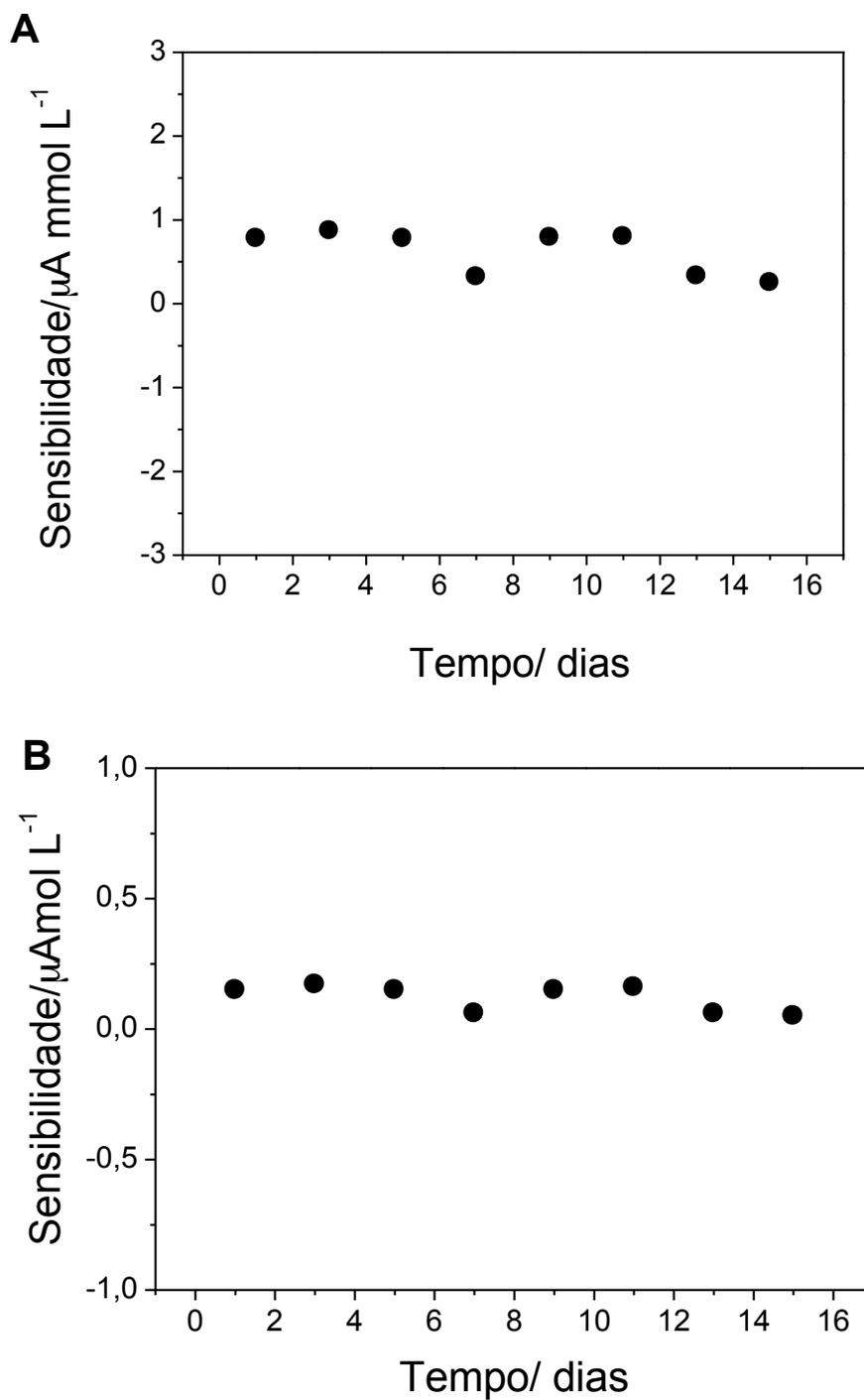
A Figura 27 (A) ilustra as curvas analíticas para os biossensores ITO/(PAH/Hb)_n, com número de bicamadas variando de 2 a 10 na resposta em diferentes concentrações de H₂O₂. Na figura inserida é mostrado a sensibilidade dos filmes em função do número de bicamadas. A sensibilidade para 2 bicamadas foi 2,23 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, 5 bicamadas 5,89 $\mu\text{A mmol}^{-1}/\text{cm}^2$, 10 bicamadas 15,8 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, o limite de detecção foi de 0,012 mmol^{-1} (três vezes o ruído). Nota-se que a sensibilidade cresce com o número de bicamadas, devido ao aumento da espessura do filme. Um mesmo resultado foi observado para o filme ITO/(PEI/Hb)_n, onde ficou evidenciado que o número de bicamadas também influenciou na sensibilidade do biossensor (Figura 27 B). Na figura inserida está representado a sensibilidade para os filmes com 2 bicamadas em que a sensibilidade foi de 17,9 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, 5 bicamadas com 19,06 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, 10 bicamadas com 23,28 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, sendo que limite de detecção foi de 0,016 mmol^{-1} . A resposta de ambos os biossensores mostrou uma linearidade de 0,1 a 0,4 mmol/L de H₂O₂. De um modo geral observou que acima de 0,4 mmol/L há saturação da resposta do sensor. Uma possível explicação para essa diferença na sensibilidade, deve-se a quantidade de Hb adsorvida durante o crescimento do filme ou há organização das moléculas durante a deposição, como explicado posteriormente.

FIGURA 27 – Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de H_2O_2 dos biossensores ITO/(PAH/Hb) $_n$ (A) e ITO/(PEI/Hb) $_n$ (B).



A estabilidade da Hb em substrato sólido também foi estudada (FIG. 28). Os biossensores de PAH/Hb e PEI/Hb foram estocados em solução tampão PBS pH 7,4 sob uma temperatura de 4 °C. Ambos os sensores foram testados durante 15 dias consecutivos, em mesmas condições testadas anteriormente, e os mesmos se mostraram bioativos durante esse intervalo de tempo.

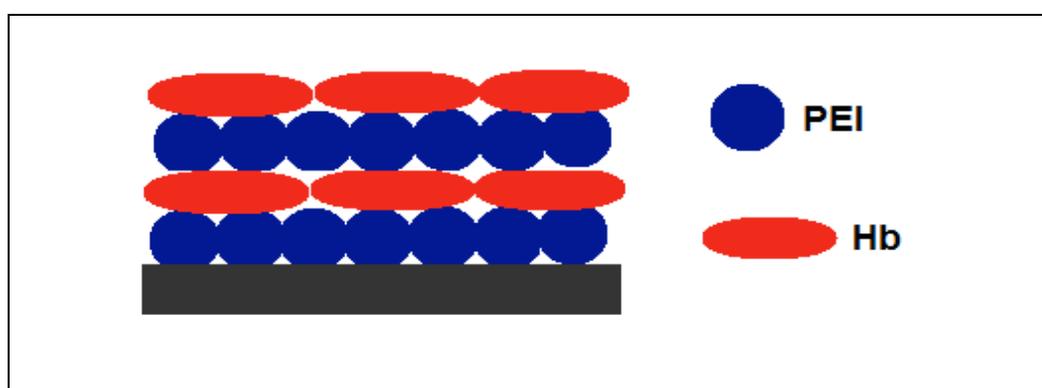
FIGURA 28 – Estabilidade dos biossensores PAH/Hb (A) e PEI/Hb (B) 10 bicamadas estocados em tampão PBS a 4°C.



Os filmes estudados contendo a hemoglobina imobilizada com ambos os polieletrólitos PAH e PEI mostraram-se efetivos para detectar H_2O_2 . As condições brandas de deposição, como por exemplo, o uso de soluções aquosas e utilização do pH

7,4 ótimo para a Hb, favorecem a bioatividade da proteína por um longo período. A utilização da Hb como mediadoras de elétrons nos biossensores para detecção de H_2O_2 mostrou-se altamente sensível e seletivo, como demonstrado pela ausência de sinal nas alíquotas de interferentes. O filme PEI/Hb apresentou um melhor desempenho em relação a sensibilidade e isso pode estar relacionado ao tipo de empacotamento do filme PEI/Hb. O polieletrólito PEI possui uma estrutura globular (FIG. 29). Isso pode propiciar uma maior quantidade de espécies adsorvidas no filme, conseqüentemente uma maior sensibilidade, sendo maior número de espécies para reagir com o analito.

