

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS PARA SUSTENTABILIDADE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM  
URICASE OXIDASE ASSOCIADO COM NANOPARTICULAS DE PLATINA  
PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO.**

**EDUARDO ALMEIDA ANUNCIÇÃO**

**SOROCABA – SP  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS PARA SUSTENTABILIDADE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO BASEADO EM  
URICASE OXIDASE ASSOCIADO COM NANOPARTÍCULAS DE PLATINA  
PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO.**

**EDUARDO ALMEIDA ANUNCIÇÃO**

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

Orientação: Prof(a). Dr.(a) Marystela Ferreira

**SOROCABA-SP  
2017**

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DO EXAME DE QUALIFICAÇÃO DE  
EDUARDO ALMEIDA ANUNCIÇÃO  
APRESENTADO AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
MATERIAIS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 28 DE MARÇO  
DE 2017.

BANCA EXAMINADORA

MARYSTELA FERREIRA

ORIENTADOR  
UFSCAR-SOROCABA

RAFAEL FURLAN DE OLIVEIRA  
CNPEM

JANAINA SOARES SANTOS  
UFSCAR-SOROCABA

Almeida Anunciação, Eduardo

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO  
BASEADO EM URICASE OXIDASE ASSOCIADO COM  
NANOPARTICULAS DE PLATINA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO  
ÚRICO. / Eduardo Almeida Anunciação. -- 2017.

84 f. : 30 cm.

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

Orientador: Marystela Ferreira

Banca examinadora: JANAINA SOARES SANTOS, RAFAEL FURLAN  
DE OLIVEIRA

Bibliografia

1. Biossensor. 2. Ácido úrico. 3. Uricase. I. Orientador. II. Universidade  
Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**EDUARDO ALMEIDA ANUNCIÇÃO**

“DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO  
BASEADO EM URICASE OXIDASE ASSOCIADO COM  
NANOPARTÍCULAS DE PLATINA PARA DETECÇÃO DE ÁCIDO  
ÚRICO”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Nanociência e Nanotecnologia de Materiais, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 28 de março de 2017.

Orientador(a)

*Marystela Ferreira*

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

Examinador(a)

*Janaina S. Santos*

Dr. (a) Janaina Soares Santos  
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)

*Rafael Furlan de Oliveira*

Dr. (a) Rafael Furlan de Oliveira  
CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas



**“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais volta ao seu tamanho original.” –  
Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

Ao Divino Mestre,

À minha orientadora Profa. Dra. Maristela Ferreira, pela amizade, constância, confiança, dedicação, apoio, desde à época de graduação até minha orientação.

Aos meus pais Benedito e Márcia, pelo apoio, dedicação, segurança e condições favoráveis à minha educação.

À minha noiva Caroline, por todo amor, compreensão e incentivo.

Ao meu irmão Leonardo e meu primo Guilherme pelos momentos de distração.

À minha amiga de muitos anos, Daniela Riello.

Aos meus amigos Thiago, Ricardo, Adriano, Jefferson, Bruna e Natalia por toda a caminhada na graduação, apoio e companheirismo e, especialmente à Juliana, pela amizade e pelo auxílio durante o mestrado.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Daniela, Paula, Michele e Celina, pelas discussões científicas, por terem contribuído em todas as etapas da minha caminhada científica, e a todo o grupo de pesquisa.

À minha amiga Dra. Daiane Piva de Carvalho Rangel e à Profa. Dra. Ana Lúcia Brandl, pelas preciosas contribuições no exame de qualificação do mestrado.

Ao Prof. Dr. José Roberto Ribeiro Bortoleto, da UNESP Sorocaba, pelas análises de AFM. Ao colega Ms. Jhones Luiz Oliveira e ao Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pelas análises de NTA e DLS.

Aos membros da bancada Dra. Janaina Soares Santos e o Dr. Rafael Furlan de Oliveira, pela imensa contribuição.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais PPGCM-So, UFSCar – campus Sorocaba.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

## RESUMO

O ácido úrico é uma substância endógena produzida a partir do metabolismo das purinas. A concentração de ácido úrico sérico no organismo humano considerado normal é entre 0,24 - 0,52 mmol.L<sup>-1</sup>. Altos níveis de ácido úrico no organismo levam a um quadro conhecido como hiperuricemia. Portanto, o monitoramento de ácido úrico no organismo é de grande importância. Neste trabalho apresentamos biossensores amperométricos baseados na associação da enzima UOx com nanopartículas de platina para detecção de ácido úrico. A técnica utilizada para a fabricação dos filmes que compõem o biossensor foi a Layer-by-Layer (LbL). Duas técnicas foram utilizadas para a síntese de nanopartículas para a construção de duas arquiteturas diferentes na construção dos filmes. Na primeira arquitetura, as nanopartículas foram depositadas *in situ* sobre um colchão de polieletrólitos – polietilenoimina (PEI) e polivinil sulfato de sódio (PVS) – pela redução do ácido hexacloroplatínico hexaidratado com boroidreto de sódio. As bicamadas compostas por (PEI/UOx)<sub>n</sub> foram depositadas sobre colchão contendo nanopartículas de platina depositadas *in situ*. Na segunda arquitetura, as nanopartículas foram sintetizadas misturando-se solução de PEI com solução de ácido hexacloroplatínico e solução de borohidreto de sódio. Esta solução foi depositada alternando-se com solução enzimática. As análises amperométricas foram realizadas em potencial +0,347 V, com adições sucessivas de ácido úrico de concentração 2 mmol.L<sup>-1</sup> em uma célula eletroquímica contendo tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4. Para a primeira arquitetura, o limite de detecção encontrado pelo método amperométrico foi de 5,17 μmol.L<sup>-1</sup> com a faixa linear de detecção compreendido no intervalo entre 3,92 - 11,3 μmol.L<sup>-1</sup>. Para a segunda arquitetura, o limite de detecção encontrado pelo método amperométrico foi de 4,68 μmol.L<sup>-1</sup> com a faixa linear de detecção compreendido no intervalo entre 14,18 – 55,56 μmol.L<sup>-1</sup>, e para o método DPV os valores de LD e faixa linear de detecção encontrados foram 0,11 μmol.L<sup>-1</sup> e  $1,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$  partículas/mL, respectivamente. Os biossensores apresentaram limites de detecção próximos aos valores encontrados na literatura, mostrando-se eficientes para detecção de ácido úrico.

**Palavras chave:** Biossensor, técnica Layer-by-Layer, uricase, ácido úrico, nanopartículas de platina.

## ABSTRACT

Uric acid is an endogenous substance produced from the metabolism of purines. The concentration of serum uric acid in the human body considered normal is between 0.24 - 0.52 mmol.L<sup>-1</sup>. High levels of uric acid in the body lead to a condition known as hyperuricemia. Therefore, the monitoring of uric acid in the body is of great importance. In this work we present amperometric biosensors based on the association of the enzyme UOx with platinum nanoparticles to detect uric acid. The technique used to assemble the films that compose the biosensor was the Layer-by-Layer (LbL). Two techniques were used for the synthesis of nanoparticles for the construction of two different film architectures. In the first architecture, the nanoparticles were deposited in situ on a polyethyleneimine (PEI) and sodium polyvinyl sulfate (PVS) film - by reducing hexachloroplatinic acid hexahydrate with sodium borohydride. The bilayers composed of (PEI/UOx)<sub>n</sub> were deposited on a film containing platinum nanoparticles deposited in situ. In the second architecture, the nanoparticles were synthesized by mixing PEI solution with hexachloroplatinic acid solution and sodium borohydride solution. This solution was deposited alternating with enzymatic solution. The amperometric analyses were performed at +0.347 V potential, with successive additions of 2 mmol.L<sup>-1</sup> of uric acid in an electrochemical cell containing phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. For the first architecture, the limit of detection found by the amperometric method was 5.17 μmol.L<sup>-1</sup> with the linear detection range comprised in the range between 3.92 - 11.3 μmol.L<sup>-1</sup>. For the second architecture, the limit of detection found by the amperometric method was 4.68 μmol.L<sup>-1</sup> with a linear detection range between 14.18 - 55.56 μmol.L<sup>-1</sup>. For the same architecture an using the differential pulse voltammetry method the values of limit of detection and linear detection range were 0.11 μmol.L<sup>-1</sup> and particles / mL, respectively. The biosensors presented limits of detection close to the values found in the literature for other biosensor proving to be efficient for the detection of uric acid.

**Key words:** Biosensor, Layer-by-Layer technique, uricase, uric acid, platinum nanoparticles

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Configuração típica de um biossensor. Adaptado de Doelle et. at., 2009 <sup>11</sup> ..5	5
Figura 2 - Funcionamento básico de diferentes biossensores. (A) biossensores de primeira geração; (B) biossensores de segunda geração; (C) biossensores de terceira geração. Adaptado de Putzbach & Ronkainen, 2013 <sup>12</sup> .....	7
Figura 3 - Construção de filme nanoestruturado pela técnica LbL. Adaptado de Decher & Schilenoff, 2012 <sup>15</sup> .....	12
Figura 4 - Estrutura química de uma unidade repetitiva de PEI. ....	13
Figura 5 - Estrutura tridimensional da UOx. <sup>28</sup> .....	14
Figura 6 - Estrutura química do ácido úrico. ....	15
Figura 7 - Comprimentos de onda relacionados com os tipos de radiação e os níveis de energia. Adaptado de Faust, 1992 <sup>34</sup> .....	19
Figura 8 - Transição eletrônica em espectroscopia UV-vis. Adaptado de (Faust, 1992) <sup>34</sup> .....	20
Figura 9 - (a) curva potencial vs tempo, $E_i$ é o potencial inicial e $E_1$ e $E_2$ são potenciais limites (b) voltamograma cíclico típico, $E_p^a$ é o potencial de pico da corrente catódica e $E_p^c$ é o potencial de pico da corrente anódica. ....	26
Figura 10 - Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial. Figura adaptada de .....	27
Figura 11 - Esquema de deposição do colchão. ....	33
Figura 12 - Esquema da síntese das nanopartículas de platina <i>in situ</i> . ....	34

Figura 13 - Esquema da montagem das bicamadas compostas por PEI/UOx. ....	35
Figura 14 - Esquema da disposição dos eletrodos na cela eletroquímica em solução eletrolítica para caracterização dos filmes LbL. ....	36
Figura 15 - espectro de absorção da UOx em solução PBS. Banda em aproximadamente $\lambda = 290$ nm. ....	38
Figura 16 - Espectro de absorção UV-vis para o crescimento de bicamadas de (PEI/UOx) sobre colchão (PEI/PVS) com nanopartículas depositadas <i>in situ</i> . Inserido: absorbância do filme em 290 nm em função do número de bicamadas do filme com arquitetura final do filme (PEI/PVS) <sub>5</sub> /PtNPs/(PEI/UOx) <sub>9</sub> . ....	39
Figura 17 - Espectro de absorbância UV-vis para o crescimento das bicamadas de (PtNPs-PEI/UOx) sobre colchão (PEI/PVS). Inserido: crescimento da absorção das bicamadas no comprimento de onda da principal banda da UOx (290 nm). Arquitetura final do filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>10</sub> ....	41
Figura 18 - Imagens de superfície 2D obtida por AFM do substrato (a) do lado contendo apenas vidro e (b) do lado contendo ITO. ....	42
Figura 19 - Imagens 2D da superfície do filme contendo (a) cinco bicamadas de PEI/PVS e (b) uma bicamada de PEI/UOx sobre colchão de (PEI/PVS) <sub>5</sub> . ....	43
Figura 20 - Imagens 2D da superfície dos filmes contendo (a) PtNP depositadas sobre colchão de (PEI/PVS) <sub>5</sub> e (b) bicamada de PEI/UOx sobre filme de NPsPt/(PEI/PVS) <sub>5</sub> . ....	43
Figura 21 - Imagem das nanopartículas de Pt dispersas em solução aquosa obtidos por NTA. ....	44

Figura 22 - Gráfico de distribuição da concentração de nanopartículas de Pt em função de seu diâmetro.....	45
Figura 23 - Voltametrias cíclicas em diferentes velocidades de varredura para diferentes eletrodos. ....	48
Figura 24 - Amperometria para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /PtNPs/(PEI/UOx) <sub>5</sub> . Inserido: curva analítica das adições de ácido úrico com faixa linear entre 3,92 e 11,3 μmol.L <sup>-1</sup> .....	50
Figura 25 - Amperometria do filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> . Inserido: curva analítica das adições de ácido úrico com faixa linear entre 14,18 e 55,56 μmol.L <sup>-1</sup> .....	52
Figura 26 - DPV para as diferentes substâncias. (a) AA, (b) AU, (c) DA para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> .....	53
Figura 27 - DPV para os picos de corrente da DA e AU medidos simultaneamente para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> .....	54
Figura 28 - a DPV para os picos de corrente do AA e AU medidos simultaneamente para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> .....	54
Figura 29 - DPV para o filme de arquitetura ITO/(PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> em solução salina NaCl 0,1 mol.L <sup>-1</sup> .....	55
Figura 30 - DPV em NaCl 0,1 mol/L para o (a) AU e (b) AA em diferentes concentrações para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> . ....	56
Figura 31 - Voltamograma obtido por DPV para a adição simultânea de AU e AA para o filme (PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI/UOx) <sub>3</sub> .....	56



Figura 32 - Curva analítica para o AU obtido a partir do voltamograma para diferentes concentrações para o filme  $(PEI/PVS)_3/(PtNPs-PEI/UOx)_3$ .....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA – Ácido Ascórbico
- AFM – Microscopia de Força Atômica
- AU – Ácido Úrico
- CE – Contra Eletrodo
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- ECS – Eletrodo de calomelano Saturado
- ER – Eletrodo de Referência
- ET – Eletrodo de Trabalho
- FAD - Flavina Adenina Dinucleotídeo
- GOx – Glicose Oxidase
- HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
- HRP – Peroxidase de Rábano
- ITO – *Indium Tin Oxide* (Óxido de Índio dopado com estanho)
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
- LB – Langmuir-Blogett
- LbL – Layer-by-Layer
- LD – Limite de Detecção
- LQ – Limite de Quantificação
- M.M. – Massa Molar
- NP - Nanopartícula
- PAA - Poliamidaimina
- PB – Azul da Prússia
- PBS – Tampão Fosfato Salino
- PEI – Poli (etileno imina)
- PMAA - Polimetacrilato
- PLL – Poli(L-lisina)
- PSS – Poliestireno Sulfonato de Sódio
- PVS – Poli (vinil sulfonato de sódio)
- UOx – Urato Oxidase
- UV-vis – Ultravioleta-visível



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Sensores e biossensores: conceitos gerais</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Biossensores eletroquímicos enzimáticos.....	6
2.1.2. Sensores enzimáticos para ácido úrico. ....	9
<b>2.2. Filmes automontados</b> .....	<b>10</b>
2.2.1. Layer-by-Layer.....	10
2.2.2. Polieletrólitos .....	12
<b>2.3. Enzima Uricase</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4. Ácido úrico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5. Nanopartículas</b> .....	<b>17</b>
<b>3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Espectroscopia UV-vis</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Microscopia de Força Atômica</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4. Espalhamento Dinâmico de Luz</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5. Potencial Zeta (<math>\zeta</math>)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6. Cronoamperometria</b> .....	<b>24</b>
<b>3.7. Voltametria</b> .....	<b>25</b>
3.7.1. Voltametria Cíclica .....	25
3.7.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	27
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1. Gerais</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. Específicos</b> .....	<b>29</b>

<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1. MATERIAIS</b> .....	30
5.1.1. UOx e AU .....	30
5.1.2. Nanopartículas de Pt.....	30
5.1.3. Tampão PBS.....	30
5.1.4. Tampão borato de sódio .....	31
5.1.5. Substratos .....	31
<b>5.2. MÉTODOS</b> .....	31
5.2.1. Hidrofilização dos substratos .....	31
5.2.2. Preparo de soluções tampão.....	32
5.2.3. Preparo de soluções de UOx e AU.....	32
5.2.4. Polieletrólitos .....	32
5.2.5. Síntese das nanopartículas de Pt.....	32
5.2.6. Montagem dos filmes para caracterização espectroscópica. ....	33
5.2.7. Deposição das PtNP's <i>in situ</i> .....	33
5.2.8. Montagem dos filmes para caracterização eletroquímica .....	35
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6.1. Caracterização dos filmes</b> .....	37
6.1.1. Caracterização por espectroscopia UV-vis. ....	37
6.1.2. Caracterização por AFM para os filmes de arquitetura (PeI/PVS) <sub>5</sub> /PtNPs/(PeI/UOx) .....	41
6.1.3. Caracterização das nanopartículas em suspensão por NTA e DLS .....	44
6.1.4. Resultados eletroquímicos .....	46
6.1.5. Determinação da área ativa do eletrodo .....	46
6.1.6. Medidas amperométricas .....	50

6.3.1.	Estudo de potenciais interferentes .....	52
6.3.2.	Voltametria de Pulso Diferencial.....	53
<b>7.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>60</b>
<b>8.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>62</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Estudos populacionais mostram que altos níveis de urato sérico estão relacionados com o risco em desenvolver gota, um tipo de artrite inflamatória que está associada com a hiperuricemia.<sup>1</sup> Os seres humanos são os únicos mamíferos que desenvolvem gota espontaneamente. O ácido úrico (AU) é gerado a partir do metabolismo da purina e, na maioria dos peixes, anfíbios e mamíferos não primatas, o AU é metabolizado pela enzima uricase (UOx) produzindo um composto mais solúvel, a alantoína. Em seres humanos, devido à ausência de UOx, combinada com a reabsorção de urato através da alimentação, os níveis de urato no plasma são cerca de 10 vezes mais elevados que na maior parte dos outros mamíferos. Isto explica o fato da hiperuricemia ser desenvolvida apenas em humanos.<sup>1</sup>

O papel desempenhado pelo AU no organismo humano é incerto. Acredita-se que os uratos sirvam como antioxidante, eliminando oxigênio singlete (molécula de oxigênio eletronicamente excitada) e radicais livres. Porém, a hiperuricemia pode ser danosa à saúde dos seres humanos, comprovadamente responsável pela gota e doenças renais, além de ser considerado um indicador de diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares e leucemia.<sup>1,2,3,4</sup> Por outro lado, pacientes com a doença de Wilson e síndrome de Fanconi apresentam, normalmente, baixos níveis de AU.<sup>4</sup> De um modo geral são considerados níveis normais de AU em soro sanguíneo concentrações entre 0,24-0,52 mmol.L<sup>-1</sup> e na urina 1,4 a 4,4 mmol.L<sup>-1</sup>.<sup>4</sup>

