

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI  
Programa de Pós Graduação em Materiais para Engenharia  
Departamento de Física e Química/ Instituto de Ciências Exatas  
Dissertação de Mestrado

Alessandra Nogueira Santos

***ASPECTOS BIOELETROQUÍMICOS DE DENDRÍMEROS COMO  
NANOPLATAFORMAS PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS***

*Itajubá / MG*

*2008*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI  
Programa de Pós Graduação em Materiais para Engenharia  
Departamento de Física e Química/ Instituto de Ciências Exatas  
Dissertação de Mestrado

Alessandra Nogueira Santos

***ASPECTOS BIOELETRQUÍMICOS DE DENDRÍMEROS COMO  
NANOPLATAFORMAS PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS***

*Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da  
Universidade Federal de Itajubá, como requisito para a  
obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para  
Engenharia.*

*Área de concentração: Biomateriais*

*Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz - UNIFEI*

*Co-orientador: Prof. Dr. Demétrio A. Werner Soares - UNIFEI*

*Itajubá / MG  
2008*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ – UNIFEI  
Programa de Pós Graduação em Materiais para Engenharia  
Departamento de Física e Química/ Instituto de Ciências Exatas  
Dissertação de Mestrado

***ASPECTOS BIOELETROQUÍMICOS DE DENDRÍMEROS COMO  
NANOPLATAFORMAS PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS***

Alessandra Nogueira Santos

*Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da  
Universidade Federal de Itajubá, como requisito para a  
obtenção do título de mestre em Ciências dos Materiais para  
Engenharia.*

*Área de concentração: Biomateriais*

*Aprovada por:*

\_\_\_\_\_ (Orientador)  
*Prof. Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz- UNIFEI*

\_\_\_\_\_ (Co- orientador)  
*Prof. Dr. Demétrio Arthur Werner Soares- UNIFEI*

\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Rodrigo Gribel Lacerda- UFMG*

\_\_\_\_\_  
*Prof. Dr. Alexandre Carlos Brandão Ramos- UNIFEI*

*Itajubá / MG  
2008*

# Agradecimentos

A Deus, que mais uma vez permaneceu ao meu lado me dando força e saúde para vencer todos os obstáculos surgidos.

Aos meus pais, Araci Augusto e Diva, pelo esforço contínuo para que eu pudesse ir à busca da realização de um sonho.

Aos meus filhos, Victor Augusto e Arthur, demonstrando uma maturidade incomum às suas idades.

Ao meu irmão Fábio Nogueira, exemplo de garra e sabedoria.

Ao professor Dr. Álvaro Antônio Alencar de Queiroz, exemplo de competência, amizade e acima de tudo, paixão pela ciência.

Ao professor Dr. Demétrio Arthur Werner, por ter acreditado em mim, pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos e pela co-orientação.

Ao professor Dr. Écio pelo incentivo, amizade e pelos ensinamentos.

Ao professor Dr. Luiz Francisco Pontin pela amizade, paciência, incentivo e pelas contribuições.

À profesora Dra. Ana Cláudia pelas colaborações, amizade e pelos conselhos.

À profesora Dra. Maria Helena e seu esposo professor Dr. Filiberto, pela amizade e confiança.

Aos demais professores que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento científico.

Aos técnicos de laboratório Glauber e Kalú, por sempre me fornecerem todas as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de meu trabalho e pela amizade.

Às funcionárias da PRPPG, em especial à Maria Alta, Sônia, Margarete e Cristina.

Aos funcionários da secretaria do ICE-UNIFEI, em especial à Roseli, Marília, Edvandra, e Helinho.

Aos profissionais da saúde, Dr. Vinícius e Dr. Alessandro, exemplos de competência.

Aos responsáveis pelos laboratórios de análises clínicas Carlos Chagas, Pasteur, Prestolab, Dalmo Coutinho, Laboratório Darto; pelas informações e experiências transmitidas.

Aos amigos mestres Edson Fernandes, Nirton Cristi, Mayler Martins e Vanessa Giarola pelas contribuições.

Aos colegas de classe, em especial, Wagner, Marcelo, Amaury, Adelaine, Alexandra, Janderson, Celso, Fabiana, Cristiano, enfim, a todos os colegas, pelo apoio e amizade.

À Capes pelo auxílio financeiro.

Por fim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Dedico este trabalho, em especial, a dois grandiosos homens, Víctor Augusto e Arthur Nogueira. Sem o apoio de vocês, a realização deste, seria impossível.