FIGURA 29 – Estrutura idealizada para o filme (PEI/Hb)₂.

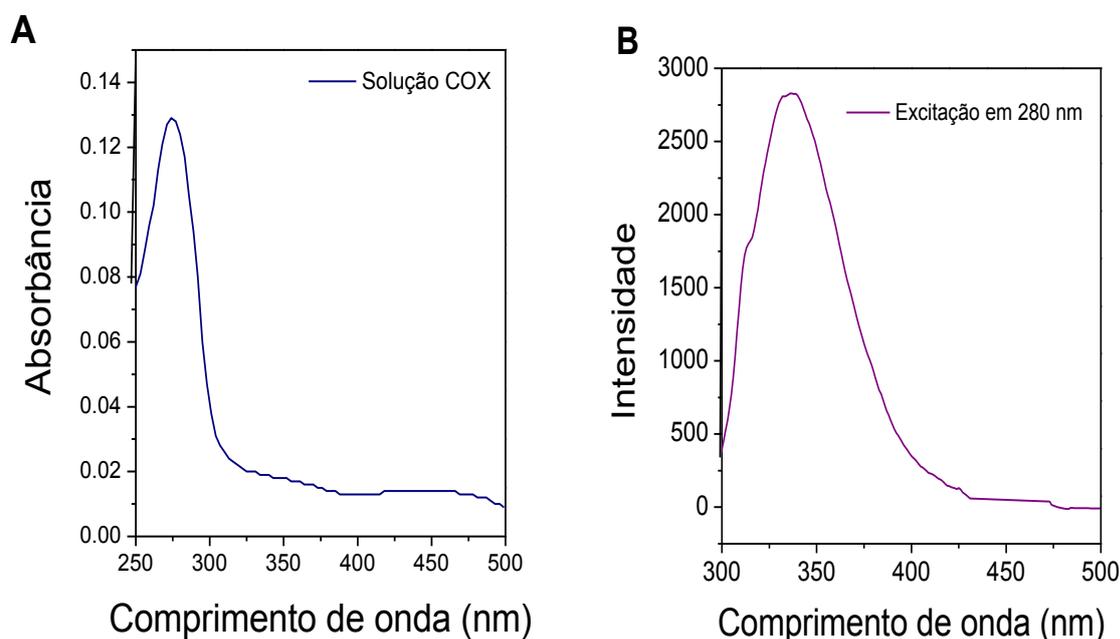


4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES AUTOMONTADOS DA ENZIMA COLESTEROL OXIDASE

A versatilidade da técnica de automontagem na imobilização de enzimas em filmes nanoestruturados possibilita a imobilização de várias moléculas de interesse biológico em conjunto com polieletrólitos convencionais, com preservação da atividade biológica. O processo de imobilização ocorre em condições ótimas de pH e força iônica das soluções, minimizando a desnaturação de enzima. Além disso, a montagem do filme automontado é facilitada pelo fato de que biomoléculas são solúveis em água e possuem excesso de cargas na superfície. Neste item serão apresentados estudos sobre a fabricação de filmes automontados contendo as enzimas colesterol oxidase (COX) para obter biossensores amperométricos capaz de detectar colesterol. Primeiramente, o colesterol foi encapsulado nos lipossomos, uma vez que ele não é solúvel em água. Posteriormente, o colesterol foi obtido de amostras reais como a gema de ovo de galinha.

O crescimento do filme PAH/COX e PEI/COX foi monitorado com absorção do UV-visível e espectroscopia de fluorescência. Inicialmente foram feitas medidas de absorção e emissão da COX livre em solução (FIGS. 30). O espectro da COX apresenta uma banda de absorção em torno de 280 nm (A) e um máximo de emissão por volta de 330 nm (B), valores condizentes com a absorção e emissão dos resíduos de aminoácidos fenilalanina e triptofano.

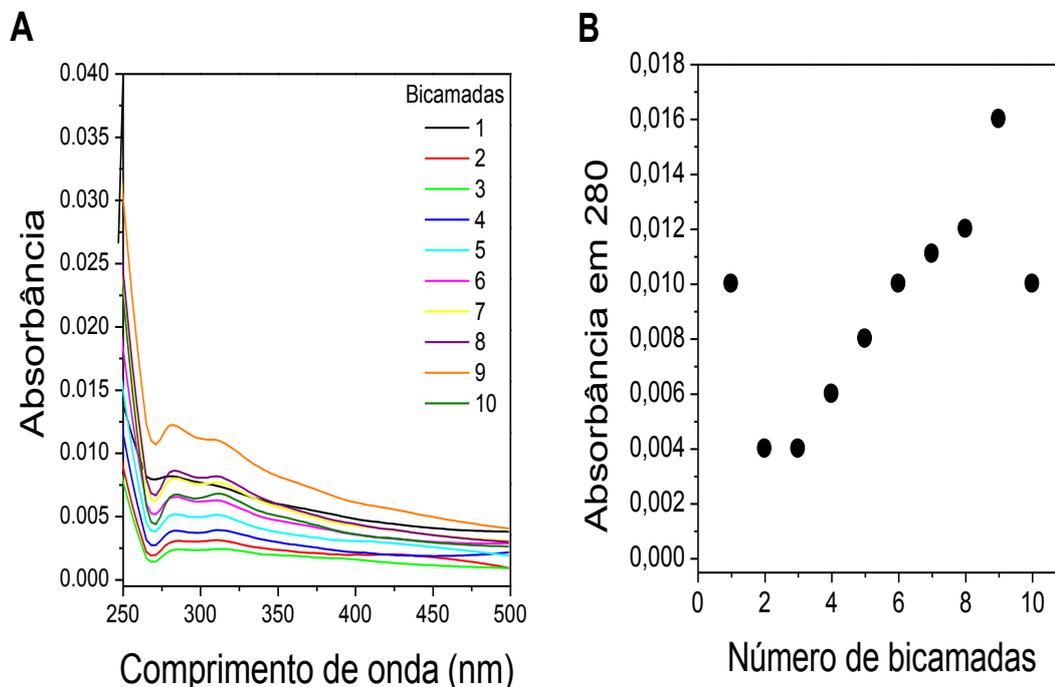
FIGURA 30 – Espectros de absorção (A) e emissão (B) da COX livre em tampão tris.



4.2.1. Filmes PAH/COX e PEI/COX caracterizados por UV-vísivel

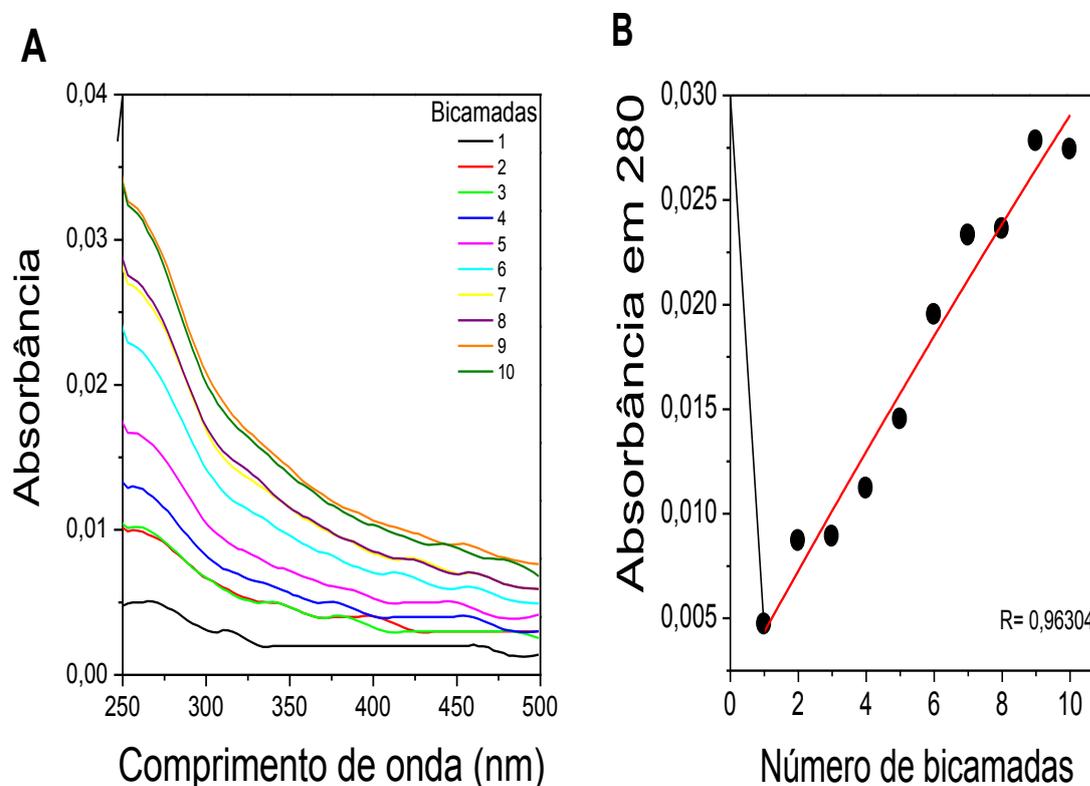
A FIG. 31 (A) mostram espectros de absorbância para o filme nanoestruturados PAH/COX, contendo 10 bicamadas depositadas. A banda em 280 nm observada no espectro de adsorção da COX em solução ficou evidenciada também nos espectros das 10 bicamadas de PAH/COX, sem nenhum deslocamento observado. A FIG. 31 (B) mostra o gráfico de absorbância em 280 nm versus número de bicamadas. Esse filme apresentou um perfil de crescimento não satisfatório para um acompanhamento, por isso também foram realizados espectros de fluorescência.