Por estar relacionado a diversas doenças, a quantificação e o monitoramento dos níveis de AU sérico é de grande importância. Atualmente, o AU pode ser quantificado em laboratório por (a) método fotométrico baseado na redução do AU pelo ácido fosfotúngstico em pH alcalino, gerando uma coloração azulada; (b) cromatografia líquida

de alta eficiência (HPLC) em coluna longa de fase reversa com detecção por absorvância UV ou espectro de massa; (c) métodos baseados na utilização de UOx. Neste último caso, o AU pode ser quantificado diretamente por espectroscopia no UV-vis (absorvância característica em 290 nm) ou de forma indireta, que quantifica o peróxido de hidrogênio formado pela catálise através da UOx. O peróxido de hidrogênio pode ser quantificado eletroquimicamente com a imobilização de UOx em um eletrodo.<sup>5,6</sup>

Nos últimos anos, tem emergido como alternativa analítica dispositivos conhecidos como biossensores, que utilizam reações bioquímicas para detectar analitos específicos.<sup>3</sup> Um biossensor consiste essencialmente de um biocatalisador e um transdutor. Biossensores apresentam várias vantagens, como alta seletividade e especificidade, juntamente com a instrumentação de baixo custo. O uso de biossensores revolucionou o conceito de auto teste pelos pacientes, especialmente diabetes.<sup>7</sup>

Este trabalho tem como objetivo desenvolver um biossensor amperométrico para detecção de AU baseado em enzima UOx depositada sobre eletrodo de ITO modificado com nanopartículas de Pt. O biossensor será construído pela técnica Layer-by-Layer (LbL). A eficiência do biossensor construído será comparada com outros trabalhos citados na literatura.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Sensores e biossensores: conceitos gerais

Sensores são dispositivos capazes de reconhecer e transformar estímulos físicos ou químicos em um sinal mensurável.<sup>8</sup> Sensores físicos são utilizados para medir quantidades físicas como força, pressão, temperatura, velocidade. Sensores químicos são dispositivos que convertem uma informação química, como concentração de uma ou mais espécies químicas, em uma quantidade física mensurável, como corrente elétrica. Este processo é chamado de transdução de sinal, ou seja, uma transferência ou tradução de sinais. Um dispositivo que realiza este processo é chamado transdutor.<sup>9</sup>

Um sensor químico é composto de um material ou elemento de reconhecimento. A escolha deste material ou elemento depende do analito de interesse, uma vez que o analito irá interagir de forma mais ou menos seletiva com o receptor de reconhecimento, que pode ser uma molécula, por exemplo, capaz de interagir com o analito. Um sensor analítico que não possua esta função de reconhecimento não deve ser considerado um sensor químico, mas um transdutor de concentração.<sup>9</sup>

Uma importante característica de um sensor é a seletividade, propriedade que indica o quanto um sensor pode determinar um analito particular sem interferência de outros componentes da amostra. Para se determinar a seletividade de um sensor, é necessário realizar a calibração do mesmo incluindo um ou mais componentes que expressam a interferência de compostos contaminantes que acompanham a amostra a ser analisada. O sensor apresentará uma seletividade satisfatória se o efeito dos contaminantes estiver abaixo do nível de erro aceitável. Caso contrário, o sensor fornecerá um resultado incorreto.<sup>9</sup>

De forma geral, os sensores determinam concentrações acima de um nível especificado. O nível mais baixo de concentração em que um sensor ainda fornece resultados confiáveis é chamado limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*). O limite de detecção representa a mais baixa concentração ou quantidade de uma substância que pode ser distinguida da ausência desta substância (valor em branco) de um limite de confiança.<sup>9</sup>

Quando o elemento de reconhecimento de um sensor é um componente biológico, como uma enzima, tem-se um biossensor. A Figura 1 apresenta os diferentes componentes de um biossensor. A concepção moderna de biossensores deve-se muito às ideias de Leland C. Clark Jr e colaboradores no início da década de 1960<sup>9</sup>. Eles introduziram biossensores de primeira geração de glucose oxidase, mostrando que enzimas poderiam ser imobilizadas em detectores eletroquímicos para formarem “eletrodos enzimáticos”.<sup>10</sup>

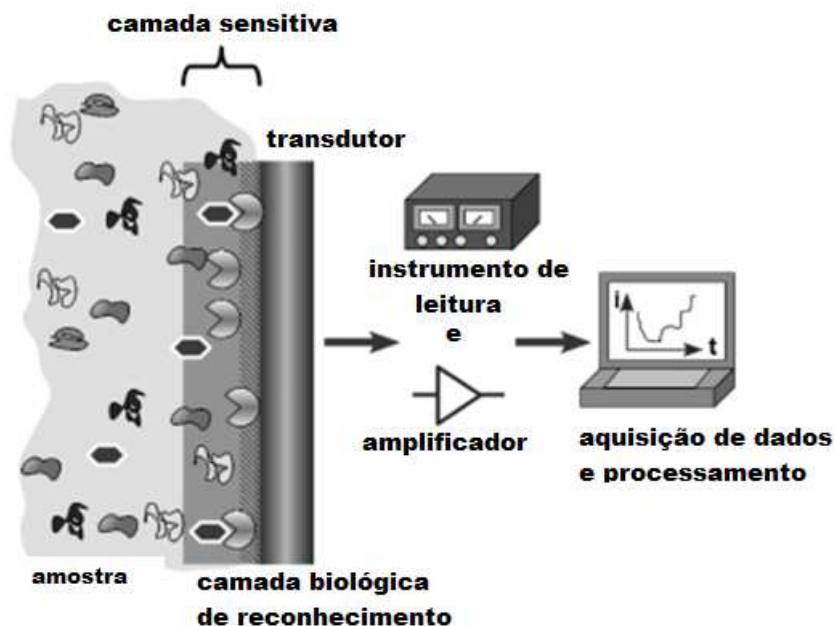


Figura 1 - Configuração típica de um biossensor. Adaptado de Doelle et. at., 2009 <sup>11</sup>

Há muitas possibilidades de combinações e configurações de componentes biológicos e transdutores. Dentre os componentes biológicos que podem ser utilizados encontram-se, principalmente: organismos, tecidos, células, organelas, membranas, enzimas, receptores, antibióticos e ácidos nucleicos. Como transdutores podem ser utilizados transdutores potenciométricos, amperométricos, condutimétricos, óticos, calorimétricos, acústicos, mecânicos etc.<sup>10</sup> Transdutores amperométricos potenciométricos são subcategorias dos transdutores eletroquímicos.

Para os sensores amperométricos, a resposta elétrica é uma função linear da concentração do composto de interesse.<sup>10</sup> Em biossensores amperométricos, enquanto a enzima catalisa a produção de espécies eletroativas, uma voltagem é aplicada ao eletrodo induzindo a reação redox das espécies eletroativas, gerando um sinal.<sup>12</sup> Nos sensores potenciométricos, a resposta (tensão) é uma função logarítmica da concentração.<sup>10</sup> Neste

caso, uma variação do potencial será utilizada como resposta mensurável do transdutor.<sup>12</sup> Os eletrodos comerciais disponíveis atualmente são basicamente os que detectam cátions, ânions e gases, e eletrodos de Pt que medem corrente em reações redox.<sup>10</sup>

### **2.1.1. Biossensores eletroquímicos enzimáticos**

Os biossensores eletroquímicos enzimáticos são formados, basicamente, por um eletrodo e uma enzima. A escolha do eletrodo baseia-se na condutividade e dureza do material. Os materiais comumente utilizados para a fabricação de eletrodos são ouro, platina e carbono. Os dois primeiros são normalmente encontrados na forma de folha ou haste. O carbono é encontrado e/ou fabricado em diversas formas como haste, folha, pasta, carbono metalizado, carbono vítreo, fibra de carbono, película de nanotubos. A enzima é selecionada de acordo com o analito de interesse. Uma possibilidade é o uso de materiais poliméricos, tais como Nafion, quitosana, polipirrol, polianilina, polifenol, politiofeno, poli-1,3-fenilenodiamina, piridina de polivinilo entre outros. Estes materiais apresentam interações que permitem a adsorção ou encapsulação de enzimas sobre eletrodos. As enzimas são adsorvidas por diferentes mecanismos, como adsorção reticular, interações eletrostáticas, ligação covalente, aprisionamento e encapsulamento.<sup>13,14</sup> Biossensores amperométricos funcionam produzindo corrente elétrica quando um potencial é aplicado entre dois eletrodos. Nestes dispositivos, enquanto a enzima catalisa a produção de espécies eletroativas, uma voltagem é aplicada ao eletrodo induzindo a reação redox das espécies eletroativas, gerando um sinal.<sup>12</sup> Nos sensores potenciométricos, a resposta (tensão) é uma função logarítmica da concentração.<sup>10</sup> Neste caso, uma variação do potencial será utilizada como resposta mensurável do transdutor.<sup>12</sup>

Os biossensores enzimáticos podem ser divididos em três gerações, de acordo com os processos envolvidos na transdução.

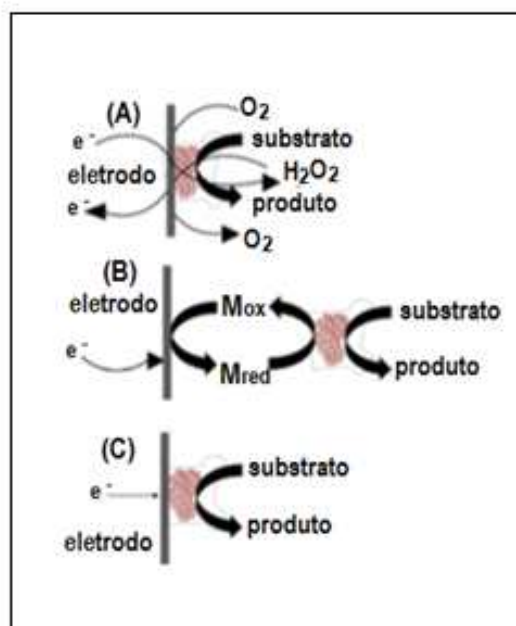


Figura 2 - Funcionamento básico de diferentes biossensores. (A) biossensores de primeira geração; (B) biossensores de segunda geração; (C) biossensores de terceira geração. Adaptado de Putzbach & Ronkainen, 2013<sup>12</sup>

Biossensores de primeira geração são caracterizados pela presença de dois componentes, o transdutor e o biocatalizador, de modo que ambos podem permanecer funcional na ausência do outro.<sup>12</sup> Em um biossensor de primeira geração, a detecção é feita de forma direta, seja pelo aumento de um produto gerado pela reação enzimática ou pela diminuição de um substrato da enzima. Pode ser também monitorada a reação enzimática redox de uma enzima. Para todos os casos, é necessário que o composto monitorado seja eletroquimicamente ativo.<sup>15</sup> Na primeira geração de biossensores de glicose, a glicose oxidase (GOx) imobilizada oxidaria  $\beta$ -D-glicose para  $\beta$ -D-gliconolactona, com a redução simultânea de FAD para  $FADH_2$ . Em seguida,  $FADH_2$  se regeneraria para FAD, usando  $O_2$  dissolvido para produzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

que, em um dado potencial aplicado induziria a oxidação de peróxido na interface do eletrodo, produzindo um sinal elétrico.<sup>12</sup> Neste caso típico, o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio ou a diminuição da concentração de oxigênio podem ser detectado eletroquimicamente a fim de monitorar a concentração de glicose. As principais desvantagens de biossensores de primeira geração são a baixa reprodutibilidade e o fato dos elevados potenciais de trabalho tornarem propenso a interferência de outros compostos presentes na amostra, como ácido ascórbico ou dopamina.<sup>15</sup>

A segunda geração de biossensores (Fig. 2B) utiliza um mediador de elétrons, como ferroceno e quinonas.<sup>7</sup> Kulys e Svirmickas, Cass et al. foram os primeiros a mostrarem que um mediador redox artificial, o ferroceno, poderia ser empregado para um biossensor de glicose amperométrico. Algumas propriedades importantes inerentes a mediadores redox são: (a) estabilidade de suas formas oxidada e reduzida; (b) livre de ocorrer reações secundárias; (c) o potencial redox deve ser compatível com a reação enzimática. A principal desvantagem no uso de mediadores de elétrons está no fato de que este deve estar disponível para o sítio ativo da enzima e na superfície do eletrodo para gerar um sinal de corrente detectável. Além disso, o mediador deve ser estável a longo prazo.<sup>11</sup>

A terceira geração de biossensores (Fig. 2C) é caracterizada pela transferência direta de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o transdutor, sem a necessidade de um mediador. Esta é sua principal vantagem em relação às gerações anteriores, proporcionando-lhes seletividade superior, uma vez que eles devem operar em uma janela de potencial elétrico mais próximo do potencial redox da enzima. Consequentemente, estes biossensores são menos suscetíveis a reações de interferentes. No entanto, a falta de comunicação elétrica direta entre a enzima redox e o eletrodo tem sido um ponto chave que limita o desenvolvimento de biossensores de terceira geração.<sup>3,16</sup>

### 2.1.2. Sensores enzimáticos para ácido úrico.

Sensores para AU tem sido desenvolvido desde os anos 1970, com a imobilização de UOx em eletrodos de platina (Pt), ouro (Au) e carbono (C). Há relatos de sensores enzimáticos e não enzimáticos para detecção de AU, baseado em nanopartículas metálicas, nanofios, nanotubos de carbono, e várias matrizes para imobilização de enzimas, como polianilina, membranas de celulose, quitosana e uso de polieletrólitos. Os eletrodos utilizados na construção de biossensores podem ser modificados para melhorar suas propriedades elétricas e tornar o biossensor mais seletivo e específico.

Moraes *et al.* exploraram a técnica LbL para imobilizar uricase em eletrodo de óxido de índio dopado com estanho (ITO) modificado com Azul da Prússia (PB), para detectar ácido úrico. A resposta para estes biossensores foi obtida a partir da oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O uso de PB é vantajoso pois seu potencial de trabalho é baixo (0,0 V vs Ag/AgCl), permitindo a eliminação e/ou redução de efeitos interferentes de espécies biológicas eletroativas, como ácido ascórbico. Além disso, outra vantagem apresentada no trabalho foi a imobilização de biomoléculas pela técnica LbL, que mostra-se eficiente para minimizar a desnaturação proteica.<sup>17</sup>

Rawal *et al.* construíram um biossensor de AU imobilizando UOx em uma rede de quitosana reticulada por meio de glutaraldeído sobre eletrodo modificado com nanopartículas de PB adsorvido sobre multicamadas de nanotubos de carbono carboxilado e camada de polianilina eletroquimicamente depositada sobre superfície de eletrodo de Au. O biossensor apresentou baixo tempo de resposta (4 s), limite de detecção (5 µmol.L<sup>-1</sup>), capacidade de reutilização em mais de 400 vezes e estabilidade de sete meses.<sup>18</sup>

Piermarini et al. demonstraram um biossensor enzimático utilizando UOx com base em um eletrodo serigrafado modificado com PB. A técnica permitiu obter um biossensor descartável, que pode ser utilizado em ensaios clínicos para detecção de AU. Como relatado, os resultados são obtidos em menos de 2 min e um mesmo dispositivo pode ser utilizado para análise de ao menos 50 amostras de soro sanguíneo, sem a perda de atividade, tornando-se uma boa alternativa para métodos de rotina.<sup>19</sup>

Thakur e Sawant desenvolveram um biossensor para AU baseado em polianilina/PB depositado eletroquimicamente em eletrodo de platina. O biossensor apresentou várias vantagens como a detecção de AU em potencial baixo (0 V vs Ag/AgCl), devido a atividade eletrocatalítica do PB, resultando em uma seletividade melhorada. Além disso, o biossensor apresentou uma resposta linear na faixa de concentração fisiológica de AU e mostrou boa estabilidade por um período de sete dias, mostrando potencial tecnológico.<sup>4</sup>

## **2.2. Filmes automontados**

### **2.2.1. Layer-by-Layer**

Layer-by-Layer (LbL) é uma técnica de deposição utilizada para criar filmes de diversos materiais em nanoescala baseada, na maioria dos casos, na interação eletrostática de moléculas e compostos. Devido sua simplicidade, vários materiais e diferentes componentes podem ser utilizados. Os materiais podem ser moléculas orgânicas ou compostos inorgânicos, macromoléculas, como proteínas e DNA. Filmes depositados em diferentes superfícies apresentam propriedades idênticas, tornando muito vantajosa a técnica de automontagem por LbL.<sup>6,15</sup>

A técnica LbL começou a ser explorada no final dos anos 80 e início dos anos 90 por Decher como uma alternativa à técnica Langmuir-Blogett (LB). Inicialmente,



moléculas anfífilas simples eram utilizadas, porém, rapidamente a técnica fora estendida para polieletrólitos simples e macromoléculas funcionais, proteínas e DNA. As nanopartículas biológicas e inorgânicas passaram a ser incorporadas em 1994. A utilização de multicamadas de diversos materiais possibilita preparar filmes em superfícies têxteis, papel e até mesmo em frutas.<sup>6,15</sup>

Para se preparar um filme pela técnica LbL precisa-se apenas de uma interação entre dois compostos a fim de incorporá-las em uma película com múltiplas camadas. As interações podem ser do tipo ligação de hidrogênio, ligações covalentes, interações doador/receptor, adsorção/secagem, e interações eletrostáticas. Os filmes por interações eletrostáticas são produzidos, normalmente, pela imersão alternada de um substrato em uma solução contendo um material polieletrólito positivo (polication) e negativo (polianion), como mostrado na Fig 3. As condições de deposição dependem de cada tipo de material que é utilizado, porém, existem alguns princípios norteadores para a deposição de multicamadas. Resultados mais reprodutíveis são conseguidos quando o tempo de adsorção é mais longo. Se o filme é preparado imergindo o substrato em mais de uma solução, é importante realizar antes de cada etapa um processo de lavagem para evitar contaminação cruzada.<sup>15</sup>

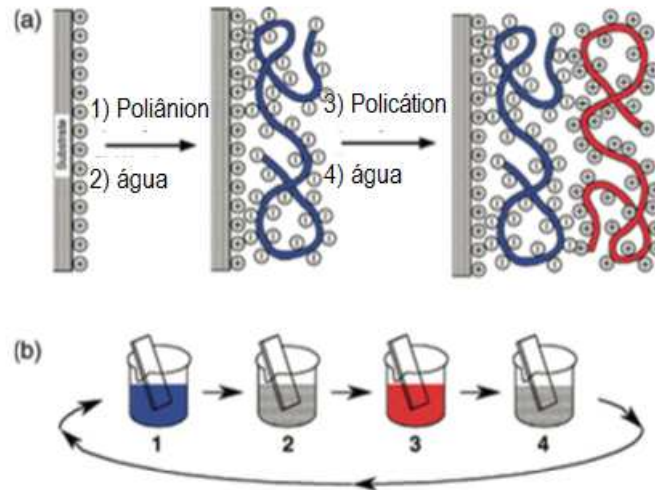


Figura 3 - Construção de filme nanoestruturado pela técnica LbL. Adaptado de Decher & Schilenoff, 2012 <sup>15</sup>

### 2.2.2. Polieletrólitos

Polieletrólitos são polímeros empregados para imobilizar moléculas em superfícies sólidas. Estes polímeros possuem grupos ionizáveis como carboxilato, sulfonato e amônio. Em solventes polares, como a água, estes grupos podem dissociar, gerando cargas na cadeia polimérica e liberando íons em solução. Polieletrólitos podem ser macromoléculas biológicas, como proteínas e polissacarídeos, e macromoléculas não biológicas.<sup>20,21</sup>

Os polieletrólitos podem ser classificados como aniônicos e catiônicos. Pela definição da IUPAC, polímeros aniônicos são macromoléculas com carga negativa e uma quantidade equivalente de cargas positivas. Por outro lado, polímeros catiônicos são macromoléculas carregadas positivamente e um equivalente de cargas negativas.<sup>22</sup> São exemplos de polímeros catiônicos o polietilenoimina (PEI), poli (L-lisina) (PLL), poliamidaimina (PAA) entre outros.<sup>23</sup> São exemplos de poliânions o polivinilsulfonato de sódio (PVS), poli estireno sulfonato de sódio (PSS) e ácido poli-metacrilato (PMAA).

A inversão de carga desempenha um papel central na técnica de deposição LbL. O desenvolvimento das camadas é conseguido alternando a deposição de poliânions e policátions da solução aquosa.<sup>24,22</sup>

### Polietilenoimina

PEI é um polímero sintético catiônico (policátion) que contém aminas primárias, secundárias e terciárias na proporção 1:2:1. O PEI tem sido utilizado em técnicas de adsorção eletrostática, secagem por pulverização e filmes automontados por LbL, oferecendo estabilidade estrutural a longo prazo. A forma estrutural desse polieletrólito mostrada na Fig. 8.<sup>21,25</sup>

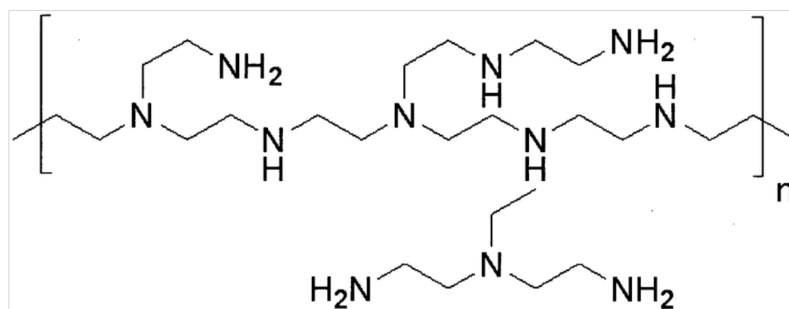


Figura 4 - Estrutura química de uma unidade repetitiva de PEI.

### 2.3. Enzima Uricase

O urato oxidase (UOx), ou uricase (E.C.1.7.3.3), é uma enzima encontrado na maioria dos vertebrados, com exceção dos humanos, alguns primatas (primatas hominídeos, como chimpanzé, gorila e orangotango), pássaros e algumas espécies de répteis. Nos mamíferos é encontrado associado aos peroxissomos de células hepáticas.<sup>26</sup> A uricase catalisa a oxidação do ácido úrico para alantoína, ocupando uma posição central na cadeia de enzimas responsáveis pelo metabolismo das purinas. A ausência da enzima

uricase nos humanos e primatas hominídeos resulta na excreção de ácido úrico do metabolismo das purinas.<sup>27</sup>

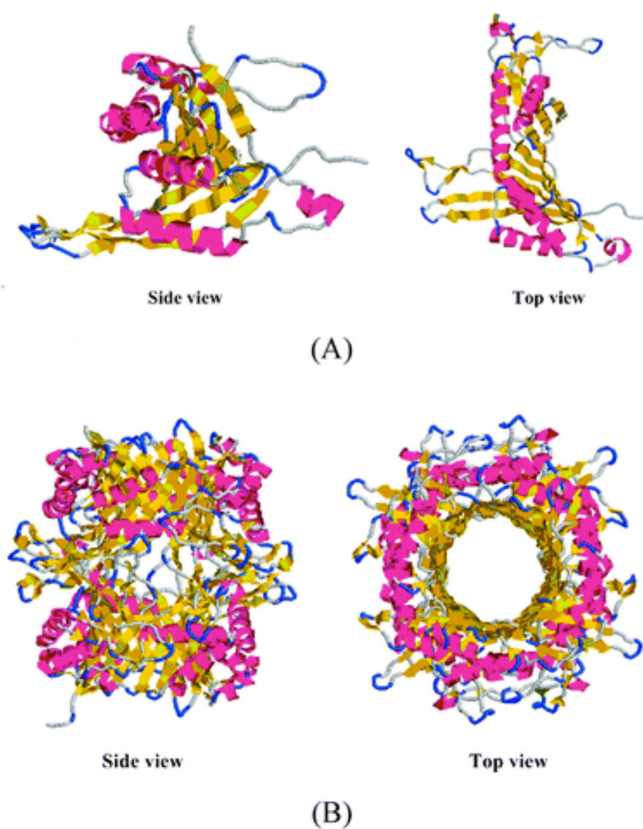


Figura 5 - Estrutura tridimensional da UOx.<sup>28</sup>

A ausência da UOx em humanos e em certos primatas é biologicamente desconhecido. Alguns estudos apontam ser devido a uma mutação genética que não é exatamente compreendida. A presença da enzima em outras espécies de primatas, como nos babuínos e macacos Rhesus indicam que a mutação seja um evento evolucionário recente.<sup>27</sup> De um certo ponto de vista, a perda desta enzima trouxe um efeito benéfico distinto. O AU, presente no organismo humano, é um poderoso antioxidante. Logo, um nível elevado de AU no soro devido à ausência da UOx pode ter contribuído para uma diminuição da taxa de câncer e uma extensão da vida do hominídeo. Por outro lado, esta perda é vista como um acidente infortúnio, pois o excesso de AU é responsável pela artrite gotosa e suas complicações.<sup>26</sup>

## 2.4. Ácido úrico

O ácido úrico (2,6,8-trioxipurina -  $C_5H_4N_4O_3$ ), cuja estrutura química está apresentada na Figura 6, é um composto orgânico produzido por animais, sendo o principal produto de excreção de aves e répteis. Em seres humanos é produto final do metabolismo da purina. O AU não é metabolizado pelo organismo humano devido à ausência da enzima uricase, que catalisa a oxidação do AU para alantoina, produto final mais solúvel. Desta forma, os níveis de AU em humanos é maior que em outros mamíferos. O AU é formado no fígado, sendo dois terços eliminados pelos rins e um terço eliminado pelo trato intestinal, cabelo, pele e unha. Porém, apenas 8 a 12% do AU é excretado.<sup>2,29</sup>

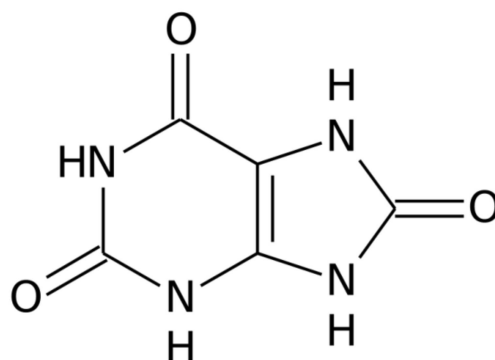
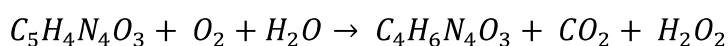


Figura 6 - Estrutura química do ácido úrico.

Por se tratar de um ácido fraco com uma constante de dissociação alta ( $pK_a = 5,5$ )<sup>29</sup>, o AU circula no plasma sanguíneo predominantemente na forma de urato monossódico. Os níveis normais no organismo humano, baseado na solubilidade do urato monossódico, são inferiores a  $7 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  para homens e a  $6 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$  em mulheres. Níveis superiores a estes caracterizam hiperuricemia. O consumo de álcool e alimentos ricos em purina, como carnes, leguminosas e cereais, o baixo consumo de água e pouca prática de

exercícios físicos são fatores responsáveis por doenças renais, cardiovasculares e hipertensão. A hiperuricemia, descoberta no início do século 19, é causadora da gota, uma das formas mais comuns de doenças reumáticas. Homens tem maior risco de desenvolver hiperuricemia que as mulheres em várias faixas etárias, sendo mais comum e igualitário em idades avançadas. Estudos demonstram que pacientes com gota possuem maior tendência a hipertensão, doenças cardiovasculares e problemas renais quando comparado com a população geral.<sup>2,29,30,31,32,</sup>

Por estar relacionado à várias doenças, a determinação de AU no sangue é rotineira nos laboratórios clínicos. Atualmente, o nível de AU é determinado por métodos enzimáticos em laboratórios de patologia. A determinação pode ser feita de forma direta ou indireta. O AU tem forte absorvância em 293 nm, possibilitando sua quantificação de forma direta por espectroscopia UV-vis. No entanto, as desvantagens deste método são a interferência por xantina, baixa precisão e baixa eficiência.<sup>5</sup> No método indireto quantifica-se a quantidade de peróxido de hidrogênio formado pela reação de catálise da uricase:



ácido úrico

alantoína

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser quantificado por espectrometria medindo a variação de absorvância de cromogênio sobre a ação de enzimas auxiliares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e co-substratos, ou por método eletroquímico que quantifica o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> baseado na resposta eletroquímica da UOx imobilizada em eletrodo.<sup>5</sup>

## 2.5. Nanopartículas

O prefixo “nano” significa a bilionésima parte de algo. Portanto, um nanômetro representa a bilionésima parte de um metro. A nanociência e a nanotecnologia concentram seus esforços para compreender, manipular e desenvolver partículas e materiais em dimensões nanométricas, normalmente na ordem de 1 nm a 100 nm. Estes materiais são normalmente moléculas ou aglomerados atômicos. Materiais nesta escala de tamanho são denominados nanopartículas. As nanopartículas demonstram propriedades que são completamente diferentes daqueles produtos com a mesma composição, mas em dimensões maiores. Na dimensão “nano”, o comportamento das partículas é determinado pelos efeitos quânticos. Nanotubos de carbono, fulerenos, pontos quânticos, nanopartículas metálicas, como ouro, platina, prata, são exemplo de nanopartículas. Nanopartículas têm sido investigada para usos em diversos setores, como biomedicina, agricultura, indústria metalúrgica, têxteis, cosméticos, energia, catalisadores, produtos eletrônicos entre outros.<sup>33</sup>

As nanopartículas podem ser sintetizadas por diferentes abordagens. Em uma primeira abordagem, pode-se obter nanopartículas a partir da construção de átomos por átomos ou moléculas por moléculas. Esta construção é chamada de *bottom-up*. Materiais podem ser produzidos desta forma por síntese química, que permite a produção de nanopartículas em grande quantidade. As principais técnicas de obtenção de nanopartículas pela abordagem *bottom-up* o (a) processo de condensação em fase gasosa, que inclui pirólise, evaporação por alta temperatura e síntese em um plasma, envolvendo fenômeno de nucleação e evaporação; (b) síntese por evaporação e deposição a vapor; (c) formação de coloides por reações químicas em fase líquida ou solventes coloidais,

envolvendo fenômeno de precipitação controlada. Nanopartículas também podem ser obtidas a partir de uma grande estrutura e gradualmente ser reduzida até atingir dimensões nanométricas. Esta abordagem é chamada *top-down*. A principal técnica de obtenção por esta abordagem é o processo de atrito mecânico.<sup>33</sup>

O uso de biomoléculas com nanomateriais oferecem diversas possibilidades em biossensoriamento, resultando em materiais híbridos. Nanopartículas de ouro pode ser usada para imobilizar enzimas ou outros elementos barorreceptores em eletrodos ou outros suportes. Contato elétrico entre uma enzima redox e um eletrodo também pode ser conseguida com nanopartículas.<sup>11</sup>

Neste trabalho, nanopartículas de Pt foram utilizadas para melhorar o contato elétrico entre a enzima UOx e o eletrodo de ITO.



### 3. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

#### 3.1. Espectroscopia UV-vis

A luz visível compreende comprimentos de onda entre 400-700 nm (Fig. 7). Quando a luz é absorvida por um material, elétrons de valência são promovidos de seus estados normais (fundamentais) para estados de maior energia (excitado).<sup>34</sup>

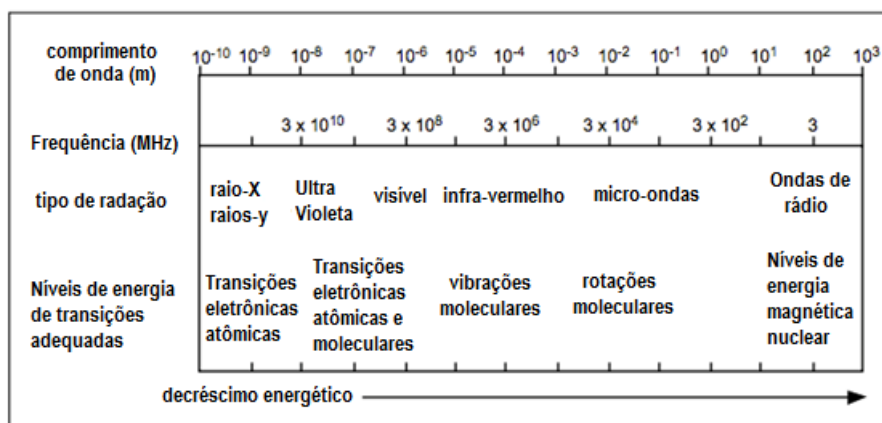


Figura 7 - Comprimentos de onda relacionados com os tipos de radiação e os níveis de energia. Adaptado de Faust, 1992<sup>34</sup>

A energia da luz visível depende de sua frequência, e equivale aproximadamente a 170 kJ mol<sup>-1</sup> para a luz vermelha e 300 kJ mol<sup>-1</sup> para a luz azul. A promoção do elétron para diferentes níveis de energia não se restringe apenas à região da luz visível da radiação eletromagnética, mas também pode ocorrer na região ultravioleta. A maioria das transições eletrônicas estão compreendidas entre os comprimentos de onda de 190 a 900 nm.<sup>34</sup>

A energia total de uma molécula é a soma das energias eletrônica, rotacional e vibracional. As energias absorvidas na região UV produzem mudanças na energia eletrônica das moléculas. Ao absorver energia, um elétron é promovido de um orbital molecular ocupado para um orbital molecular vazio.<sup>35</sup> Os elétrons de valência

normalmente podem ser encontrados em um dos três tipos de orbital eletrônico: (a) orbital de ligação individual – orbital sigma,  $\sigma$ ; (b) ligações duplas ou triplas – orbitais  $\pi$  ligantes; (c) orbitais não-ligantes.<sup>34</sup>

Orbitais ligantes sigma tendem a possuir níveis mais baixos de energia que os orbitais ligantes  $\pi$ , que por sua vez, são mais baixos em energia que orbitais não-ligantes. Quando uma radiação eletromagnética de frequência correta é absorvida, a transição ocorre de um destes orbitais para orbitais vazios, normalmente um orbital anti-ligante,  $\sigma^*$  ou  $\pi^*$  (Fig. 8):

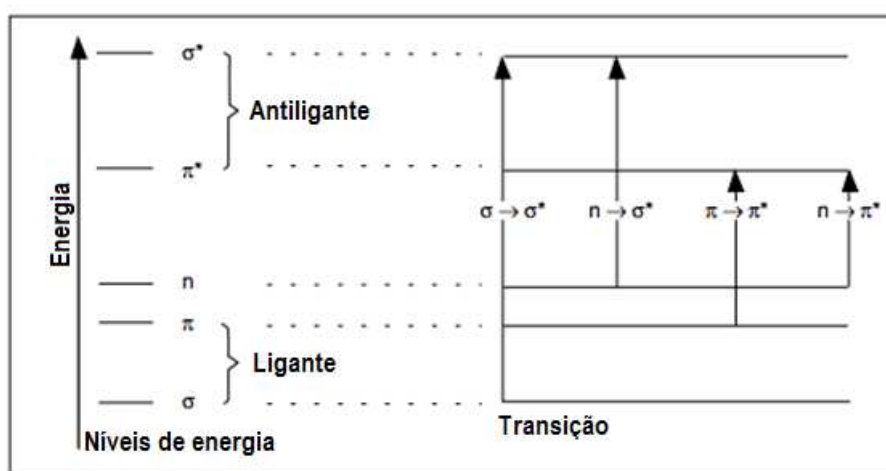


Figura 8 - Transição eletrônica em espectroscopia UV-vis. Adaptado de (Faust, 1992)<sup>34</sup>

A diferença exata de energia entre os orbitais depende do átomo presente e da natureza da ligação química. A maioria das absorções observadas envolvem transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$ , pois as transições entre orbitais ligantes é de frequências muito altas para serem medidas facilmente.<sup>34</sup>

Quando a luz atravessa uma amostra, a quantidade de luz absorvida é a diferença entre a radiação incidente ( $I_0$ ) e a radiação transmitida ( $I$ ). A quantidade de luz absorvida

é expressa como transmitância (T) ou absorvância (A). A transmitância normalmente é dada em termos de fração de 1 ou em porcentagem e é definida como segue:<sup>35</sup>

$$T = \frac{I}{I_0} \text{ ou } \%T = (I/I_0) \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

A Lei de Beer diz que a absorvância (A) é proporcional ao número de moléculas absorventes, ou seja, proporcional a concentração. A Lei de Lambert diz que a fração da radiação absorvida é independente da intensidade da radiação. Combinando estas duas leis tem-se a Lei de Beer-Lambert:<sup>34</sup>

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon lc \quad \text{Eq.2}$$

onde:

$\epsilon$  é a absorvidade molar, constante e característico para cada material, cuja unidade é dada por  $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ dm}^3$ .