FIGURA 31 – Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PAH/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 280 nm do filme PAH/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).



Espectros de absorvância também foram realizados para o filme PEI/COX com 10 bicamadas de deposição. A FIG. 32 (A) representa espectros de absorvância para o filme automontado PEI/COX. A FIG. 32 (B) mostra o gráfico de absorvância a 280 nm versus número de bicamadas. Nesse filme também ficou evidente uma banda em 280 nm obtendo um crescimento linear que indica a mesma quantidade de material está sendo adsorvido a cada deposição. O filme contendo PEI o coeficiente de correlação, R, foi mais próximo de 1 (0,96) quando comparado com o filme contendo PAH (0,47). Esta diferença do coeficiente de correlação já é um indício de que o filme PEI/COX cresce mais uniformemente com camadas depositadas que o filme contendo PAH.

FIGURA 32 – Espectros de UV-vis de 10 bicamadas do filme PEI/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 280 nm do filme PEI/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).



4.2.2. Filmes PAH/COX e PEI/COX caracterizados por Fluorescência

A imobilização da COX a cada camada depositada pode ser confirmada por espectroscopia de fluorescência. Os espectros de fluorescência dos filmes PAH/COX e PEI/COX (FIG. 33 (A) e 34 (A)) apresentaram uma banda em 330 nm a mesma encontrada no espectro da COX em solução. O crescimento dos filme foi observado com máximo de emissão em 330 nm, referente aos resíduos de aminoácidos triptofano e fenilalanina da COX, em função do número de bicamadas de PAH/COX e PEI/COX, como apresentado nas FIG. 33 (B) e 34 (B), respectivamente.

FIGURA 33 – Espectros de fluorescência de 10 bicamadas do filme PAH/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 330 nm do filme PAH/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).

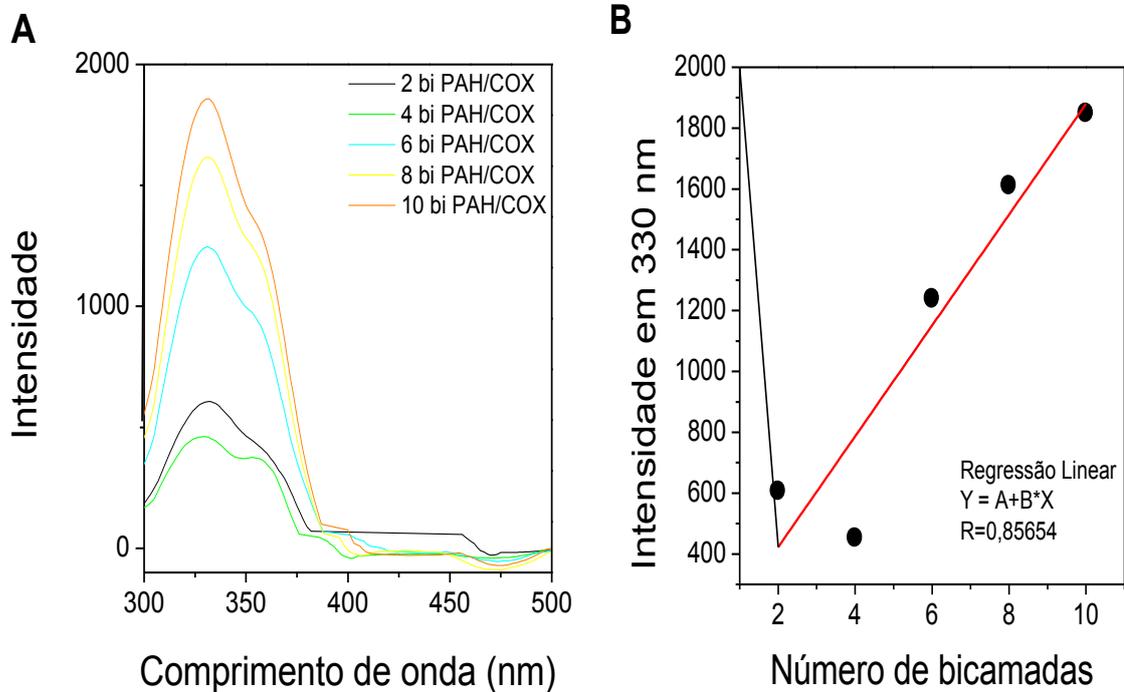
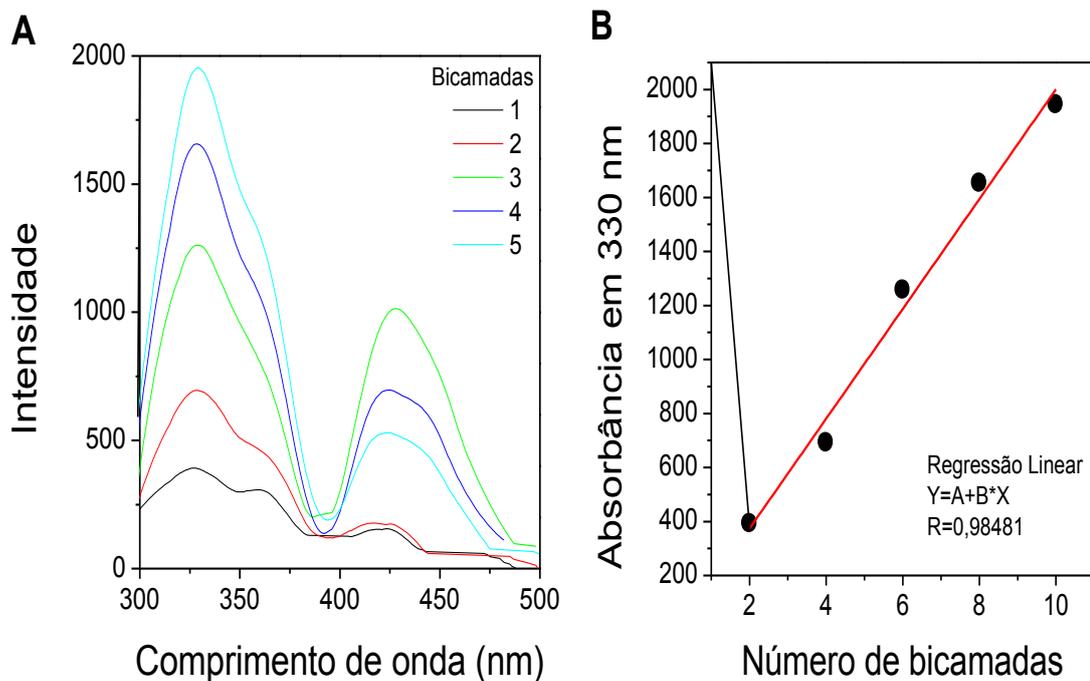


FIGURA 34 – Espectros de fluorescência de 10 bicamadas do filme PEI/COX (A) e o aumento do máximo de absorção em 330 nm do filme PEI/COX em função do número de bicamadas depositadas (B).