$l$  é o comprimento do caminho óptico percorrido pela luz, em cm.

$c$  é a concentração da solução em  $\text{mol L}^{-1}$ .

### 3.2. Microscopia de Força Atômica

Em 1986, Gerd Benning, Calvin Quate e Christoph Gerber desenvolveram o Microscópio de Força Atômica (AFM, do inglês *Atomic Force Microscope*) a partir de uma modificação do STM, combinado-o com um profilômetro stylus (aparelho usado para medir rugosidade em escala microscópica).<sup>36</sup>

O funcionamento do AFM se baseia na forte interação dependente da distância entre uma sonda, ou ponta afiada, e uma amostra. Portanto, o AFM usa a força existente entre a sonda e a amostra para construir uma imagem da superfície de um objeto. O AFM pode operar em quase todos os ambientes, incluindo soluções aquosas, tornando um

importante instrumento em biologia. No AFM as imagens são obtidas por sensoriamento com sonda, portanto, não há lentes através das quais o operador observa a amostra.<sup>36</sup>

A parte central do AFM é a ponta que literalmente “sente” a amostra. Uma ponta de AFM nano-acentuada feita por tecnologia de microfabricação é crescida na extremidade livre de um cantilever flexível que é usado como o transdutor da interação entre a ponta e a amostra. A reflexão de um feixe de laser focado na parte traseira do cantilever é frequentemente usada pela maioria dos AFMs para amplificar e medir o movimento do cantilever, embora outros métodos de detecção também possam ser usados. O feixe refletido é direcionado para um fotodiodo que fornece uma tensão dependendo da posição do feixe de laser. Para a imagem, a ponta é varrida sobre a amostra, ou como em alguns modelos, é a amostra que se move em relação à ponta fixa, que só é permitida a mover-se na direção vertical. Em ambos os casos, os movimentos finos da ponta e da amostra são fornecidos por materiais piezoelétricos que podem se mover com precisão subnanômetro. Em cada posição, mede-se a deflexão do cantilever, a partir da qual se pode construir um mapa topográfico. Esta técnica de varredura em que a ponta é trazida em contato mecânico com a superfície da amostra é conhecida como modo de contato, e foi descrita pela primeira vez por Binning e colaboradores. Tanto a ponta como o scanner são os principais recursos em qualquer configuração do AFM.<sup>36</sup>

### **3.3. Análise de Rastreamento de Nanopartículas**

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle tracking analysis*) é uma técnica de visualização de partículas em líquidos. Esta técnica combina microscopia de dispersão de luz laser com uma câmera de dispositivo de carga acoplada (CCD, do inglês *charge-coupled device*), que permite a visualização e gravação de nanopartículas individuais movendo-se sob movimento browniano e relaciona o

movimento com um tamanho de partícula de acordo com a seguinte fórmula derivada da equação de Stokes-Einstein:<sup>37</sup>

$$\overline{(x, y)^2} = \frac{2k_b T}{3r_h \pi \eta} \quad \text{Eq.3}$$

onde  $k_b$  é a constante de Boltzmann e  $\overline{(x, y)^2}$  é a velocidade média quadrada de uma partícula a uma temperatura T, em uma viscosidade média  $\eta$ , com um raio hidrodinâmico de  $r_h$ .

### 3.4. Espalhamento Dinâmico de Luz

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) é uma técnica utilizada na medição da distribuição de tamanho de partículas em suspensões e emulsões diluídas através da medida de difusão. Trata-se de uma técnica precisa e rápida, porém, limitada a partículas esféricas e concentrações muito baixas. O DLS relaciona o movimento browniano da partícula com o seu tamanho. Quanto maior o tamanho da partícula, mais lento será o movimento browniano, enquanto que partículas pequenas se movimentam mais rapidamente no solvente. Para se realizar a medida, é necessário conhecer a viscosidade do líquido, que é dependente de sua temperatura.<sup>38</sup>

No equipamento de DLS, as partículas são iluminadas por uma fonte de luz, como um laser, que será espalhado em todas as direções. As flutuações de intensidade de luz espalhada, causadas pelo movimento das partículas, em um determinado ângulo é analisada pelo equipamento.<sup>38</sup>

O tamanho das partículas no DLS é calculada pelo coeficiente de difusão translacional usando a equação de Stokes-Einstein<sup>38</sup>

$$d(H) = \frac{k_b T}{3\pi\eta D} \quad \text{Eq.4}$$

Onde  $d(H)$  é o diâmetro hidrodinâmico,  $D$  o coeficiente de difusão translacional,  $k_b$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura absoluta e  $\eta$  a viscosidade do meio.

### 3.5. Potencial Zeta ( $\zeta$ )

O potencial zeta de um sistema é a medida da estabilidade da carga, que controla todas as interações partícula-partícula dentro de uma suspensão. É a medida do potencial elétrico na interface das moléculas do diluente e das partículas dispersas na solução, que está diretamente relacionado à carga superficial das partículas em um sistema.<sup>39</sup> Compreender esta propriedade é importante para o controle das dispersões e na determinação da estabilidade de uma suspensão de nanopartículas, sendo possível, desta maneira, determinar o grau de agregação que ocorrerá ao longo do tempo. É aplicada uma corrente elétrica à suspensão fazendo com que as partículas se movam sob a influência do campo, a partir do qual o potencial zeta pode ser determinado.

### 3.6. Cronoamperometria

Amperometria é um método eletroquímico no qual o potencial aplicado a um eletrodo de detecção é controlado e a corrente que é gerado em consequência da oxidação/redução de uma reação na superfície do eletrodo é registrada como um sinal analítico. Na sua forma mais simples, o potencial aplicado é aproximado e, em seguida, mantido a um valor constante; a corrente elétrica resultante é medida em função do tempo. O potencial aplicado deve ser suficiente para provocar a oxidação ou a redução dos analitos alvos; em geral, a magnitude da corrente medida é diretamente proporcional à concentração do analito.<sup>40</sup>

Na amperometria, a quantificação da concentração das espécies é possível porque a magnitude da corrente gerada em um dado experimento é determinada pelo número de

moléculas do analito oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo e, portanto, diretamente proporcional a concentração das moléculas detectadas, como definido pela lei de Faraday:<sup>40</sup>

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = \eta F \frac{dN}{dt} \quad \text{Eq.5}$$

Onde  $i_t$  é a corrente gerada na superfície do eletrodo no tempo = t,  $Q$  é a carga elétrica na superfície do eletrodo,  $\eta$  é o número de mols de elétrons transferidos por mol de analito,  $N$  é o número de mols de analito oxidado ou reduzido, e  $F$  é a constante de Faraday (96487 C mol<sup>-1</sup>).<sup>40</sup>

### 3.7. Voltametria

Voltametria é uma das técnicas eletroquímicas empregadas para investigar mecanismos de eletrólise baseada na medida de corrente desenvolvida em um eletrodo em condições onde existe a polarização por concentração. É uma técnica largamente utilizada em química inorgânica, biológica e físico-química para propósitos nanoanalíticos, incluindo processos de oxidação e redução em vários meios, processos de adsorção sobre superfícies e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodo modificados.<sup>41</sup>

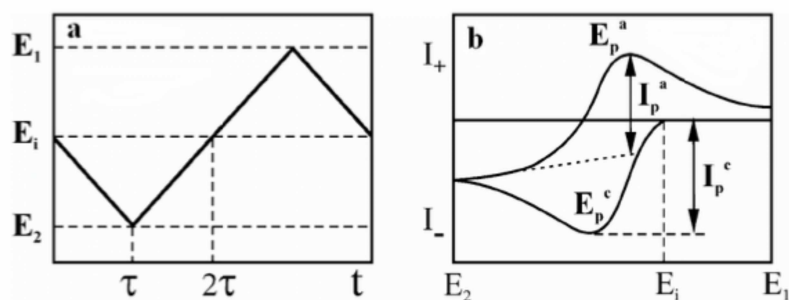
Existem várias formas de voltametria, dentre elas a voltametria de varredura linear, voltametria de pulso diferencial e a voltametria cíclica.<sup>41</sup>

#### 3.7.1. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica que permite obter informações qualitativas e quantitativas de processos eletroquímicos. O método de três eletrodos é o mais amplamente usado porque o potencial elétrico de referência não muda facilmente durante as medidas. Estes consistem em um eletrodo de referência (RE, do inglês *referency*

*electrode*), eletrodo de trabalho (WE, do inglês *working electrode*) e o contra eletrodo (CE, do inglês *counter electrode*), também chamado de eletrodo secundário ou eletrodo auxiliar. Na voltametria cíclica, o potencial do eletrodo segue um potencial modificado linearmente com o tempo. O potencial é medido entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho e a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo.<sup>41</sup>

Inicialmente, o eletrodo de trabalho é mantido em um determinado potencial inicial,  $E_i$ , em que não ocorre reações neste. Durante a medição, o potencial é varrido linearmente a uma taxa  $v$  entre dois limites de potencial,  $E_1$  e  $E_2$  (Fig. 9). A corrente correspondente é registrada em função do potencial variável. Um voltamograma cíclico característico para um sistema reversível é mostrado na FIG 9. Para a varredura catódica a corrente tem sinal negativo; para a varredura anódica a corrente tem um sinal positivo.<sup>42</sup>



**Figura 9 - (a) curva potencial vs tempo,  $E_i$  é o potencial inicial e  $E_1$  e  $E_2$  são potenciais limites (b) voltamograma cíclico típico,  $E_p^a$  é o potencial de pico da corrente catódica e  $E_p^c$  é o potencial de pico da corrente anódica.**

Na Fig. 9,  $E_p^a$  e  $E_p^c$  correspondem, respectivamente, aos potenciais de pico anódico e catódico, enquanto que  $I_p^a$  e  $i_p^c$  correspondem, respectivamente, as correntes de picos anódicos e catódicos. Estes são importantes parâmetros em um voltamograma. Para processos eletroquimicamente reversíveis, a separação de pico é:<sup>42</sup>

$$\Delta E_p = |E_p^a - E_p^c| = 2,303 RT/nF \quad \text{Eq.6}$$



A corrente de pico em um voltamograma cíclico contendo apenas uma espécie, a 25°C, é descrita pela equação de Randles-Sevcik:<sup>42</sup>

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C^* \quad \text{Eq.7}$$

onde  $I_p$  é a corrente de pico em A,  $n$  é o número de elétrons transferidos,  $A$  é a área do eletrodo,  $D$  é o coeficiente de difusão das espécies em  $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ,  $v$  é a velocidade de varredura, em  $\text{Vs}^{-1}$  e  $C^*$  é a concentração da espécie majoritária, em  $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ .<sup>42</sup>

### 3.7.2. Voltametria de Pulso Diferencial

Voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) é uma técnica extremamente útil quando se deseja medir níveis de vestígios de espécies orgânicas e inorgânicas. Na DPV, são aplicados pulsos de magnitude fixa sobrepostos numa rampa de potencial linear ao eletrodo de trabalho em um momento imediatamente anterior ao final da queda, como mostrado na Fig. 10. A corrente é medida duas vezes, imediatamente antes da aplicação do pulso (em 1) e novamente no final do pulso (após aproximadamente 40 ms, em 2, quando a corrente de capacitiva decai). A primeira corrente é subtraída instrumentalmente da segunda, e esta diferença de corrente é plotada contra o potencial aplicado.<sup>43</sup>

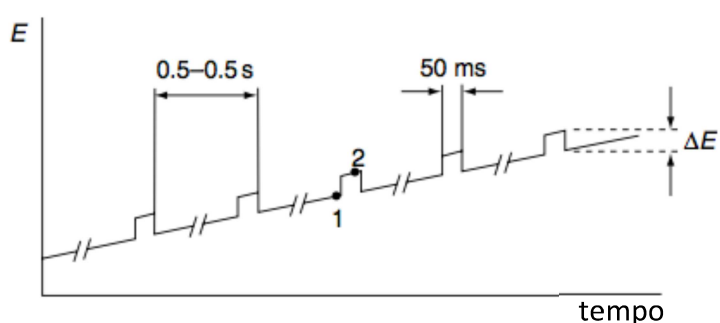


Figura 10 - Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial. Figura adaptada de

O voltamograma de pulso diferencial resultante consiste em picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito correspondente.<sup>43</sup>

$$I_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left( \frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Eq.8}$$

onde  $\sigma = \exp \left[ \left( \frac{nf}{RT} \right) \left( \frac{\Delta E}{2} \right) \right]$  ( $\Delta E$  é a amplitude do pulso).

O potencial de pico ( $E_p$ ) pode ser usado para identificar uma espécie, como ocorre perto do potencial de meia-onda ( $E_{1/2}$ ) polarográfica:<sup>43</sup>

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \quad \text{Eq.9}$$

A resposta em forma de pico torna a técnica particularmente útil para análise de mistura.<sup>43</sup>

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Gerais**

O objetivo deste trabalho é construir e caracterizar um biossensor amperométrico para detecção de AU, tendo como base a enzima UOx, utilizando a técnica LbL de construção de filmes ultrafinos.

### **4.2. Específicos**

- Estudar diferentes arquiteturas de filmes ultrafinos para a construção de um biossensor enzimático amperométrico para detecção de ácido úrico.
- Estudar e melhorar parâmetros, como potencial, tempo de imersão, para melhorar a resposta do biossensor na detecção de AU.
- Caracterizar o biossensor pelas técnicas espectroscópicas, morfológicas e eletroquímicas.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. MATERIAIS

#### 5.1.1. UOx e AU

A uricase (E.C. 1.7.3.3) foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich® e originária do *Bacillus fastidiosus* (15 U/mg), ótimo de atividade em pH e temperatura em 8,5 e 30°C, respectivamente, e ponto isoelétrico (pI) de 5,6.

O ácido úrico ( $C_5H_4N_4O_3$ ) utilizado foi adquirido comercialmente da Sigma-Aldrich®, (pureza  $\geq 98\%$  (grau HPLC), M.M. 168,11  $g.mol^{-1}$ ).

#### 5.1.2. Nanopartículas de Pt

Para síntese das nanopartículas de Pt foram utilizados o ácido hexacloroplatínico hexaidratado ( $H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$ ) da marca Sigma-Aldrich® (Platina  $\geq 37,50\%$ , M.M. 517,9  $g.mol^{-1}$ ), e o boroidreto de sódio ( $H_4BNa$ ) da marca Aldrich-chemistry® (pureza 98,0%, M.M. 37,83  $g.mol^{-1}$ ).

#### 5.1.3. Tampão PBS

Para o preparo do tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) foram utilizados os sais cloreto de sódio (NaCl) da marca MERCK (pureza  $\geq 99,5\%$ , M.M. 58,44  $g.mol^{-1}$ ), fosfato de sódio dibásico anidro ( $Na_2HPO_4$ ) da marca Synth pureza mínima 99,0%, M.M. 141,96  $g.mol^{-1}$  e fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ) da marca Cinética® teor 99,0%, M.M. 136,09  $g.mol^{-1}$ .

#### **5.1.4. Tampão borato de sódio**

Os reagentes utilizados para o preparo do tampão borato foram o borato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) da marca Synth (teor 99,5 – 105 %, M.M.  $381,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) e ácido clorídrico (HCl) da marca Synth (teor 36,5-38,0%, M.M.  $36,46 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

#### **5.1.5. Substratos**

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados substratos de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio (*Indium Tin Oxide*, ITO) da marca Delta Inc.

Paras as medidas espectroscópicas UV-vis e AFM foram utilizados substratos de quartzo.

## **5.2. MÉTODOS**

### **5.2.1. Hidrofilização dos substratos**

As medidas espectroscópicas foram realizadas utilizando substratos de quartzo hidrofilizados. A hidrofilização das laminas de quartzo foi feita em duas etapas. Primeiramente, imergiu-se o substrato em uma solução alcalina contendo  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e água na proporção 1:1:5 por 10 min à  $80^\circ\text{C}$ . Em seguida, as lâminas foram lavadas com água ultrapura, com resistividade  $18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ . A segunda etapa consistiu na imersão das lâminas em uma solução ácida de HCl,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e água na proporção 1:1:6 por 10 min à temperatura de  $80^\circ\text{C}$  e, seguida da lavagem com água ultrapura.

### **5.2.2. Preparo de soluções tampão**

O tampão PBS, de concentração  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  foi preparado dissolvendo o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $6 \text{ mmol.L}^{-1}$  e o  $\text{NaCl}$   $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  em água ultrapura. O pH foi ajustado com uma solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $150 \text{ mmol.L}^{-1}$  para atingir o pH 7,4.

O tampão borato foi preparado a partir de 85,6 mL de uma solução de borato de sódio de concentração  $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ , completando o volume para 100 mL com uma solução de ácido clorídrico de concentração  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

### **5.2.3. Preparo de soluções de UOx e AU**

A UOx foi dissolvida em tampão borato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  (pH 9,0) para uma concentração de  $3,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , e, posteriormente, diluída para  $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$  em tampão PBS, pH 7,4.<sup>17</sup>

Para facilitar a dissolução do AU, este foi preparado dissolvendo-o em uma solução de  $\text{NaOH}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$  para uma concentração de  $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$  e, em seguida, diluída para  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  em PBS, com o pH ajustado para 7,4 com  $\text{HCl}$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$ .<sup>17</sup>

### **5.2.4. Polieletrólitos**

Para a fabricação dos filmes foram preparados os polieletrólitos PEI e PVS dissolvidos em água ultrapura para uma concentração e  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ .<sup>17</sup>

### **5.2.5. Síntese das nanopartículas de Pt**

Duas soluções foram preparadas para obter as nanopartículas de Pt. A solução de ácido hexacloroplatínico hexahidratado foi preparada dissolvendo o ácido em água ultrapura para concentração  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . A segunda solução foi preparada dissolvendo boroidreto de sódio para concentração  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em água ultrapura.<sup>44</sup>

Para a síntese de nanopartículas em suspensão foram misturados sob agitação, 1 mL da solução de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$  de concentração  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  e 1 mL de solução de PEI  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Em seguida, foi adicionado à mistura, rapidamente, 1 mL de solução de  $\text{NaBH}_4$   $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , mantendo-se a agitação por 1h.