Os filmes foram excitados em 280 nm apresentaram uma emissão em 330, banda característica dos resíduos de aminoácidos triptofano e fenilalanina da COX, porém o filme da COX com o polieletrólito PEI apresentou um nova banda em 420nm, que pode estar associada à desnaturação e/ou agregação da enzima imobilizada em suporte sólido. O crescimento linear dos filmes foi observado com máximo de emissão em 330 nm, em função do número de bicamadas de PAH/COX e PEI/COX, como mostrado nas FIG. 32B e 33B, respectivamente. O coeficiente de correlação, R, dos filmes contendo PAH foi de 0,85 e PEI de 0,98 mais próximo de 1, o que indica maior número de molécula sendo absorvida ao filme.

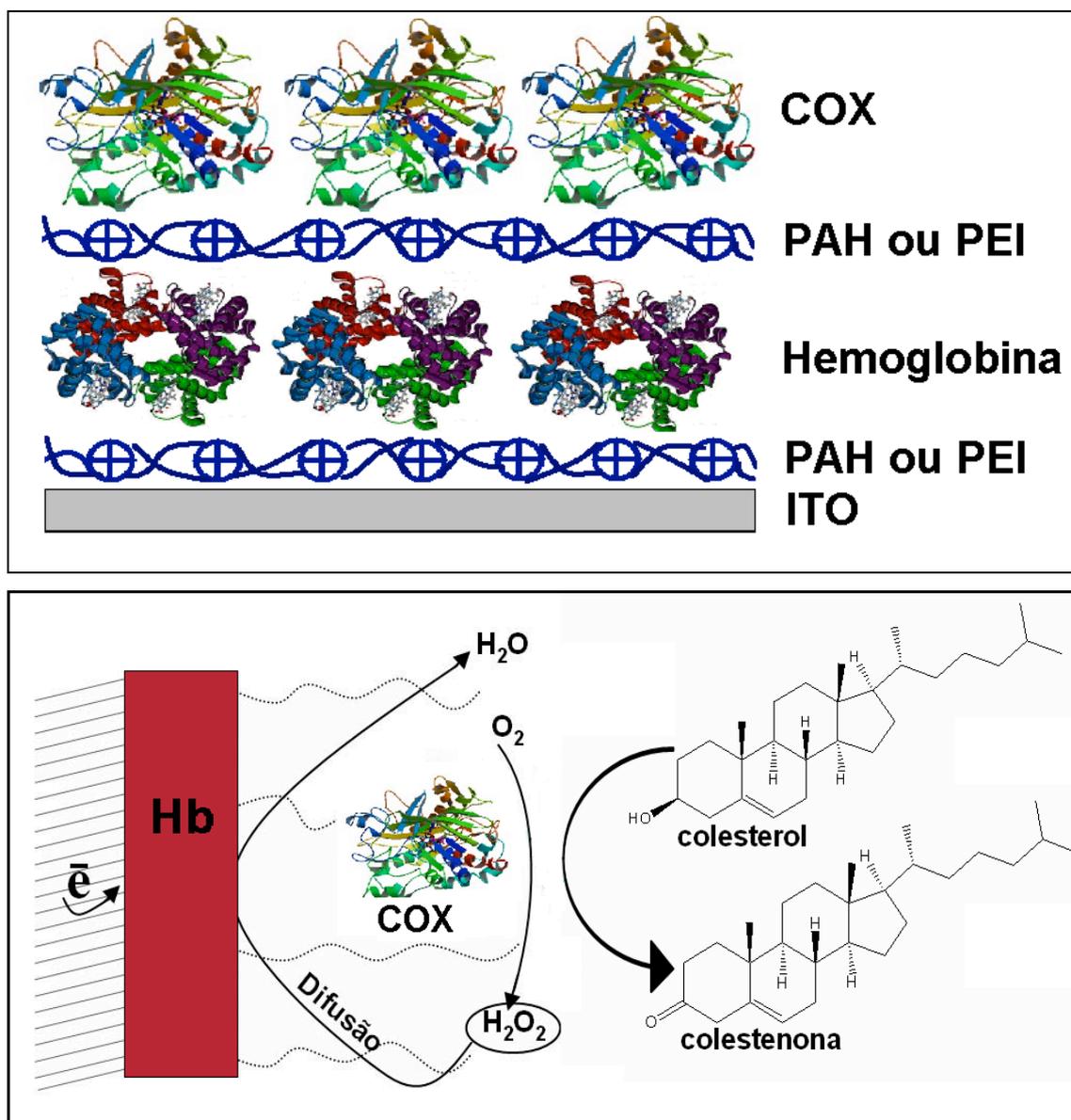
4.2.3. Biossensores de colesterol

A enzima colesterol oxidase catalisa a oxidação do colesterol na presença de oxigênio, que age como oxidante, produzindo colestenoa como produto de oxidação do colesterol, e H₂O₂ como produto de redução do O₂. A equação da reação enzimática está descrita na equação 2:



A FIG. 35 (A) apresenta a estrutura idealizada do filme automontado contendo a enzima colesterol oxidase alternado com os polieletrólitos PAH ou PEI imobilizados sobre ITO, previamente modificado com a hemoglobina. O mecanismo de detecção do colesterol com a geração de H₂O₂ está representado na FIG. 35 (B).

FIGURA 35– Representação esquemática do filmes PAH ou PEI/COX sobre ITO modificado com Hb (A). Mecanismo envolvido na detecção do colesterol com geração de H_2O_2 (B).



A resposta amperométrica para o eletrodo (biossensor) com 5 bicamadas (isto é ITO/HB/(PAH/COX)5 ou ITO/HB/(PEI/COX)5), mergulhado em 10 mL de tampão Tris como solução eletrolítica, e operando a 0,0 V (vs. SCE) é mostrada nas FIG. 36 e 37, respectivamente. A biofuncionalidade da COX e a viabilidade do biossensor são demonstradas pelo aumento na corrente de redução em função de sucessivas adições de colesterol incorporado em lipossomos. Cada adição corresponde a um aumento de 0,01 mmol/L na concentração de colesterol.

Após atingir a estabilidade de corrente adicionou-se alíquotas de colesterol em lipossomos, ácido ascórbico e ácido úrico. Esses foram utilizados nas medidas como possíveis interferentes, visto que esses são os principais interferentes em amostras reais. A resposta do biossensor pode ser observada pelo aumento na corrente de redução em função de sucessivas adições de colesterol, em que cada adição corresponde a um aumento de 0,01 mmol/L na concentração e uma redução na corrente de aproximadamente $0,045 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, para o filme ITO/HB/(PAH/COX)₅. O biossensor ITO/HB/(PEI/COX)₅ apresentou uma resposta similar, porém maior, com uma redução de aproximadamente $0,08 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$.

FIGURA 36 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PAH/COX)₅. Cada decréscimo da corrente corresponde ao aumento de 100 μL de colesterol 0,01 mmol/L.

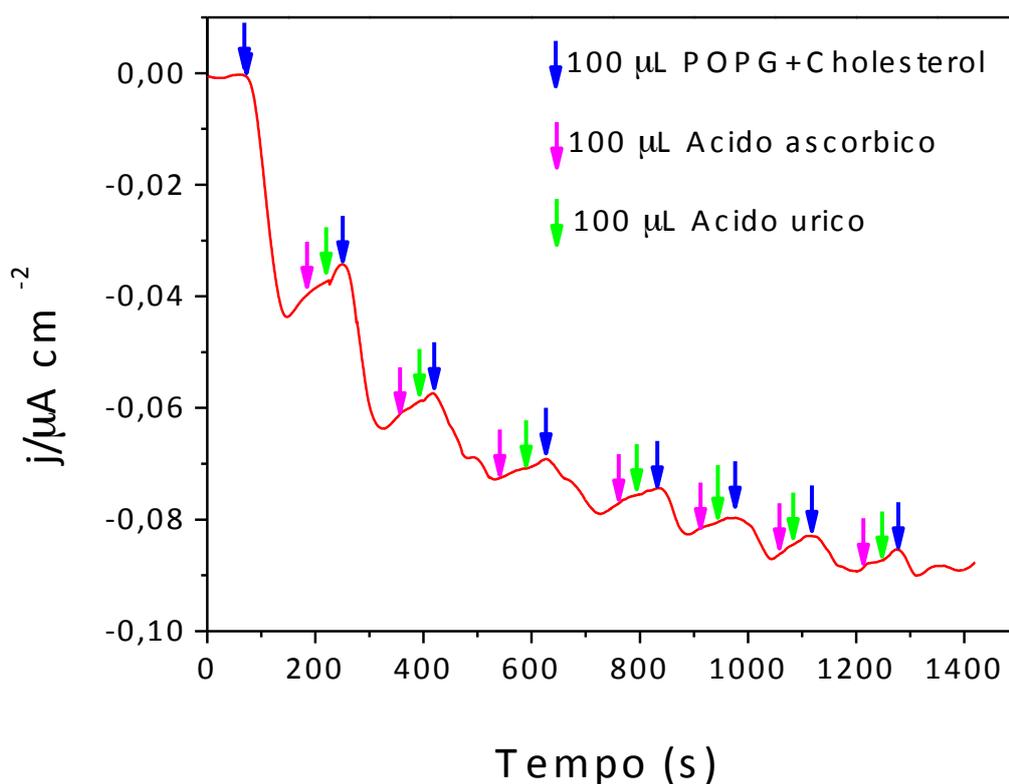
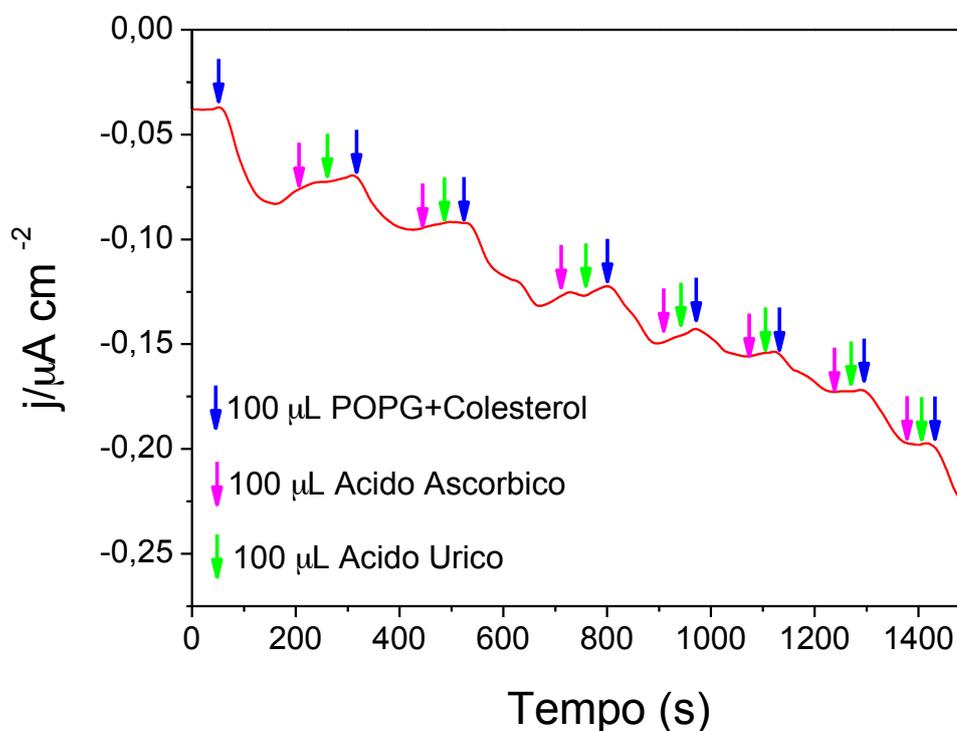
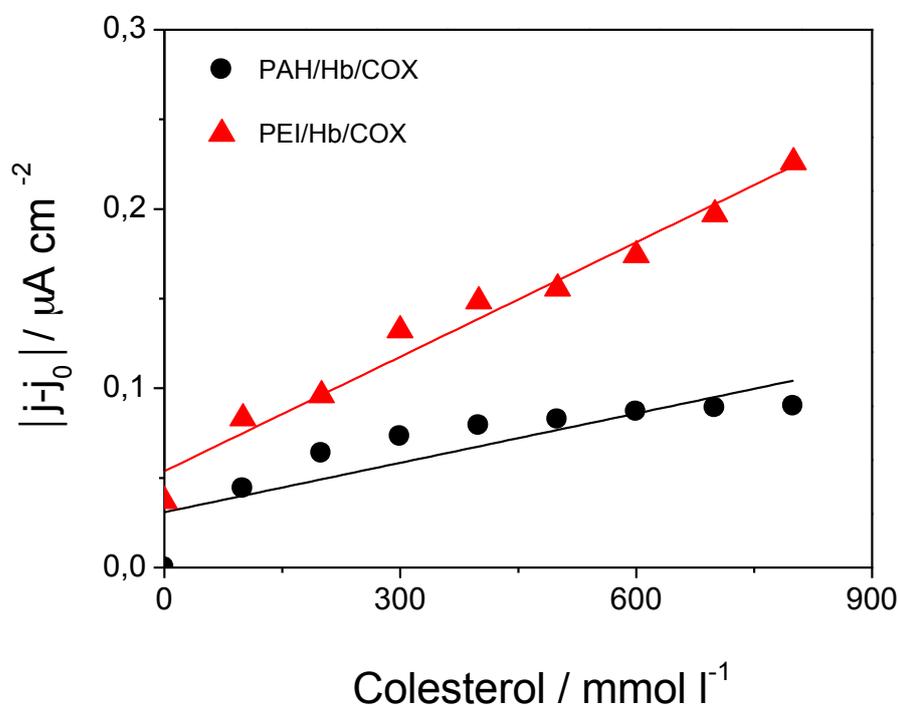


FIGURA 37 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PEI/COX)₅. Cada decréscimo da corrente corresponde ao aumento de 100 μL de colesterol 0,01 mmol/L.



A FIG. 38 apresenta a diferença entre os dois biossensores na resposta amperométrica. O biossensor contendo ITO/HB/(PEI/COX)₅ apresentou uma sensibilidade de $19,5 \mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, mais sensível à presença do colesterol do que o biossensor ITO/HB/(PAH/COX)₅ que apresentou sensibilidade de $3,39 \mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$. O limite de detecção foi de $0,002 \text{ mmol}^{-1}$ (considerando três vezes o ruído). Esta diferença pode ser associada ao empacotamento das moléculas sob o substrato, onde o PEI tem um empacotamento menos espaçado o que facilita uma maior adsorção das moléculas de enzimas, com isso uma maior sensibilidade⁸³.

FIGURA 38 – Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de colesterol dos biossensores ITO/Hb/(PAH/COX)₅ e ITO/Hb/(PEI/COX)₅.



A proposta principal desse trabalho foi estudar esses biossensores em amostras reais como a gema de ovo de galinha. Os filmes nanoestruturados PAH/COX e PEI/COX foram novamente montados sobre substratos de ITO previamente modificados com a hemoglobina (Hb) 2 bicamadas e então analisados como biossensor por amperometria. A resposta amperométrica para o eletrodo (biossensor) com 5 bicamadas (isto é ITO/Hb/(PAH/COX)₅ ou ITO/Hb/(PEI/COX)₅), mergulhado em 10 mL de tris como solução eletrolítica, e operando a 0,0 V (vs. SCE), é apresentada nas FIG. 39 e 40, respectivamente. A gema com 234 mg de colesterol foi separada do ovo e foi dissolvida em tampão Tris com uma concentração final de 0,1 mmol/L de colesterol e adicionada à solução eletrolítica. A funcionalidade do método como biossensor são demonstradas pelo aumento na corrente de redução em função de sucessivas adições de solução da gema de ovo, em que cada adição corresponde a um aumento de 0,01 mmol/L na concentração e uma redução na corrente.

FIGURA 39 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PAH/COX)₅. Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 μ L de colesterol em gema de ovo 0,01 mmol/L.