### 5.2.6. Montagem dos filmes para caracterização espectroscópica.

Para as caracterizações por UV-vis foram utilizados substratos de quartzo, previamente hidrofílicos. As bicamadas de PEI/UOx foram depositadas sobre 3 camadas de colchão composta por bicamadas de PEI/PVS<sup>17</sup>, depositada sobre o quartzo por imersão em soluções dos polieletrólitos durante 3 min cada, intercalando com lavagem em água ultrapura por 30 s. Para minimizar os efeitos do substrato, sequencia esta ilustrada na Fig. 11:

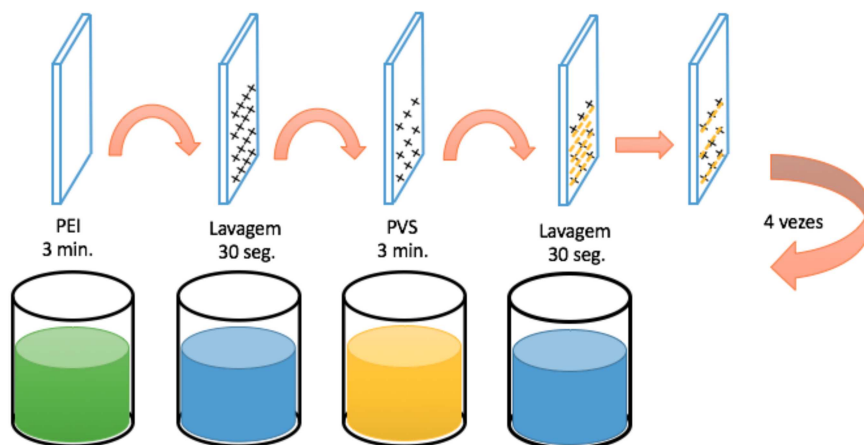


Figura 11 - Esquema de deposição do colchão.

### 5.2.7. Deposição das PtNP's *in situ*

As nanopartículas de Pt foram preparadas *in situ* mergulhando-se o substrato com colchão depositado em uma solução de  $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$  por 5 minutos e, em seguida, mergulhou-se o substrato em uma solução de  $\text{NaBH}_4$  por 5 min.<sup>44</sup>

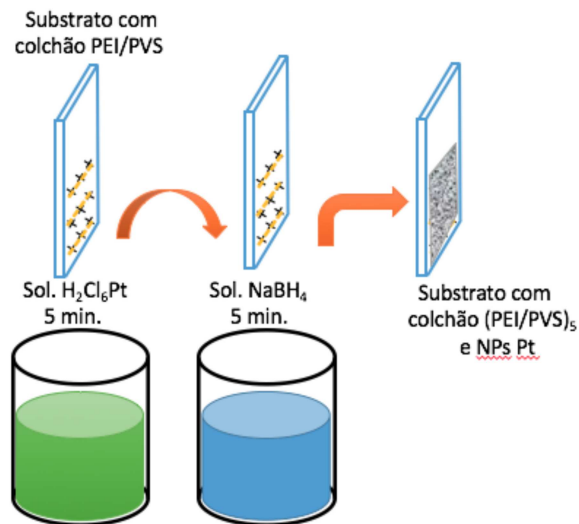


Figura 12 - Esquema da síntese das nanopartículas de platina *in situ*.

#### 5.2.7.1. Deposição das bicamadas de PEI/UO<sub>x</sub> e PEI-PtNPs/UO<sub>x</sub>

As bicamadas de PEI/UO<sub>x</sub> (depositadas sobre o filme de NPs sintetizadas *in situ*) foram montadas intercalando a imersão do substrato em solução de PEI e em solução de UO<sub>x</sub>, por 3 e 10 min, respectivamente. As imersões em PEI e UO<sub>x</sub> foram seguidas por imersão em solução de lavagem em tampão PBS por 30 s, Fig.13. As imersões em solução de PEI foram feitas à temperatura ambiente, da mesma maneira a imersão em solução de lavagem que se seguia. As soluções de UO<sub>x</sub> e a lavagem do mesmo foram mantidos à temperatura de 10°C .<sup>17</sup>



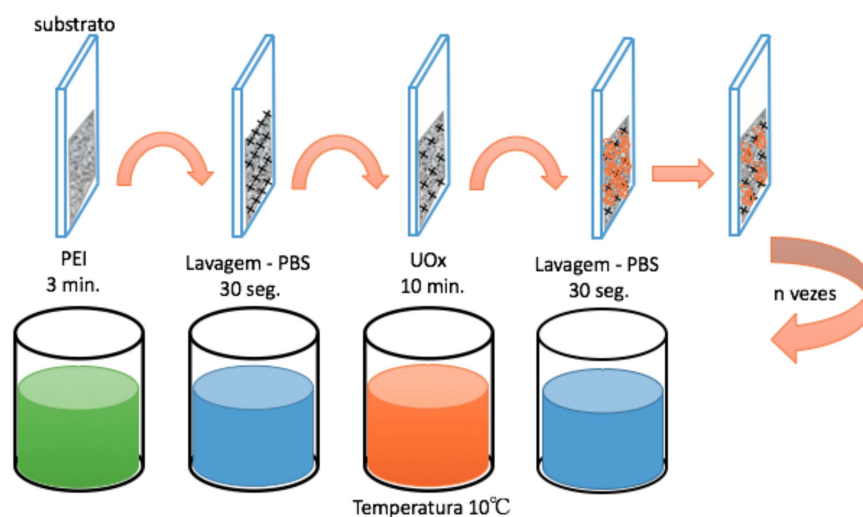


Figura 13 - Esquema da montagem das bicamadas compostas por PEI/UOx.

### 5.2.8. Montagem dos filmes para caracterização eletroquímica

Para as medidas eletroquímicas foram usados substratos de ITO, seguindo os mesmos procedimentos para os filmes montados para as análises espectroscópicas.

### 5.3. Instrumentação

Para as medidas de espectroscopia UV-vis foi utilizado o equipamento Thermo Scientific Genesys 6™ disponível na UFSCar – *campus* Sorocaba.

A caracterização morfológica do filme com arquitetura (PEI/PVS)<sub>n</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>n</sub>, em substrato de ITO, foi feita em equipamento AFM, modelo XE 100 da Park Systems, disponível na UNESP Sorocaba

A determinação do tamanho das nanopartículas de Pt e seu potencial zeta foram feitos em equipamento Analisadores de Partículas Zetasizer Nano ZS 90 – Malvern® e Analisador de Partículas NanoSight LM10 – Malvern®, disponíveis na UNESP Sorocaba.

As medidas eletroquímicas foram feitas no potenciostato Autolab, modelo PGSTAT 30, disponível na UFSCar – *campus* Sorocaba, com um eletrodo de referência (placa de Pt de 1 cm<sup>2</sup>), um de referência de calomelanosaturado e o de trabalho (filme LbL sobre o ITO) em uma cela eletroquímica, conforme a configuração ilustrada na Figura 14:

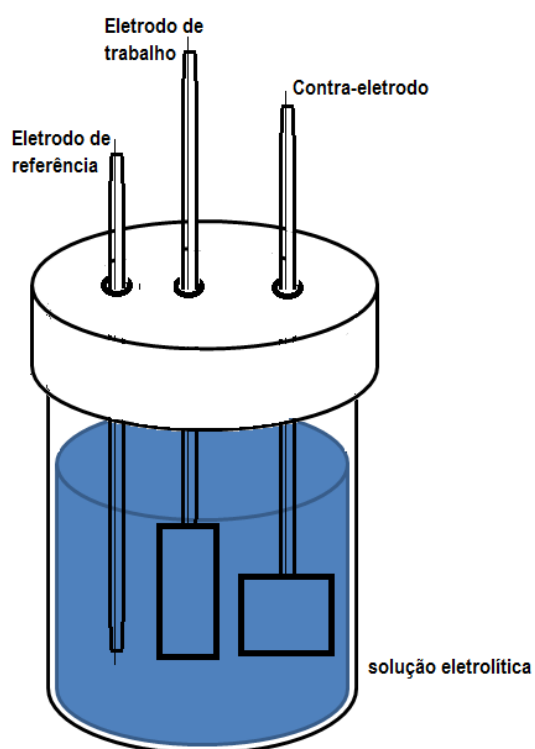


Figura 14 - Esquema da disposição dos eletrodos na cela eletroquímica em solução eletrolítica para caracterização dos filmes LbL.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes estudados foram fabricados em dois tipos de arquiteturas diferentes. A primeira arquitetura escolhida foi construída sobre (PEI/PVS)<sub>5</sub> com deposição de PtNP *in situ*. Sobre esta matriz eram formados filmes PEI/UOx com variados números de bicamadas. A segunda arquitetura escolhida foi construída sobre matriz composta por colchão (PEI/PVS)<sub>3</sub> onde foram crescidas bicamadas formadas por (PtNPs-PEI/UOx). O número de bicamadas de PEI/PVS foi determinado de acordo com trabalhos anteriores realizados no grupo de pesquisa.

Primeiramente, serão apresentados os resultados obtidos na caracterização dos filmes pelas técnicas espectroscopia UV-vis, AFM e NTA. Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos por técnicas eletroquímicas de amperometria, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

### 6.1. Caracterização dos filmes

#### 6.1.1. Caracterização por espectroscopia UV-vis.

##### a) Caracterização dos filmes (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>n</sub>

Foram coletadas, inicialmente, medidas de absorvância das soluções de polieletrólitos PEI e PVS, ambos de concentração 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Como *baseline* foi utilizado água ultrapura. Os resultados obtidos indicaram que não há bandas características para estas soluções na faixa de comprimento de onda analisada. Estes polieletrólitos constituíram o colchão que foi depositado sobre o substrato de quartzo. A ausência de bandas características torna possível a utilização destes materiais como *baseline* das medidas. Também foi obtido o espectro de absorção das nanopartículas depositadas *in*

*situ* sobre o filme (PEI/PVS)<sub>n</sub> depositado sobre substrato de quartzo. O resultado também indicou ausência de bandas características na faixa estudada.

A Figura 15 apresenta o espectro de absorção da solução de UOx a partir de uma solução 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> preparada em tampão PBS pH 7,4. Para a enzima UOx foi observada uma banda característica em aproximadamente 293 nm atribuída às transições eletrônicas dos orbitais  $\pi \rightarrow \pi^*$  das ligações C=C dos aminoácidos aromáticos (triptofano e fenilalanina) presentes na UOx.<sup>12</sup>

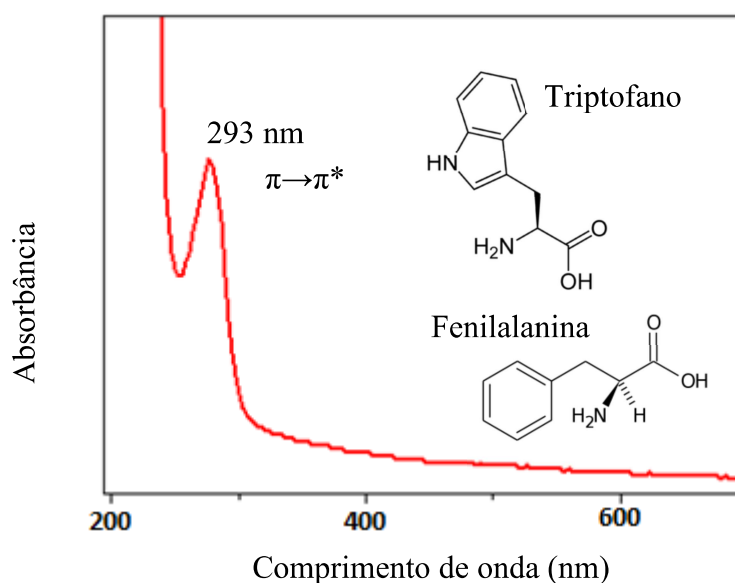
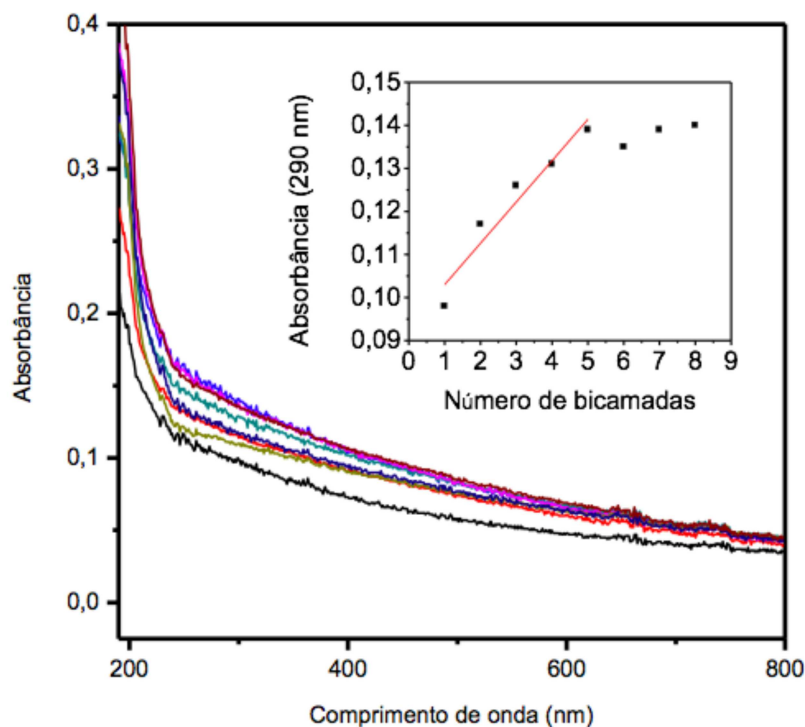


Figura 15 - espectro de absorção da UOx em solução PBS. Banda em aproximadamente  $\lambda = 290$  nm.

O crescimento do filme de (PEI/UOx) foi monitorado por espectroscopia UV-vis, acompanhando a absorção das bicamadas no comprimento de onda característico da banda da UOx (290 nm). Primeiramente foi realizada a medida do colchão com as PtNPs depositadas *in situ*, como *baseline*. A partir de então, para cada bicamada formada por PEI/UOx foi realizada uma medida de absorbância.

A Figura 16 apresenta os espectros de absorção obtidos para a deposição sucessivas de (PEI/UOx)<sub>9</sub> sobre colchão formado por 5 bicamadas de polieletrólitos PEI/PVS com nanopartículas de platina depositadas *in situ*. A arquitetura final do filme

foi  $(PEI/PVS)_5/PtNPs/(PEI/UOx)_9$ . No gráfico inserido é apresentada a absorbância do filme, no comprimento de onda característico da  $UOx$ , em função do número de bicamadas.



**Figura 16 - Espectro de absorção UV-vis para o crescimento de bicamadas de  $(PEI/UOx)$  sobre colchão  $(PEI/PVS)$  com nanopartículas depositadas *in situ*. Inserido: absorbância do filme em 290 nm em função do número de bicamadas do filme com arquitetura final do filme  $(PEI/PVS)_5/PtNPs/(PEI/UOx)_9$ .**

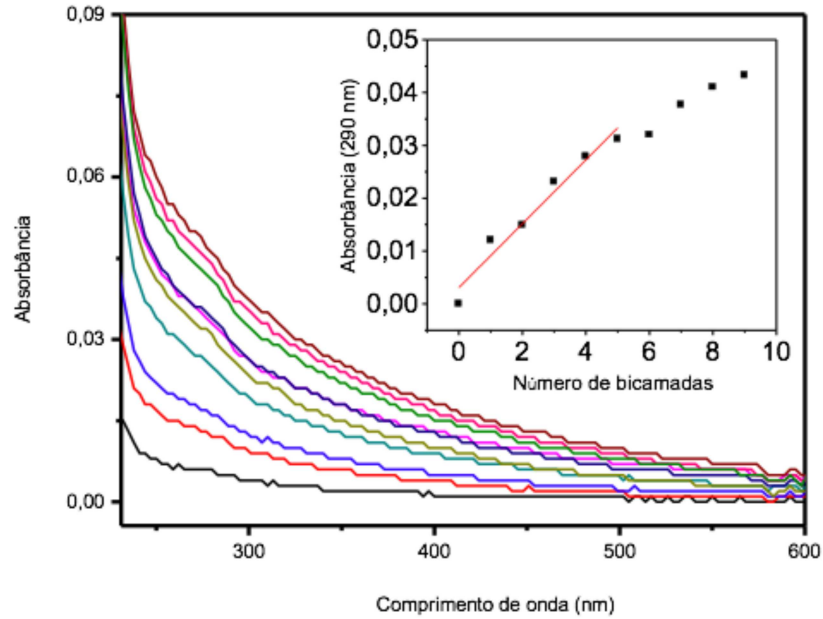
Os resultados obtidos (triplicatas) indicaram que o crescimento do filme foi exponencial para as cinco primeiras bicamadas, estabilizando a partir da deposição da sexta bicamada. Isto significa que para as primeiras cinco bicamadas depositadas a quantidade de material depositado foi o mesmo. A partir da sexta bicamada a quantidade de material depositado não foi mais constante, ocorrendo, como observado na figura inserida, o que permite concluir que ocorreu a saturação do material depositado.

### **b) Caracterização dos filmes (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>n</sub>**

Para esta arquitetura, o *baseline* foi coletado a partir do colchão formado por (PEI/PVS)<sub>3</sub> sobre o substrato de quartzo.

As bicamadas depositadas sobre o colchão eram formadas pela imersão do substrato em solução de nanopartículas de Pt seguida pela imersão em solução de enzima UOx. Para esta arquitetura, a concentração da solução de enzima UOx foi aumentada para 5 mg.L<sup>-1</sup>, para garantir maior quantidade de enzima depositada.

A Figura 17 apresenta os espectros de absorção obtidos para a deposição sucessivas de dez bicamadas compostas por (PtNPs-PEI/UOx) sobre colchão formado por 3 bicamadas de polieletrólitos PEI/PVS. A arquitetura final do filme foi (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>10</sub>. No gráfico inserido é apresentada a absorbância do filme, no comprimento de onda característico da UOx, em função do número de bicamadas.



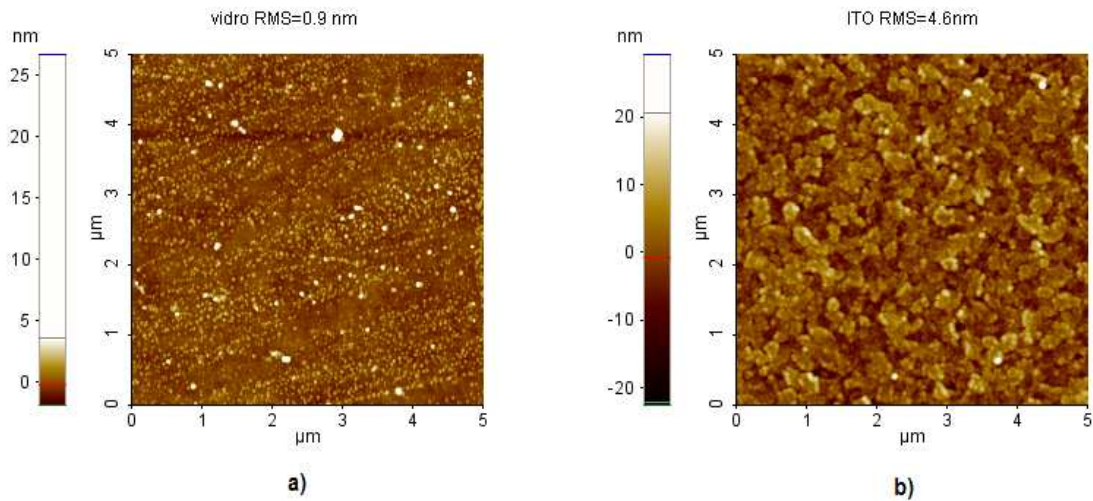
**Figura 17 - Espectro de absorbância UV-vis para o crescimento das bicamadas de (PtNPs-PEI/UOx) sobre colchão (PEI/PVS). Inserido: crescimento da absorção das bicamadas no comprimento de onda da principal banda da UOx (290 nm). Arquitetura final do filme  $(PEI/PVS)_5/(PtNPs-PEI/UOx)_{10}$**

Os resultados obtidos (triplicatas) indicaram que o crescimento do filme foi linear para as seis primeiras bicamadas, havendo uma pequena diminuição da inclinação a partir da deposição da sétima bicamada. Isto significa que para as primeiras seis bicamadas depositadas a quantidade de material depositado foi o mesmo. A partir da sétima bicamada a quantidade de material depositado não foi mais constante, seguindo outro regime de crescimento, menos acentuada que o primeiro regime.

### **6.1.2. Caracterização por AFM para os filmes de arquitetura $(PEI/PVS)_5/PtNPs/(PEI/UOx)$**

As imagens obtidas por AFM dos filmes depositados sobre ITO são mostradas nas Figuras 18, 19 e 20. As imagens estão dispostas de acordo com o acréscimo de camadas na superfície do substrato. O principal parâmetro analisado foi a rugosidade superficial dos filmes. A Figura 18-a apresenta a superfície do substrato do lado que não contém

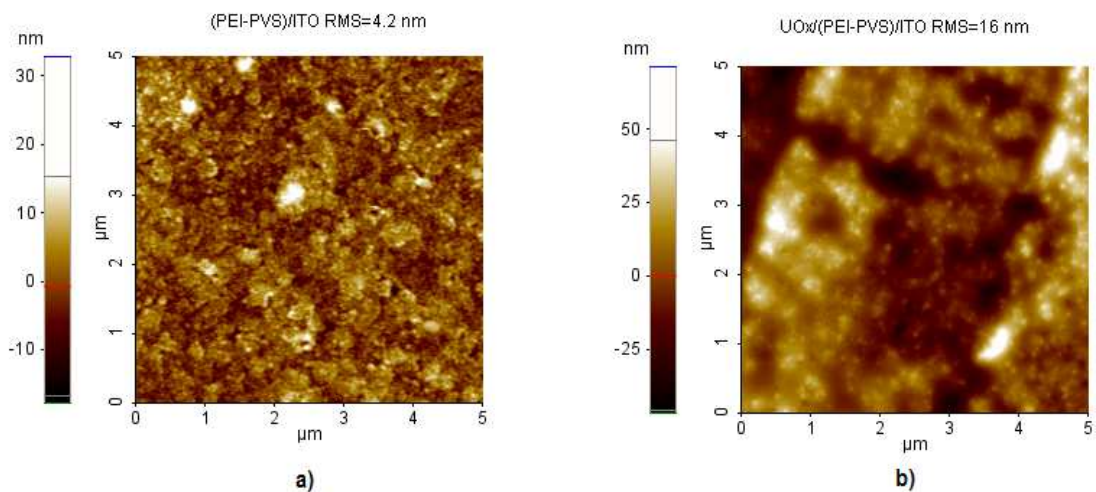
ITO, apenas o vidro. Pode-se verificar que a rugosidade é baixa, 0,9 nm, comparada com a rugosidade do lado do substrato que contém o filme de ITO, apresentada na figura 18-b, com rugosidade de 4,6 nm.



**Figura 18 - Imagens de superfície 2D obtida por AFM do substrato (a) do lado contendo apenas vidro e (b) do lado contendo ITO.**

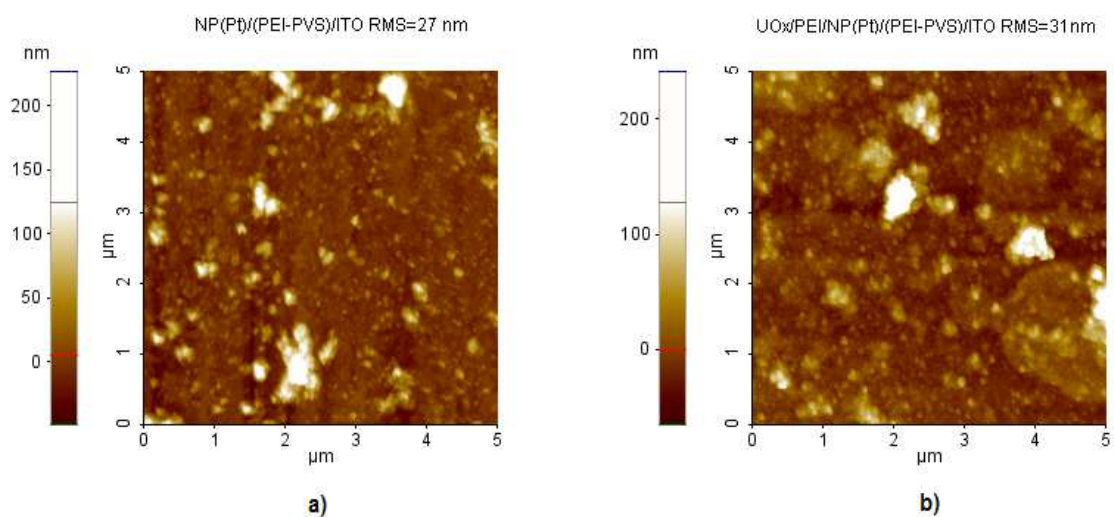
A Fig. 19-a apresenta a superfície do substrato (ITO) contendo 5 bicamadas de PEI/PVS. Comparada com a imagem 18-b pode-se verificar que não houve um aumento na rugosidade (4,2 nm), isto sugere que o filme de polieletrólito recobre de maneira conformacional o substrato. No entanto, a adição de uma bicamada de PEI/UOx, apresentada pela Fig. 19-b causa um aumento significativo na rugosidade (16 nm).





**Figura 19 -** Imagens 2D da superfície do filme contendo (a) cinco bicamadas de PEI/PVS e (b) uma bicamada de PEI/UOx sobre colchão de (PEI/PVS)<sub>5</sub>.

A Figura 20 apresenta a superfície do filme contendo as nanopartículas de Pt (a) e o filme contendo as nanopartículas de Pt com uma bicamada de PEI-UOx. Comparando com as imagens anteriores, pode-se verificar um aumento na rugosidade, sendo o valor de 27 nm para o filme contendo apenas as PtNP com colchão e 31 nm para o filme com acréscimo da bicamada de PEI/UOx.



**Figura 20 -** Imagens 2D da superfície dos filmes contendo (a) PtNP depositadas sobre colchão de (PEI/PVS)<sub>5</sub> e (b) bicamada de PEI/UOx sobre filme de NPsPt/(PEI/PVS)<sub>5</sub>.

As imagens obtidas por AFM mostram que a imobilização de enzimas e nanopartículas utilizando a técnica LbL é possível, apresentando elevada rugosidade. Quanto maior a superfície de contato, maior a área do filme disponível para a reação com o analito. Portanto, esta propriedade é desejável para aplicações em biossensores.<sup>45</sup>

### 6.1.3. Caracterização das nanopartículas em suspensão por NTA e DLS

A técnica de caracterização NTA foi utilizada para determinar o tamanho das nanopartículas de Pt em suspensão. Esta técnica permite determinar a distribuição de tamanho das partículas através da posição e do movimento browniano das partículas individualmente.

A Figura 21 apresenta uma imagem capturada pela técnica NTA utilizando-se o software NTA versão 3.1. Na imagem é possível observar as nanopartículas de Pt dispersas em solução tampão PBS 0,01 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,4 estabilizadas em PEI. As nanopartículas são vistas através da dispersão da luz emitida por um laser do equipamento. Cada ponto branco na imagem representa uma nanopartículas de platina.

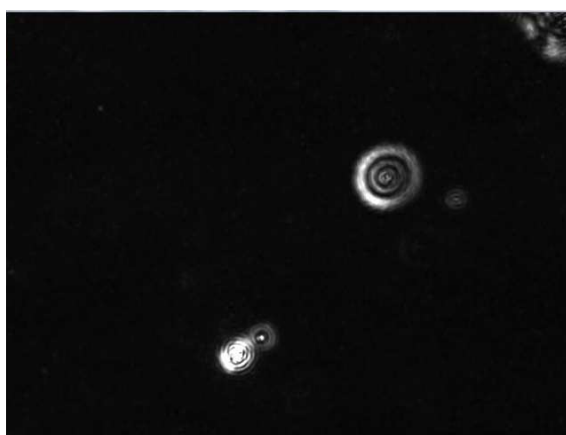


Figura 21 - Imagem das nanopartículas de Pt dispersas em solução aquosa obtidos por NTA.

O tamanho médio do diâmetro das nanopartículas obtido por análise em NTA foi de  $205 \pm 26,3 \text{ nm}$ . A concentração das partículas encontrada foi de  $1,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$  partículas/mL.

A Figura 22 apresenta um gráfico de distribuição da concentração das nanopartículas em função do seu diâmetro.

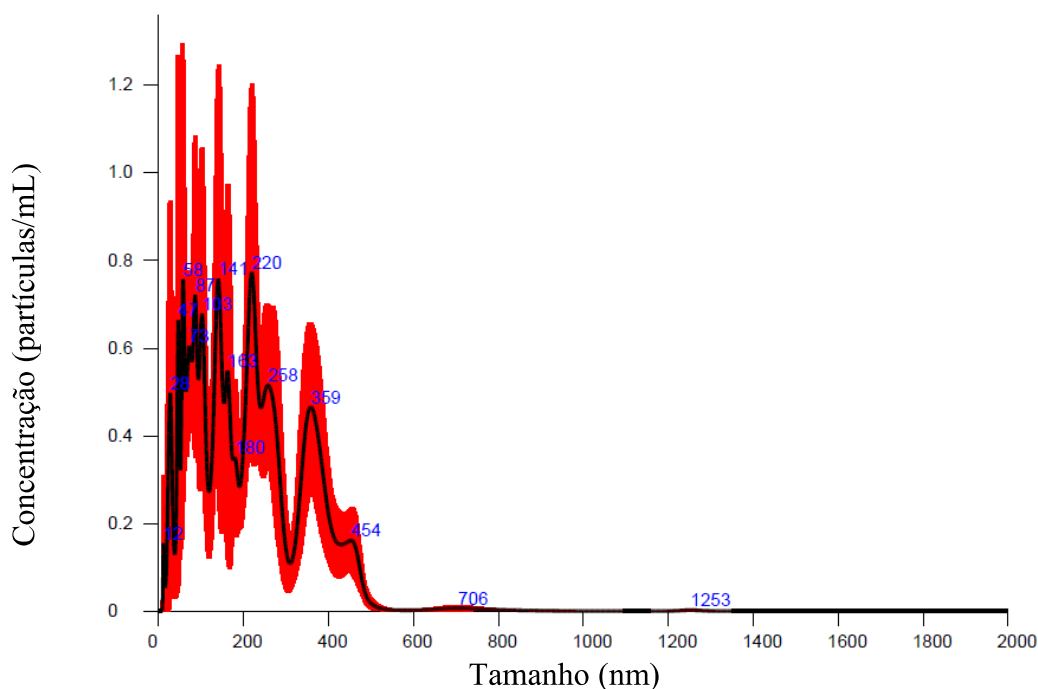


Figura 22 - Gráfico de distribuição da concentração de nanopartículas de Pt em função de seu diâmetro.

Pode-se observar pelo gráfico que o tamanho do diâmetro das nanopartículas é bastante variável, compreendendo uma faixa entre 12 nm até aproximadamente 500 nm.

A técnica DLS permitiu determinar o potencial zeta das nanopartículas de Pt e o seu tamanho médio. O valor do potencial zeta encontrado para as nanopartículas de Pt foi  $5 \pm 2 \text{ mV}$ . Este resultado mostra que as nanopartículas estão com a superfície carregada positivamente devido a presença do polieletrólito PEI que é positivo, logo, as nanopartículas formadas possuem afinidade a cargas negativas. Isto torna possível a obtenção das bicamadas formadas por PtNPs-PEI/UOx, uma vez que a enzima em pH = 7,4 encontra-se negativamente carregada.

O tamanho médio obtido para as nanopartículas de Pt pela técnica DLS foi de 170  $\pm$  28 nm.

#### **6.1.4. Resultados eletroquímicos**

Inicialmente foi feito um estudo do perfil dos filmes utilizando-se a voltametria cíclica. Para a determinação do AU foram utilizadas duas técnicas: amperometria e voltametria de pulso diferencial.

Para os estudos eletroquímicos foram escolhidos duas arquiteturas de filme. Para a primeira arquitetura, no qual as nanopartículas de Pt foram depositadas *in situ*, escolheu-se um filme contendo 5 bicamadas compostas por (PEI/UOx), cuja arquitetura final foi (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub>. Este número de bicamadas foi escolhido de acordo com os resultados obtidos nos estudos de crescimento do filme. Para a segunda arquitetura, onde as nanopartículas foram depositadas mergulhando-se o substrato em uma solução contendo as nanopartículas intercalando com a solução enzimática, o número de bicamadas composta por (PtNPs-PEI/UOx) foi de 3 bicamadas, e a arquitetura final do filme foi (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>. Foram estudados filmes com 3, 5 e 8 bicamadas. O resposta para os filmes com 3 bicamadas foram mais satisfatórias, por esse motivo, optou-se pelos filmes de 3 bicamadas.

#### **6.1.5. Determinação da área ativa do eletrodo**

A determinação da área ativa foi feita utilizando a voltametria cíclica. No experimento realizado, utilizou-se solução de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 5 mmol.L<sup>-1</sup> em KCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. O hexacianoferrato é uma espécie eletroativa que tem um perfil eletroquímico reversível e cujo coeficiente de difusão em cloreto de potássio 0,10 mol.L<sup>-1</sup> é conhecido (7,6.10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>). Desta forma, variando-se as velocidades de varredura obteve-se um gráfico de corrente em função da raiz da velocidade de varredura.