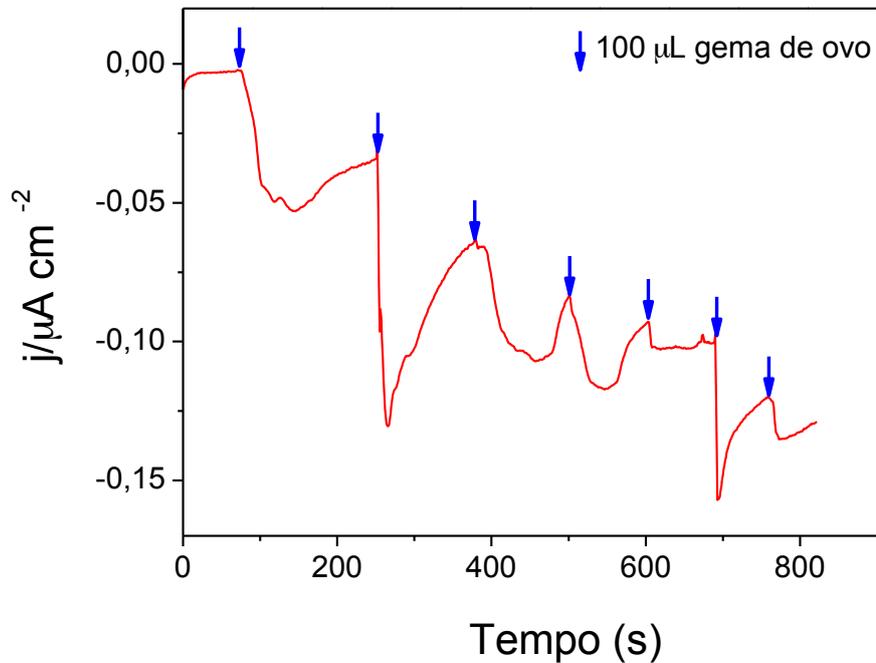
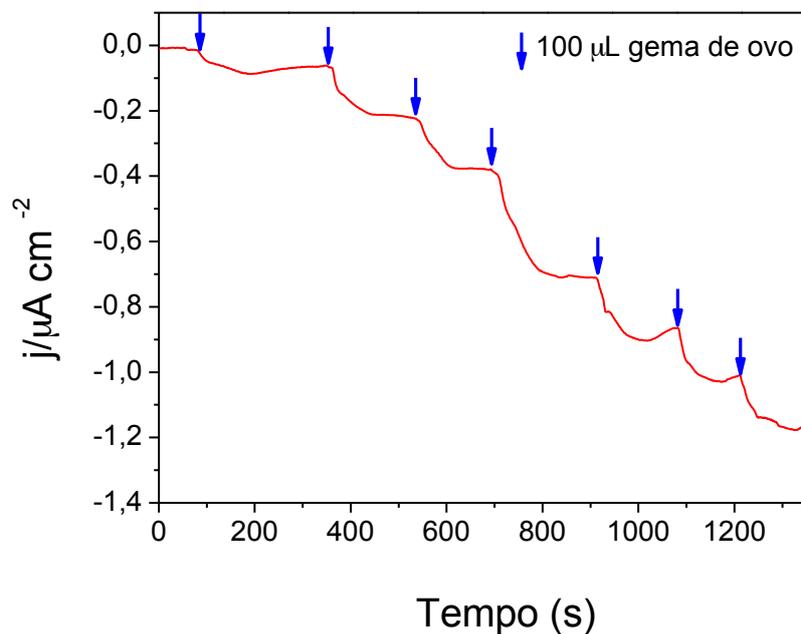
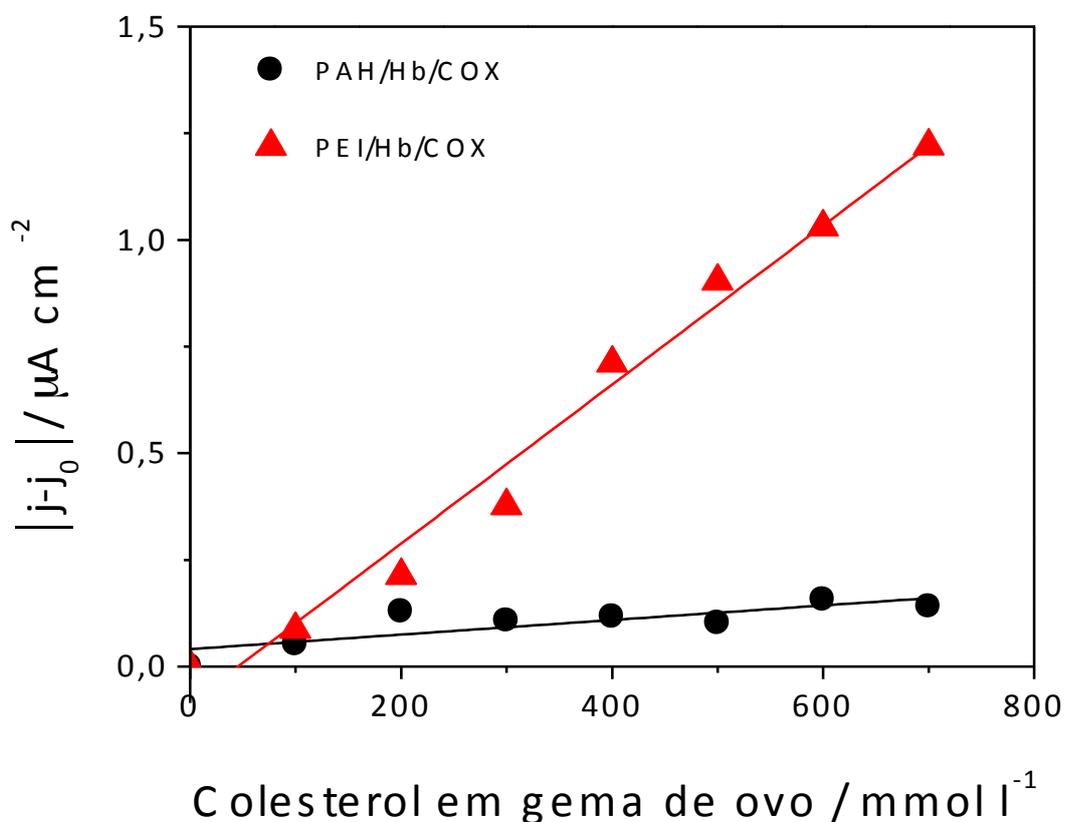


FIGURA 40 – Resposta amperométrica obtida a 0,0 V em 10 mL de tris, pH 7.4, com o biossensor ITO/HB/(PEI/COX)₅. Cada diminuição da corrente corresponde ao aumento de 100 μ L de colesterol em gema de ovo 0,01 mmol/L.



A FIG. 41 apresenta um curva analítica da diferença entre os dois biossensores na resposta amperométrica. O biossensor contendo ITO/HB/(PEI/COX)₅ obteve um sensibilidade de 81,25 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$ mostrando ser mais sensível à presença do colesterol na gema do ovo, comparado ao biossensor ITO/HB/(PAH/COX)₅ que apresentou uma sensibilidade de 9,49 $\mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$. O limite de detecção foi de 0,01 mmol^{-1} . Esta diferença como já mencionado anteriormente, pode ser associada ao empacotamento das moléculas sob o substrato, onde o PEI tem um empacotamento menos espaçado o que facilita uma maior adsorção das moléculas de enzimas, gerando maior sensibilidade⁸³.

FIGURA 41 – Curvas analíticas mostrando a variação da corrente em função da concentração de colesterol em gema de ovo dos biossensores ITO/HB/(PAH/COX)₅ e ITO/HB/(PEI/COX)₅.



5 CONCLUSÕES

A montagem de filmes nanoestruturados LbL com materiais de interesse biológico, mostrou-se apropriada nas diferentes aplicações propostas neste trabalho. Além da possibilidade de combinar num filme automontado múltiplos polímeros e diferentes biomoléculas sobre um substrato sólido, a integridade estrutural e funcional das biomoléculas imobilizadas foi mantida. Para manter a atividade dessas biomoléculas, cada sistema foi montado de maneira adequada à biomolécula, escolhendo-se condições de fabricação como tampão, pH, temperatura e polieletrólito, bem como para sua aplicação.

O crescimento dos filmes automontados com a hemoglobina contendo os dois polieletrólitos PAH e PEI apresentaram um bom crescimento em ambos os casos, porém o filme contendo o polieletrólito PEI apresentou um maior crescimento.

A adequação do pH e temperatura para a estocagem dos filmes contendo a hemoglobina teve um papel fundamental para o bom desempenho dos sensores, bem como para manter a atividade da proteína e estabilidade por períodos mais longos. Com intuito de desenvolver protótipos de biossensores, a hemoglobina foi estudada em filmes automontados, avaliada em dois métodos. Primeiramente a proteína hemoglobina foi automontada alternada com os polieletrólitos PAH e PEI e investigadas na detecção amperométrica do H_2O_2 , posteriormente a preservação da atividade da proteína foi investigada por tempo. O filme foi depositado sobre um substrato de ITO, que permitiu a detecção de H_2O_2 a 0,0 V versus SCE, as medidas foram realizadas em baixos potenciais mesmo não tendo respostas nas medidas de voltametria cíclica, devido a possíveis interferentes. A atividade biocatalítica dependeu da estrutura do polieletrólito, sendo que o eletrodo contendo PEI (10 bicamadas) apresentou maior sensibilidade de $23,28 \mu\text{Ammol}^{-1}/\text{cm}^2$, além de manter a sensibilidade estável por 15 dias consecutivos. A sensibilidade de ambos biossensores foi suficiente para possível aplicação em testes na detecção de H_2O_2 .

Filmes automontados com COX foram produzidos com os polieletrólitos PAH e PEI. Os crescimentos dos filmes foram acompanhados por espectroscopia de UV-vis e fluorescência e o filme PEI/COX apresentaram um crescimento linear o que indica que a mesma quantidade de moléculas de COX está sendo adsorvido, esse comportamento pode estar relacionada com a forma estrutural do PEI. Os filmes foram adsorvidos sobre eletrodos de ITO previamente modificado com hemoglobina, e então usados como sensores, com medidas de amperometria como método de detecção. Este biossensor mostrou respostas positivas, isso é a detecção do colesterol incorporado em lipossomos foi

efetiva com ambos os polieletrólitos e também foi investigada a interferência de espécies eletroativas como ácido úrico e ácido ascórbico, o polieletrólito PEI mostrou uma maior sensibilidade quando comparado ao PAH.

Os mesmos biossensores também foram testados com amostras reais como a gema de ovo de galinha. A gema foi dissolvida em tampão e utilizada nas medidas amperométricas para a detecção do colesterol contido na gema do ovo. Os sensores se mostraram eficiente na detecção do colesterol em amostras reais. A sensibilidade e seletividade foram atribuídas à natureza do filme ultrafino e ao reconhecimento molecular da enzima com o analito.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentarem boas perspectivas para possíveis desenvolvimento de protótipos de biossensores de colesterol, porém o seu emprego requer investigações mais aprofundadas. Por exemplo, é necessário investigar o efeito da alteração da arquitetura molecular dos filmes automontados, inclusive buscando otimização da sensibilidade e seletividade. Existe a necessidade também de fazer análises numa faixa maior de possíveis interferentes em amostras reais, dentre outros parâmetros. Há que se lembrar que embora as biomoléculas imobilizadas em filmes automontados preservem sua bioatividade, que é uma grande vantagem da técnica, suas funções não devem ser tão eficientes em sistemas vivos ou amostras reais, por isso a necessidade de análises mais aprofundadas.

Em conclusão, o trabalho nesta dissertação mostrou a possibilidade de novos dispositivos para diagnósticos clínicos e análises de alimentos, ficando em aberta a possibilidade de uma pesquisa mais aprofundada sobre o assunto .

REFERÊNCIAS

- [1] MACLACHLAN, J. et al. W. Biology cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *J. Ster. Bioc. Mol.*, v. 72, n. 5, p. 169-195, Apr. 2000.
- [2] LIU, J.; AGARWAL, M.; VARAHRAMYAN, K. Glucose sensor based on organic thin film transistor using glucose oxidase and conducting polymer. *Sens. Actuat. B.*, v. 135, n. 1, p. 195–199, Dec. 2008.
- [3] TANG, Z. et al. Biomedical applications of layer-by-layer assembly: from biomimetics to tissue engineering. *Adv. Mater.*, v. 18, n. 24, p. 3203–3224, 2006.
- [4] RUSLING, J. F. et al. Biochemical applications of ultrathin films of enzymes, polyions and DNA. *Chem. commun.*, v. 14, n. 2, p. 141-54, 2008.
- [5] OLIVEIRA JR., O. N. Langmuir-Blodgett films: properties and possible applications. *Braz. J. Phys.*, v. 22, p. 60-69, 1992.
- [6] NETZER, L.; SAGIV, J. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 105, p. 674-676, 1983.
- [7] NETZER, L.; ISCOVICI, R.; SAGIV, J. Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers—Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. *Thin Sol. Fil.*, v. 99, n. 1-3, p.235-241, 1983.
- [8] DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Scie.*, v. 277, n. 5330, p. 1232-1237, 1997.
- [9] SALDITT, T., SCHUBERT, U. S. Layer-by-layer self-assembly of supramolecular and biomolecular films. *Mole. Biot.*, v. 90, n. 1, p. 55-70, 2002.
- [10] MAK, W. C. et al. Novel biosensors for quantitative phytic acid and phytase measurement. *Bios. Bioelec.*, v. 19, p. 1029–1035, Apr. 2004.
- [11] BASU, A. K. et al. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectroch.*, v. 70, n. 2, p. 375-379, 2007.
- [12] BONGIOVANNI, C.; FERRI, T.; POSCIA, A.; VARALLI, M.; SANTUCCI, R.; DESIDERI, A. An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. *Bioelectroch.*, v. 54, n. 1, p. 17-22, 2001.

- [13] ZUCOLOTTO V. et al. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase. *Bios. Bioelec.*, v. 21, n. 7, p. 1320-1326, 2006.
- [14] ADÁNYI, N.; VÁRADI, M. Development of organic phase amperometric biosensor for measuring cholesterol in food sample. *Eur. Food. Res. Technol.*, v. 218, n. 1, p. 99–104, Oct. 2003.
- [15] JIA, W. Z.; WANG, K.; XIA, X. H. Elimination of electrochemical interferences in glucose biosensors. *TrACTren. in Analyt. Chem.*, v. 29, p. 306-318, Apr. 2010.
- [16] RICCI, F. et al. Polypyrrole Prussian Blue films with controlled level of doping: codeposition of polypyrrole and Prussian Blue. *J. Electroanal. Chem.*, v. 56, p. 85–92, Jun. 1994.
- [17] BONGIOVANNI, C. et al. An electrochemical multienzymatic biosensor for determination of cholesterol. *Bioelectroc.*, v. 54, n. 1, p. 17-22, Aug. 2001.
- [18] ZHENG, W.; LI, J.; ZHENG, Y. F. An amperometric biosensor based on hemoglobin immobilized in poly(caprolactone) film and its application. *Bios. Bioelec.*, v. 23, n. 10, p. 1562–1566, May 2008.
- [19] HE, Y.; ZHENG, J.; SHENG Q. Electrochemical surface structuring with polyaniline wrapped Hb for hydrogen peroxide biosensing. *J. Chin. Chem. Soc.*, v. 58, n. 6, 2011.
- [20] ZHAOA, H. Y. et al. Bioelectrochemistry of hemoglobin immobilized on a sodium alginate-multiwall carbon nanotubes composite film. *Bios. Bioelec.*, v. 24, n. 8, p. 2352–2357, April 2009.
- [21] LI, S. et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on an indium tin oxide electrode modified with implanted carboxy ions. *Microch. Acta.*, v. 167, n 1–2, p. 41–46, 2009.
- [22] HONG, J.; DAI, Z. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide and nitrite based on hemoglobin immobilized on one-dimensional gold nanoparticle. *Sens. Act. B.*, v. 140, p. 222–226, 2009.
- [23] QUANLIN, W.; GONGXUAN, L.; BAOJUN, Y. Hydrogen peroxide biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by a silica sol–gel film. *Bios. Bioelec.*, v. 19, n. 10, p. 1269–1275, maio 2004.
- [24] CHANGZHI, Z. et al. Highly sensitive and selective cholesterol biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin. *Anal. Biochem.*, v. 383, n. 1, p. 25–30, 2008.

- [25] BLODGETT, K. B. Films built by depositing successive monomolecular layer on a solid surface. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 57, n. 6, p. 1007-1022, June 1935.
- [26] DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *T. Sol. Fil.*, v. 210/211, Parte 2, p.831-835, 1992.
- [27] OLIVEIRA JR., O. N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Q.N.*, v. 24, p. 228-235, 2001.
- [28] ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. *J. Coll. Interf. Scie.*, v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.
- [29] SAGIV, J.; NETZER, L. A new approach to construction of artificial monolayer assemblies. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 105, n. 3, p. 674-676, 1983.
- [30] SAGIV, J.; NETZER, L.; ISCOVIC, R. Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers-Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. *T. Sol. Fil.*, v. 99, n. 1-3, p.235-241, 1983.
- [31] OLIVEIRA JR, O. N. et al. Handbook of polyelectrolytes and their applications, Los Angeles: American Scientific Publishers., v. 1, cap. 1, p. 1-37, 2002.
- [32] LVOV, Y. Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 117, n. 22, p. 6117-6123, 1995.
- [33] MOTESHAREI, K.; GHADIRI, M. R. Diffusion-limited size-selective ion sensing based on sam-supported peptide nanotubes. *J. Amer. Chem. Soc.*, v. 119, n. 42, p. 11306-11312, 1997.
- [34] SUKHORUKOV, G. B. et al. Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. *Bios. Bioelec.*, v. 11, n. 9, p. 913-922, 1996.
- [35] MONTREL, M. M. et al. Spectroscopic study of thin multilayer films of the complexes of nucleic acids with cationic amphiphiles and polycations: their possible use as sensor elements. *Actuat. B Chem.*, v. 42, n. 3, p. 225-231, 1997.
- [36] JEWELL, C. M.; LYNN, D. M. Multilayered polyelectrolyte assemblies as platforms for the delivery of DNA and other nucleic acid-based therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 60, n. 9, p. 979-999, 2008.