A Figura 23 traz os voltamogramas em diferentes velocidades de varredura ( $5 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $10 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $75 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $100 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $150 \text{ mV s}^{-1}$  e  $200 \text{ mV s}^{-1}$ ) para o **a)** ITO com filme de  $(\text{PEI/PVS})_5/\text{PtNPs}/(\text{PEI/UOX})_5$ ; **c)** ITO com filme de  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOX})_3$ ; e **e)** ITO sem filme; todos na presença da espécie eletroativa hexacianoferrato. Na Figura 23 é mostrado o gráfico de  $i_p$  em função de  $v^{1/2}$  para **b)** ITO com filme de  $(\text{PEI/PVS})_5/\text{PtNPs}/(\text{PEI/UOX})_5$ ; **d)** ITO com filme de  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOX})_3$ ; e **f)** ITO sem filme :

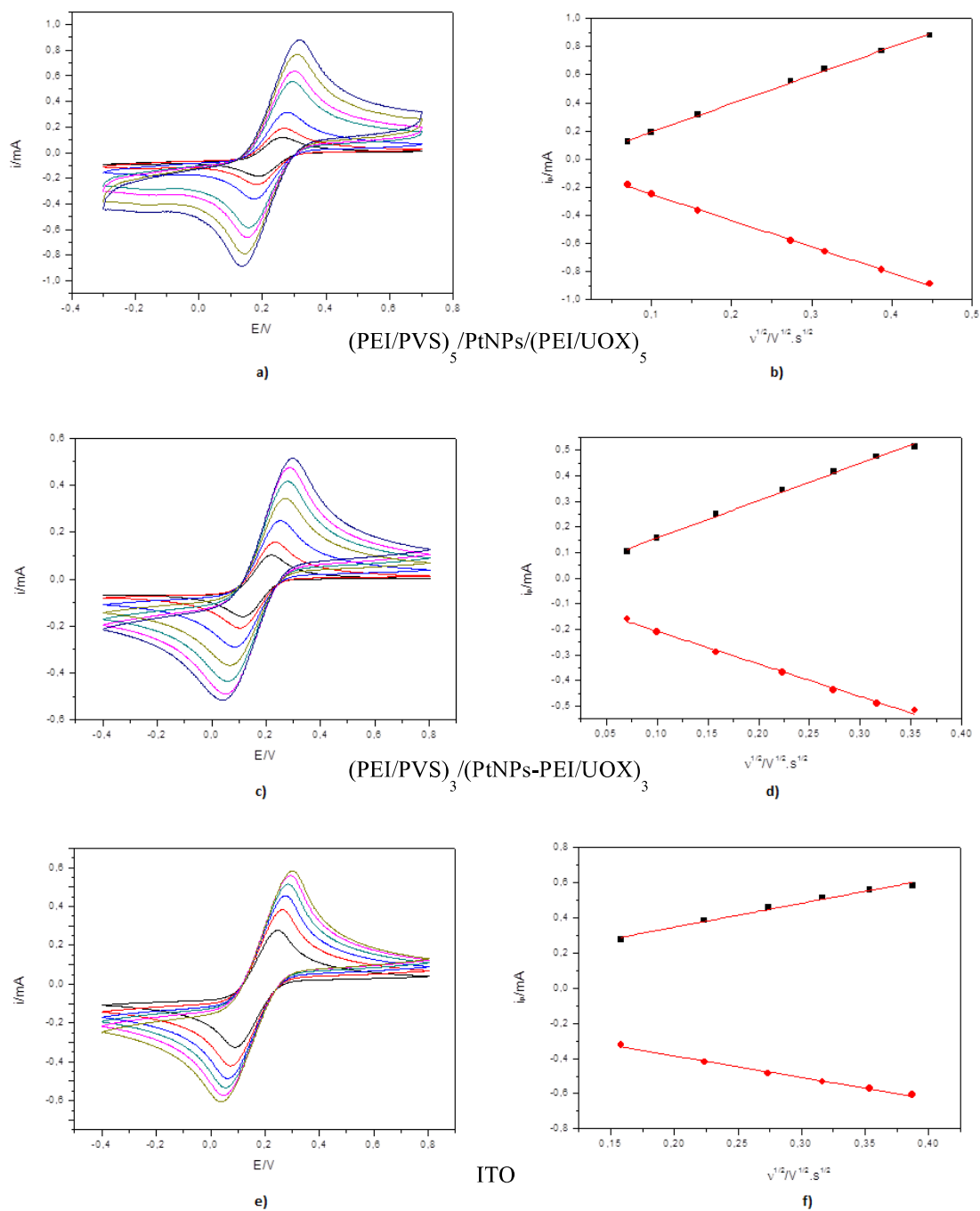


Figura 23 - Voltametrias cíclicas em diferentes velocidades de varredura para diferentes eletrodos.

Para as duas arquiteturas estudadas verifica-se uma boa linearidade nos gráficos de  $i_p$  em função de  $v^{1/2}$ , tanto para as correntes anódicas quanto para as catódicas, indicando que a reação é de difusão. Os valores dos coeficientes angulares, obtidos pela regressão

linear dos gráficos  $i_p$  vs.  $v^{1/2}$ , e as áreas eletroativas para cada arquitetura estão apresentadas na Tabela I:

TABELA I. Parâmetros obtidos dos voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 23.

<i>Arquitetura do eletrodo</i>	Coef. angular / $A.s^{1/2}.v^{1/2}$	$R^2$	Área geométrica/ $cm^2$	Área eletroativa / $cm^2$	RAZÃO $A_{GEO}$ / $A_{ATIVA}$
<i>ITO</i>	0,00136	0,987	0,63	0,37	0,58
<i>(PEI/PVS)<sub>3</sub>/PtNP/ (PEI/UOX)<sub>3</sub></i>	0,00202	0,999	0,63	0,54	0,85
<i>(PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNP- PEI/UOX)<sub>3</sub></i>	0,00146	0,997	0,49	0,40	0,81

Comparando-se as áreas eletroativas encontradas com as áreas geométricas para cada eletrodo, verifica-se que a primeira é ligeiramente menor que a segunda. Isto pode ser pelo fato de que nem todas as regiões do eletrodo são eletroativas, ou seja, apenas em algumas regiões do eletrodo ocorrem reações químicas. A área eletroativa do ITO foi de  $0,37 \text{ cm}^2$ , menor que a área geométrica de  $0,63 \text{ cm}^2$ . A modificação do ITO com as PtNPs e as 5 bicamadas compostas de (PEI/UOX) aumentou cerca de 45% a área eletroativa do eletrodo. Nesta arquitetura, o ITO foi recoberto com uma camada de nanopartículas depositadas *in situ*, o que pode explicar o aumento da área eletroativa para esta arquitetura, pois pode ter ocorrido uma elevação da área superficial. Para a segunda arquitetura, (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOX)<sub>3</sub>, o aumento foi de 40%, indicando também que houve um aumento da área superficial.

### 6.1.6. Medidas amperométricas

#### 6.2. Filme (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub> depositado sobre ITO

Com o objetivo de se avaliar o desempenho dos filmes fabricados frente à presença de AU, foram realizadas amperometrias em triplicata para cada uma das arquiteturas estudadas. O potencial escolhido para a realização das amperometrias foi  $E = +0,347$  V, visto que neste potencial obtiveram-se as melhores respostas amperométricas. A Figura 24 apresenta a resposta amperométrica do filme (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub>. Foram realizadas sucessivas adições de 100  $\mu\text{L}$  de ácido úrico 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  em 5 ml de tampão PBS pH = 7,4. No gráfico inserido é apresentada a curva analítica das adições de AU com faixa linear entre 3,92 e 11,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

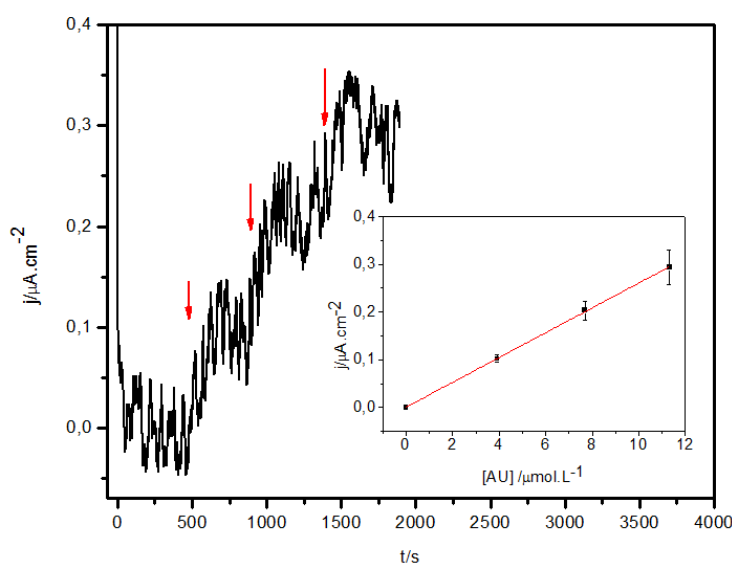


Figura 24 - Amperometria para o filme (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub>. Inserido: curva analítica das adições de ácido úrico com faixa linear entre 3,92 e 11,3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Pode-se verificar que a cada adição de ácido úrico ocorreu o aumento da corrente anódica. O aumento da corrente é linear com a concentração AU entre 3,92 e 11,13  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $R^2=0,999$ ). Conhecendo-se estes valores, foi possível determinar alguns parâmetros importantes para o biossensor, como a sensibilidade (coeficiente angular da



reta), o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ). Para os limites de detecção e quantificação, os cálculos são realizados utilizando-se as equações 11 e 12, segundo a IUPAC:

$$LD = \frac{3 \times SD}{\text{inclinação}} \quad \text{Eq.11}$$

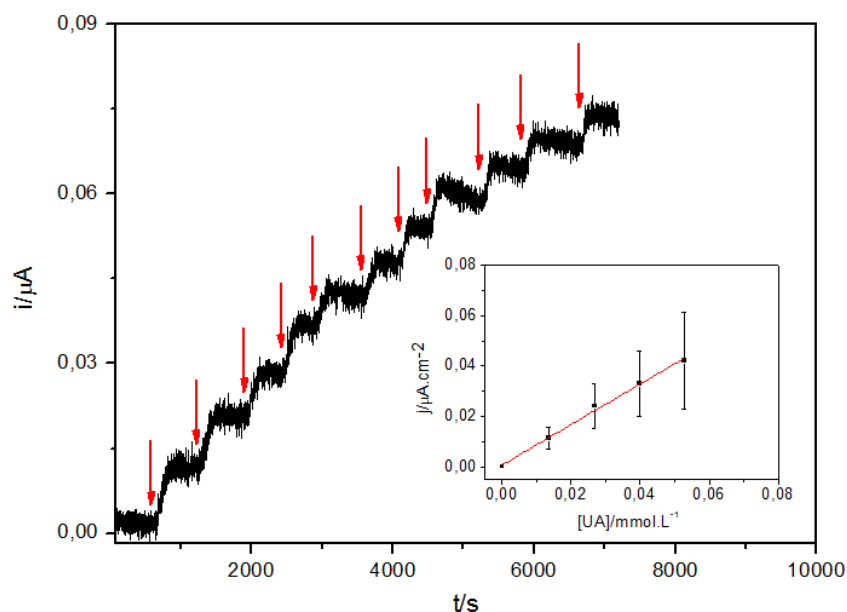
$$LQ = \frac{10 \times SD}{\text{inclinação}} \quad \text{Eq.12}$$

onde SD é o desvio padrão do branco.

Para o filme com arquitetura (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub> o LD encontrado foi de 5,17  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e sensibilidade de 26,04  $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}^{-1}$ . Para o LQ, foi encontrado o valor de 17,23  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

### 6.3. Filme (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> depositado sobre ITO

A Figura 25 apresenta a resposta amperométrica do filme (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>. Foram realizadas sucessivas adições de 100  $\mu\text{L}$  de ácido úrico 2  $\text{mmol.L}^{-1}$  em 7 ml de tampão PBS pH = 7,4. No gráfico inserido é apresentada a curva analítica das adições de AU com faixa linear entre 14,18 e 55,56  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .



**Figura 25 - Amperometria do filme (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>. Inserido: curva analítica das adições de ácido úrico com faixa linear entre 14,18 e 55,56  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$**

A cada adição de ácido úrico ocorreu o aumento da corrente anódica. O aumento da corrente é linear com a concentração e AU entre 14,18 e 55,56  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $R^2=0,993$ ), com LD de 4,69  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e sensibilidade de 7,83  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$ . O valor do LQ encontrado foi de 15,62  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 6.3.1. Estudo de potenciais interferentes

Os possíveis interferentes escolhidos para este estudo foram o ácido ascórbico (AA) e a dopamina (DA). Testes amperométricos demonstraram que o biossensor respondeu quando na presença destes interferentes, nas duas arquiteturas escolhidas. Ressalta-se que foram realizadas amperometrias em diferentes potenciais para verificar se haveria um desses onde apenas o AU responderia, porém, o AA respondeu em todos os potenciais testados em que o AU também respondeu.

Para contornar este problema, foram realizados estudos com voltametria de pulso diferencial.

### 6.3.2. Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (DPV) também foi utilizada para desenvolver o método de determinação para o AU. Foram realizados DPV para as arquiteturas  $(\text{PEI/PVS})_5/\text{PtNPs}/(\text{PEI/UOx})_5$  e  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ . Apenas para a segunda arquitetura obteve-se respostas satisfatórias. Após a otimização dos parâmetros (tempo de modulação, amplitude e velocidade), foram determinados os picos dos potenciais para o AA, AU e DA.

A Figura 26 apresenta os DPV obtidos para as três substâncias (AA, AU e DA) em eletrólito tampão PBS  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$   $\text{pH} = 7,4$ . Pode-se observar que o pico de corrente para o AA (Figura 26a) está localizado em um potencial de  $+0,78 \text{ V}$ . Para o AU (Figura 26.b) o pico de corrente está em um potencial igual a  $+0,76 \text{ V}$  e para a DA (Figura 26.c) o pico de corrente está em um potencial de  $+0,20 \text{ V}$ .

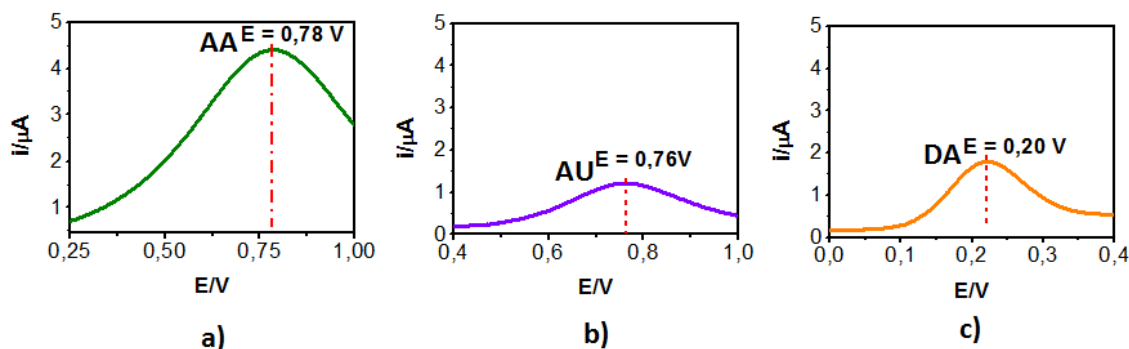


Figura 26 - DPV para as diferentes substâncias. (a) AA, (b) AU, (c) DA para o filme  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ .

Pode-se verificar pelos gráficos da Figura 26 que a determinação do AU na presença da DA por DPV é viável, uma vez que os potenciais nos picos de corrente das duas substâncias são bem afastadas. A Fig. 27 mostra um voltamograma obtido em um teste simultâneo para a determinação de AU e DA.

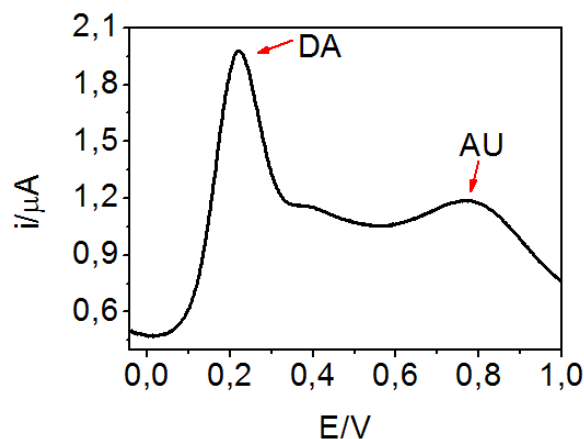


Figura 27 - DPV para os picos de corrente da DA e AU medidos simultaneamente para o filme  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ .

Porém, os potenciais nos picos de corrente para o AU e o AA são muito próximos (Figura 26),  $E=+0,76$  V e  $E=+0,78$  V, respectivamente. Logo, nas condições experimentais estudadas, não é possível determinar a quantidade de AU simultaneamente ao AA, pois os picos de corrente se alargam e se sobrepõem, como ilustra a Figura 28:

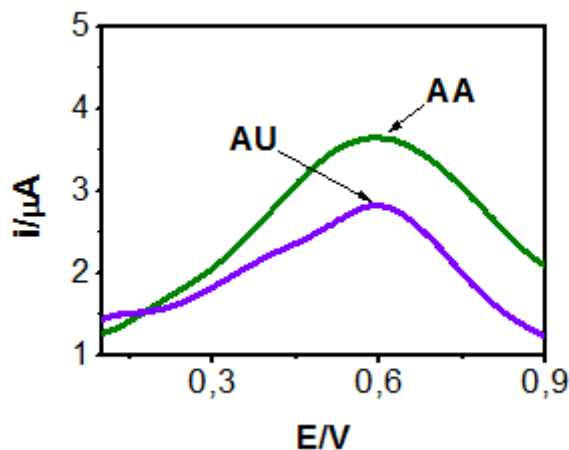
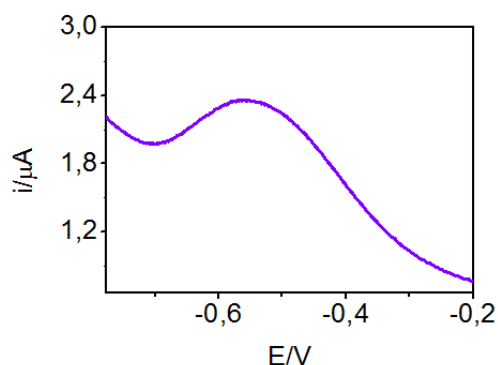


Figura 28 - a DPV para os picos de corrente do AA e AU medidos simultaneamente para o filme  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ .

Pode-se observar pela Fig. 28 que, ao serem medidos simultaneamente, o potencial nos picos de corrente tanto para o AA, quanto para o AU sofrem um

deslocamento para a esquerda (+0,58 V para o AA e +0,6 V para o AU), além de se sobrepor.

Para solucionar este problema, um segundo estudo foi realizado no qual o eletrólito PBS pH = 7,4 foi substituído por uma solução de NaCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH = 7. Na nova condição, os picos de corrente do AA e do AU, mencionados anteriormente, continuaram se sobrepondo, no entanto, verificou-se o surgimento de um pico de corrente em potencial E = -0,55 V. Uma medida realizada apenas com o filme ITO/(PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>, em eletrólito de NaCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, sem adição das substâncias investigadas, evidenciou a presença do pico de corrente em potencial E = -0,55 V como mostrado na Figura 29:



**Figura 29 - DPV para o filme de arquitetura ITO/(PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> em solução salina NaCl 0,1mol.L<sup>-1</sup>.**

Desta forma, este pico de corrente em E = -0,55 V foi atribuído ao filme.

Foram realizadas medidas adicionando-se alíquotas de AA e AU, individualmente (Fig. 30) e simultaneamente (Fig. 31), para verificar o comportamento deste pico de corrente. Os resultados obtidos possibilitaram verificar que quando adicionado alíquotas de 100 μL de AA, observou-se que conforme a concentração de AA aumentava, o pico de corrente localizado em potencial E= -0,55 V se reduzia. Porém, a cada adição de alíquotas de AU foi observado que o aumento da concentração de AU implicava no

aumento da intensidade do pico de corrente no potencial  $E = -0,55\text{V}$ . Este comportamento pode ser observado na Figura 30.

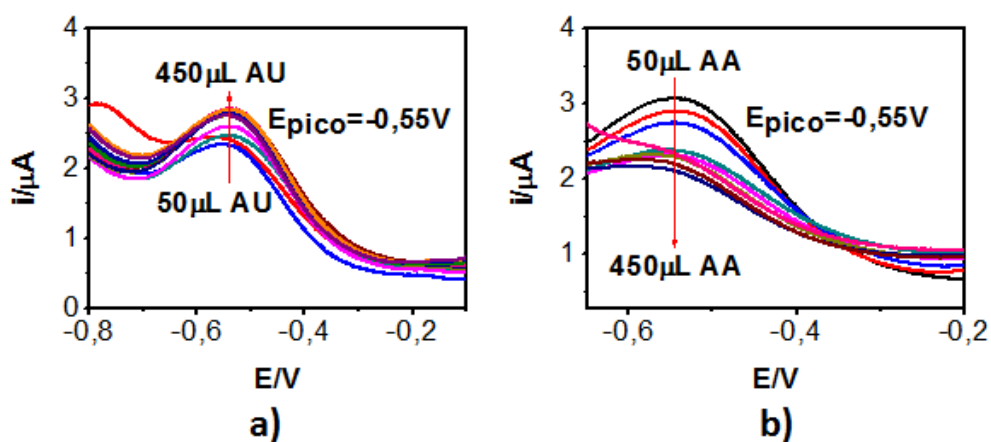


Figura 30 - DPV em NaCl 0,1 mol/L para o (a) AU e (b) AA em diferentes concentrações para o filme  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ .

A Figura 31 apresenta um voltamograma de DPV realizado com adição simultânea de AA e AU:

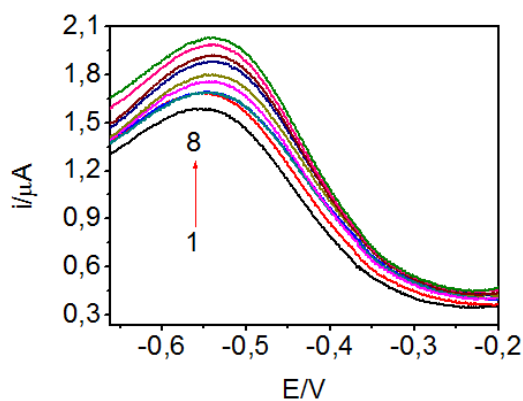
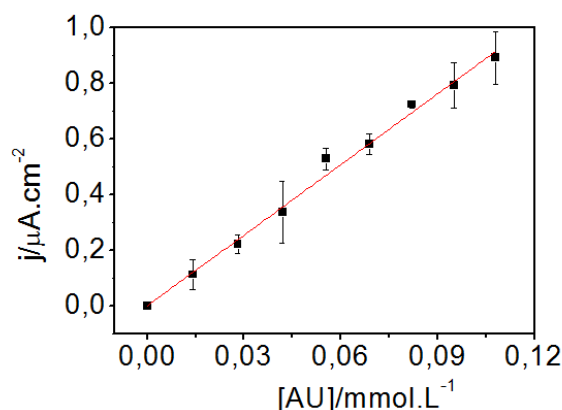


Figura 31 - Voltamograma obtido por DPV para a adição simultânea de AU e AA para o filme  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ .

Este experimento foi realizado em triplicata. A adição simultânea de AA e AU ocasionou o aumento do pico de corrente em  $E = -0,55\text{V}$ , como observado na Fig. 31. O aumento do pico de corrente foi atribuído à presença de AU, uma vez que a adição de AA acarretou no decréscimo do pico de corrente no potencial  $E = -0,55\text{V}$ . Desta forma, foi

possível construir uma curva analítica para o AU considerando-se o pico de corrente em potencial  $E=-0,55$  V, como mostrado na Fig. 32:



**Figura 32 - Curva analítica para o AU obtido a partir do voltamograma para diferentes concentrações para o filme (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>.**

O valor da sensibilidade encontrado foi de  $8,46 \mu A. cm^{-2}. mmol^{-1}. L^{-1}$ , com um coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,993$ ). O valor calculado para o LD ( $3\sigma_B$ /inclinação da curva analítica) foi  $0,11 \mu mol.L^{-1}$ , e o valor do LQ foi  $0,37 \mu mol.L^{-1}$ . A faixa de concentração analisada foi entre  $14,18 \mu mol.L^{-1}$  até  $108,11 \mu mol.L^{-1}$ .

#### **6.4. Comparação das técnicas amperometria e voltametria de pulso diferencial**

Após a determinação de AU por amperometria e DPV e a construção das curvas analíticas em cada técnica, foi possível fazer comparação entre os resultados obtidos para as diferentes técnicas e para as diferentes arquiteturas. Na tabela, a arquitetura (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub> será chamada “Arquitetura 1” e a arquitetura (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> será chamada “Arquitetura 2”.

A Tabela II apresenta alguns dados comparativos entre as duas técnicas para a determinação de AU.

Tabela II – Comparação das técnicas voltamétricas de onda quadrada e de pulso diferencial para determinação de AU.

Parâmetros	Amperometria		DPV	
	Arquitetura 1	Arquitetura 2	Arquitetura 1	Arquitetura 2
<b>Sensibilidade</b> ( $\mu A \cdot cm^{-2} \cdot mmol^{-1} \cdot L^{-1}$ )	26,04	7,83	-	8,46
<b>LD</b> ( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	5,17	4,69	-	0,11
<b>LQ</b> ( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	17,23	15,62	-	0,37

Observando-se os dados da Tabela II, pode-se definir que o método voltamétrico de detecção é mais eficiente que o método amperométrico para os filmes de arquitetura (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>, pois para o primeiro método os valores de LD e LQ encontrados são menores, ou seja, menores concentrações são possíveis de serem detectados e quantificados, com certo limite de confiabilidade, além da maior sensibilidade.

Quando são comparados os resultados obtidos para amperometria para as duas arquiteturas, os valores de LD e LQ encontrados para a arquitetura (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> foram menores que os valores encontrados para a arquitetura (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub>, desta forma, conclui-se que os filmes formados por (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> são mais eficientes que os filmes formados por (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub>.

A Tabela III mostra os valores de LD encontrados na literatura para alguns biossensores enzimáticos amperométricos que fazem uso de UOx para detecção de AU.

Tabela III – Comparação de biossensores quanto à suporte de imobilização, método de imobilização, faixa linear de detecção e limite de detecção.



Suporte de imobilização	Método de imobilização	Faixa linear de detecção	Limite de detecção	Referência
(PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI)*	Interações eletrostáticas	14,18 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ até 108,11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	0,11 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Este trabalho
(PEI/PVS) <sub>3</sub> /(PtNPs-PEI)**	Interações eletrostáticas	14,18 – 55,56 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	4,68 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Este trabalho
Óxido de grafeno	Ligação covalente	0,02 – 0,49 $\text{mmol.L}^{-1}$	3,45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Omar et al.,2016 <sup>46</sup>
PBNPs/cMWCNT/PANI/Au	Crosslinking e adsorção	0,005-0,8 $\text{mmol.L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Rawal et al.,2012 <sup>18</sup>
AuNPs/MWCNT	Ligação covalente	0,01 – 0,8 $\text{mmol.L}^{-1}$	0,01 $\text{mmol.L}^{-1}$	Chauhan and Pundir, 2011 <sup>47</sup>
PANI/MWCNT	Ligação covalente	0,005-0,06 $\text{mmol.L}^{-1}$	5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Bhambi et al., 2010 <sup>48</sup>

\* resultados obtidos por DPV.

\*\* resultados obtidos por amperometria.

Pode-se verificar pela tabela 6.4 que os valores de limite de detecção para diferentes biossensores para ácido úrico encontrados na literatura apresentam limites de detecção com valores próximos a 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Desta forma, os biossensores apresentados neste trabalho apresentaram LD próxima aos biossensores relatados na literatura.

## 7. Conclusão

Neste trabalho foi proposto a construção de biossensores enzimáticos para a determinação de AU associando a UOx com nanopartículas de Pt. Foram construídas e estudadas duas arquiteturas distintas de filmes,  $(\text{PEI/PVS})_5/\text{PtNPs}/(\text{PEI/UOx})_5$  e  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ . Para ambas arquiteturas, a técnica LbL se mostrou eficiente para a deposição dos filmes. As análises por espectroscopia UV-vis forneceram informações sobre o crescimento dos filmes e sobre a organização das multicamadas. Os resultados obtidos demonstraram que a imobilização das bicamadas de PEI/UOx sobre o eletrodo escolhido foi possível. As análises feitas em AFM mostraram que a deposição *in situ* das nanopartículas de platina foi possível na construção do filme  $(\text{PEI/PVS})_5/\text{PtNPs}/(\text{PEI/UOx})_5$ , e pode-se verificar também a ocorrência da imobilização da UOx a partir dos valores de rugosidade obtidos. As técnicas NTA e DLS comprovaram a presença de PtNPs na suspensão que foi preparada para a construção dos filmes  $(\text{PEI/PVS})_3/(\text{PtNPs-PEI/UOx})_3$ . Também foi possível determinar o tamanho médio e a distribuição por unidade de volume da suspensão no valor de  $205 \pm 26 \text{ nm}$  e  $1,8 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$  partículas/mL, respectivamente.

As análises eletroquímicas de voltametria cíclica dos filmes permitiram determinar a área ativa dos eletrodos. Os eletrodos de ITO modificados apresentaram um aumento da área eletroativa de cerca de 40% superior quando comparado com a área eletroativa do ITO não modificado. Este resultado é desejável na construção de biossensores. A viabilidade dos filmes como biossensor foi verificada pelo aumento da corrente de oxidação nos testes amperométricos devido a adição de AU. No entanto, os filmes se mostraram sensíveis na presença de interferentes, como ácido AA e DA. Para contornar este problema, foram realizadas medidas de DPV com o filme

(PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub>, onde foi possível determinar o AU mesmo na presença de DA e AA.

O biossensor (PEI/PVS)<sub>5</sub>/PtNPs/(PEI/UOx)<sub>5</sub> mostrou-se linear na faixa de detecção 3,92 e 11,13  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $R^2=0,999$ ) com limite de detecção de 5,17  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Este resultado foi obtido pelo método amperométrico.

O biossensor (PEI/PVS)<sub>3</sub>/(PtNPs-PEI/UOx)<sub>3</sub> mostrou-se linear na faixa de detecção 14,18 e 55,56  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ( $R^2=0,993$ ), com LD de 4,69  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para o método amperométrico. Para o método DPV o valor encontrado para o LD foi 0,11  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A faixa linear de detecção foi entre 14,18  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  até 108,11  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Desta forma, verifica-se que o método DPV foi mais sensível na detecção de AU quando comparado ao método amperométrico, além de ter possibilitado a determinação simultânea do AU na presença de AA e DA.

Comparando-se os valores de LD obtidos para os biossensores fabricados neste trabalho com os valores de LD encontrados na literatura pode-se concluir que os biossensores propostos são eficientes para a detecção de ácido úrico.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Choi, H. K. Pathogenesis of Gout. *Ann. Intern. Med.* **143**, 499 (2005).
2. de Oliveira, E. P. & Burini, R. C. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetol. Metab. Syndr.* **4**, 12 (2012).
3. Ghosh, T., Sarkar, P. & Turner, A. P. F. A novel third generation uric acid biosensor using uricase electro-activated with ferrocene on a Nafion coated glassy carbon electrode. *Bioelectrochemistry* **102**, 1–9 (2015).
4. Thakur, B. & Sawant, S. N. Polyaniline/Prussian-Blue-Based Amperometric Biosensor for Detection of Uric Acid. *ChemPlusChem* **78**, 166–174 (2013).
5. Zhao, Y., Yang, X., Lu, W., Liao, H. & Liao, F. Uricase based methods for determination of uric acid in serum. *Microchim. Acta* **164**, 1–6 (2009).
6. Sato, K. & Anzai, J. Dendrimers in Layer-by-Layer Assemblies: Synthesis and Applications. *Molecules* **18**, 8440–8460 (2013).
7. Ramasamy, R., Gopal, N., Kuzhandaivelu, V. & Murugaiyan, S. Biosensors in clinical chemistry: An overview. *Adv. Biomed. Res.* **3**, 67 (2014).
8. Banica, F.-G. *Chemical sensors and biosensors: fundamentals and applications*. (Wiley, 2012).
9. BANICA. *Sensors and biosensors: Fundamentals and applications*.
10. Doelle, H. W., Rokem, J. S. & Berovic, M. *BIOTECHNOLOGY - Volume II: Fundamentals in Biotechnology*. **2**, (Horst Werner Doelle, Stefan Rokem, 2009).
11. *Bioelectrochemistry: [fundamentals, applications and recent developments]*.

(Wiley-VCH, 2011).

12. Putzbach, W. & Ronkainen, N. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* **13**, 4811–4840 (2013).
13. Sarma, A. K., Vatsyayan, P., Goswami, P. & Minteer, S. D. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2313–2322 (2009).
14. Cesar Paixão, T. R. L. & Reddy, S. M. *Materials for Chemical Sensing*. (Springer, 2017).
15. *Multilayer thin films: sequential assembly of nanocomposite materials*. (Wiley-VCH, 2012).
16. Wu, Y. & Hu, S. Biosensors based on direct electron transfer in redox proteins. *Microchim. Acta* **159**, 1–17 (2007).
17. Moraes, M. L., Rodrigues Filho, U. P., Oliveira, O. N. & Ferreira, M. Immobilization of uricase in layer-by-layer films used in amperometric biosensors for uric acid. *J. Solid State Electrochem.* **11**, 1489–1495 (2007).
18. Rawal, R., Chawla, S., Chauhan, N., Dahiya, T. & Pundir, C. S. Construction of amperometric uric acid biosensor based on uricase immobilized on PBNPs/cMWCNT/PANI/Au composite. *Int. J. Biol. Macromol.* **50**, 112–118 (2012).
19. Piermarini, S. *et al.* Uricase biosensor based on a screen-printed electrode modified with Prussian blue for detection of uric acid in human blood serum. *Sens. Actuators B Chem.* **179**, 170–174 (2013).
20. Yun, H.-J., Hong, H., Lee, J. & Choi, C.-J. Chemical and Structural Properties of

Polyethyleneimine Film Coated on a SiO<sub>2</sub> Substrate in Different Concentrations. *Mater. Trans.* **55**, 801–805 (2014).

21. Xu, D. *et al.* Polyethyleneimine Capped Silver Nanoclusters as Efficient Antibacterial Agents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **13**, 334 (2016).

22. Hess, M. *et al.* Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure Appl. Chem.* **78**, (2006).

23. Tabujew, I. & Peneva, K. in *RSC Polymer Chemistry Series* (eds. Samal, S. K. & Dubruel, P.) 1–29 (Royal Society of Chemistry, 2014).

24. Dobrynin, A. & Rubinstein, M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci.* **30**, 1049–1118 (2005).

25. Wang, F., Liu, P., Nie, T., Wei, H. & Cui, Z. Characterization of a Polyamine Microsphere and Its Adsorption for Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 17–29 (2012).

26. Wu, X. W., Lee, C. C., Muzny, D. M. & Caskey, C. T. Urate oxidase: primary structure and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 9412–9416 (1989).

27. Alvares, K. *et al.* Rat urate oxidase produced by recombinant baculovirus expression: formation of peroxisome crystalloid core-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4908–4912 (1992).

28. Liu, Z., Lu, D., Li, J., Chen, W. & Liu, Z. Strengthening intersubunit hydrogen bonds for enhanced stability of recombinant urate oxidase from *Aspergillus flavus*: molecular simulations and experimental validation. *Phys Chem Chem Phys* **11**, 333–340 (2009).

29. Sahay, M. *Diseases of renal parenchyma*. (Intech, 2012).
30. Mrug, S. & Mrug, M. Uric acid excretion predicts increased aggression in urban adolescents. *Physiol. Behav.* **163**, 144–148 (2016).
31. Nguedia Assob, J. C. The Relationship between Uric Acid and Hypertension in Adults in Fako Division, SW Region Cameroon. *J. Nutr. Food Sci.* **04**, (2014).
32. Khanna, D. *et al.* 2012 American College of Rheumatology guidelines for management of gout. Part 1: Systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arthritis Care Res.* **64**, 1431–1446 (2012).
33. Ostiguy, C. & IRSST (Québec). *Nanoparticles: actual knowledge about occupational health and safety risks and prevention measures*. (Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail du Québec, 2006).
34. Faust, C. B. *Modern chemical techniques*. (Education Department, Royal Society of Chemistry, 1992).
35. Owen, T. *Fundamentals of Modern UV-visible Spectroscopy: Primer*.
36. *Atomic force microscopy in liquid: biological applications*. (Wiley-VCH, 2012).
37. Filipe, V., Hawe, A. & Jiskoot, W. Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharm. Res.* **27**, 796–810 (2010).
38. Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. (Dover Publications, 2000).
39. *Nanotechnology 2011: advanced materials, CNTs, particles, films and composites*. (CRC Press, 2011).
40. Roussel, T. J., Jackson, D. J., Baldwin, R. P. & Keynton, R. S. in *Encyclopedia of*

*Microfluidics and Nanofluidics* (ed. Li, D.) 39–47 (Springer US, 2008).

41. Holler, F. J., Skoog, D. A., Crouch, S. R. & Pasquini, C. *Princípios de análise instrumental*. (Bookman, 2009).

42. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*. (Prentice Hall PTR, 1997).

43. Wang, J. *Analytical electrochemistry*. (Wiley-VCH, 2006).

44. Zhang, X., Zan, X. & Su, Z. Polyelectrolyte multilayer supported Pt nanoparticles as catalysts for methanol oxidation. *J. Mater. Chem.* **21**, 17783 (2011).

45. Casanova, M. C. R. Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis. (Instituto de Química de São Carlos, 2010).

46. Omar, M. N., Salleh, A. B., Lim, H. N. & Ahmad Tajudin, A. Electrochemical detection of uric acid via uricase-immobilized graphene oxide. *Anal. Biochem.* **509**, 135–141 (2016).

47. Chauhan, N. & Pundir, C. S. An amperometric uric acid biosensor based on multiwalled carbon nanotube–gold nanoparticle composite. *Anal. Biochem.* **413**, 97–103 (2011).

48. Bhambi, M., Sumana, G., Malhotra, B. D. & Pundir, C. S. An Amperometric Uric Acid Biosensor Based on Immobilization of Uricase onto Polyaniline-multiwalled Carbon Nanotube Composite Film. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.* **38**, 178–185 (2010).