- [37] ONDA, M.; ARIGA, K.; KUNITAKE, T. Activity and stability of glucose oxidase in molecular films assembled alternately with polyions. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 87, n. 1, p. 69-75, 1999.
- [38] GRIESHABER, D. et al. Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures. *Sens.*, v. 8, p. 1400-1458, 2008.
- [39] WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. *Electroanal.*, v. 13, n. 12, p. 983-988, 2001.
- [40] CLARK, L. C. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO J.*, v. 2, p. 41-48, 1956.
- [41] CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.
- [42] YELLOW SPRING INSTRUMENT COMPANY. Technology and environmental monitoring. Disponível em: <<https://www.yssi.com/>> Acesso em: 05 dez. 2011.
- [43] RICCI, F.; PALLESCHI, G. Sensor and biosensor preparation, optimization and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, v. 21, p. 389-407, 2005.
- [44] ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, v. 23, n. 7, p. 1083-1100. 2008.
- [45] FAN, X. et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal. Chim. Acta.*, v. 620, n. 1-2, p. 8-26, 2008.
- [46] TOMBELLI, S.; MINUNNI, M.; MASCINI, M. Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. *Meth.*, v. 37, n. 1, p. 48-56, 2005.
- [47] KARYAKIN, A. A.; KARYAKINA, E. E.; GORTON, L. Prussian-Blue based amperometric biosensors in flow-injection analysis. *Talan.*, v. 43, p. 1597-1606, 1996.
- [48] ZUCOLOTTO, V. et al. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. *Anal. Chem.*, v. 79, n. 5, p. 2163-2167, 2007.
- [49] CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. *Bios. Bioele.*, v. 17, p. 441-456, 2002.
- [50] BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. É.; LAGIER, C. M. Assembling amperometric biosensors for clinical diagnostics. *Sens.*, v. 8, p. 1366-1399, 2008.

- [51] HOSHI, T.; SAIKI, H.; ANZAI, J.-I. Amperometric uric acid sensors based on polyelectrolyte multilayer films. *Talan.*, v. 61, p. 363-368, 2003.
- [52] KATZ, E.; WILLNER, I. Angew. Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew. Chem. Inter.*, v. 43, n. 45, p. 6042–6108, novembro, 2004.
- [53]MEGE, R. M.; BOURDILLON, C. Nickel controls the reversible anaerobic activation/inactivation of the desulfovibriogigas hydrogenase by the redox potential. *J.Biol.Chem.*, v. 260, p. 14701-14706, 1985.
- [54] LOJOU, E'; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electrocer.*, v. 16, n. 1, p. 79–91, 2006.
- [55] YUNHUA, W.; SHENGSHUI, H. Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins. *Microch. Acta.*, v. 159, n. 1-2, p. 1–17, 2007.
- [56] UMA QUÍMICA irresistível. <<http://umaquimicairresistivel.blogspot.com/2011/07/nossa-quimica.html>> Acesso em: 07 dez. 2011.
- [57] PREÂMBULOS sobre a hemoglobina. Disponível em: <<http://misodor.com/HEMOGLOBINA.php>> Acesso em: 07 dez. 2011.
- [58] XU, J. et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized by methacrylic acid. *Rus. J. Electroch.*, v. 44, n. 9, p. 1079–1086, 2008.
- [59] HEMOGLOBIN. Disponível em: <<http://adam.about.net/encyclopedia/Hemoglobin.htm>> Acesso em: 10 dez. 2011.
- [60] KAFI, A. K. M. et al. Amperometric biosensor based on direct electrochemistry of hemoglobin in poly-allylamine (PAA) film. *T. Sol. Film.*, v. 515, p. 5179–5183, 2007.
- [61] SUN, Z. et al. Direct electron transfer and electrocatalysis of hemoglobin in layer-by-layer films assembled with Al-MSU-S particles. *Tal.*, v.74, n. 5, p. 1692–1698, 2008.
- [62] ZHAO, C. et al. Highly sensitive and selective cholesterol biosensor based on direct electron transfer of hemoglobin. *Anal. Biochem.*, v. 383, p. 25–30, 2008.
- [63] FOSTER, R.; CASSIDY, J.; O'DONOGHUE, E. Electrochemical diagnostic strip device for total cholesterol and its subfractions. *Electroanal.*, v. 12, n. 9, p. 716-721, 2000.

[64] RAM, M. K. et al. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Bios. Bioelect.*, v. 16, n. 9-12, p. 849- 856, 2001.

[65] KATRLÍK, J.; VALACH, M.; JANTOŠOVÁ, L. Interference-free amperometric biosensor for direct cholesterol determination. *Tom. LII.*, v. 52, p. 116-124, 2005.

[66] RAM, M. K. et al. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Bios. Bioelect.*, v. 16, n. 9-12, p. 849- 856, 2001.

[67] BASU, A. K. et al. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry.*, v. 70, p. 375-379, 2007.

[68] BANSI, D.; MALHOTRA, A. K. Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor. *Bioelectroch.*, v. 518, p. 614–620, 2009.

[69] YILDIRIMOĞLU, F. et al. Preparation of a polypyrrole-polyvinylsulphonate composite film biosensor for determination of cholesterol based on entrapment of cholesterol oxidase. *Sens.*, v. 9, p. 6435-6445, 2009.

[70] NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehinger principles of biochemistry*. 3rd. ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 280.

[71] CITOLOGIA/ membrana celular. Disponível em: <http://pt.wikibooks.org/wiki/Citologia/Membrana_Celular>. Acesso em: 13 dez. 2011.

[72] CHAN, Y. H. M.; BOXER, S. G. Model membrane systems and their applications. *Curr Opin Chem Biol.*, v. 11, p. 581-587, 2007.

[73] REVISTA ELETRÔNICA DO DEPARTAMENTO DE QUÍMICA – UFSC. Disponível em: <<http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/colesterol.html>> Acesso em: 15 dez. 2011.

[74] SHARMA, A.; SHARMA, U. S. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Inter. J. Pharm.*, v. 154, p. 123-140, 1997.

[75] AVANTI polar lipids: the phospholipids and sphingolipid people home page. Disponível em: <<http://www.avantilipids.com/>>. Acesso em: 16 dez. 2011.

[76] RCSB protein data bank. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 18 dez. 2011.

[77] SIGMA Aldrich. Disponível em: <www.sigmaaldrich.com/> Acesso em: 18 dez. 2011.

[78] SKOOG, DOUGLAS. A. *Principles of instrumental analysis*. Philadelphia: Harcourt Brace College Publishers, 1998. p. 299-444.

[79] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Springer, 2006.

[80] POTENCIOSTATO. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato>> Acesso em: 18 dez. 2011.

[81] JANIN, J. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nat.*, v. 277, p. 491-492, 1979.

[82] MORAES, M. L. et al. Phytase immobilization on modified electrodes for amperometric biosensing. *Sens. Actuat. B Chem.*, v. 131, n. 1, p. 210-215, 2008.

[83] MORAES, M. L. et al. Immobilization of cholesterol oxidase in LbL films and detection of cholesterol using ac measurements. *Mat. Scie. Eng.*, v. 29, p. 442-447, 2009.

[84] Dzyadevych, S. V.; Arkhypova, V. N.; Soldatkin, A. P.; El'skaya, A. V.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N., *Irbm* 2008, 29 (2-3), 171-180.

[85] Lobo, R. F. M.; Pereira-da-Silva, M. A.; Raposo, M.; Faria, R. M.; Oliveira, O. N., The morphology of layer-by-layer films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy, *Nanotechnology* 2003, 14 (1), 101-108.