**SUMÁRIO**

<b>Lista de Figuras</b>	v
<b>Lista de Tabelas</b>	ix
<b>Lista de Abreviaturas</b>	x
<b>Resumo</b>	xii
<b>Abstract</b>	xiv
<b>Introdução</b>	1
<b>Capítulo 1 – Biossensores para a monitoração de hemometabólitos</b>	4
1.1 Introdução	4
1.2 Histórico do desenvolvimento dos biossensores e o Estado da arte	5
1.3 Biossensores eletroquímicos	8
1.3.1 Biossensores amperométricos	9
1.3.2. Biossensores potenciométricos	12
1.3.3 Biossensores ópticos	14
1.3.4 Biossensores piezoelétricos	15
1.3.5 Biossensores térmicos ou calorimétricos	16
1.4 Considerações parciais	18
1.5 Referências	19
<b>Capítulo 2 – A natureza química das enzimas</b>	22
2.1 Noções gerais	22
2.2 Classificação das enzimas	24
2.3 Mecanismos das reações catalisadas por enzimas	25
2.4 Sítio ativo catalítico	27
2.4.1 Modelo chave-fechadura	28
2.4.2 Modelo do encaixe induzido	28

2.5 Mecanismos catalíticos	29
2.6 Fatores que influenciam a atividade enzimática	33
2.7 Técnicas de imobilização	36
2.7.1 Métodos de imobilização de enzimas por retenção física	37
2.7.1.1 Adsorção	37
2.7.1.2 Retenção em membranas	37
2.7.1.3 Microencapsulamento	37
2.7.1.4 Eletropolimerização	37
2.7.1.5 Oclusão em matriz polimérica	38
2.7.2 Métodos de imobilização química	38
2.7.2.1 Ligação covalente	38
2.7.2.2 Ligações covalentes reticuladas	40
2.8 Cinética enzimática	41
2.9 Aplicações das enzimas em biossensores	48
2.9.1 A enzima glicose oxidase (GOx)	48
2.2.2 A enzima colesterol oxidase (COx)	49
2.2.3 A enzima urease	51
2.10 Considerações parciais	53
2.11 Referências	54
<b>Capítulo 3 - Plataformas nanoestruturadas para a imobilização de enzimas</b>	<b>58</b>
3.1 O desenvolvimento dos dendrímeros	58
3.2 Histórico sobre a Síntese dos Primeiros Dendrímeros	61
3.3 Os dendrímeros e suas propriedades	64
3.4 A síntese de macromoléculas dendríticas	66
3.5 Dendrímeros estudados neste trabalho: CHD, PGLD e PPID	67

3.6 Considerações parciais	70
3.7 Referências	71
<b>Capítulo 4 – Os mediadores de elétrons nas reações enzimáticas</b>	<b>73</b>
4.1 O mecanismo de ação das enzimas e o processo de mediação de elétrons	73
4.2 Sistemas utilizados como mediadores de elétrons	74
4.3 Polímeros condutores como mediadores de elétrons	75
4.3.1 As Polianilinas	77
4.3.2 Estrutura de transporte na interface polímero-metal	80
4.4 Considerações parciais	83
4.5 Referências	84
<b>Capítulo 5 – As redes neurais artificiais no processo de transdução de sinais</b>	<b>88</b>
5.1 Inteligência Artificial	88
5.2 Paralelo entre Redes Neurais Artificiais e Redes Neurais Naturais	89
5.3 Histórico das Redes Neurais artificiais	92
5.4 Arquitetura da rede	96
5.5 Funcionamento das redes neurais artificiais	98
5.6 Dificuldades encontradas	100
5.7 Considerações parciais	101
5.8 Referências	102
<b>Capítulo 6 – Objetivos da dissertação</b>	<b>105</b>
<b>Capítulo 7 – Procedimento experimental</b>	<b>106</b>
7.1 Reagentes	106
7.2 Síntese dos dendrímeros PGLD, CHD e PPID e preparo dos bioconjugados	106
7.3 Preparo dos eletrodos enzimáticos	109
7.4 Referências	113

<b>Capítulo 8 – Resultados e discussões</b>	115
<b>8.1 Caracterização dos nanotubos de PANI</b>	115
<b>8.2 Caracterização dos Dendrímeros</b>	119
<b>8.3 Biossensores de glicose</b>	121
<b>8.4 Biossensores de colesterol</b>	130
<b>8.5 Biossensores de uréia</b>	138
<b>8.6 Determinação dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia simultaneamente utilizando uma RNA</b>	145
<b>8.7 Referências</b>	151
<b>Capítulo 9 – Conclusões</b>	154
<b>Capítulo 10 – Perspectivas futuras</b>	156

## Lista de Figuras

---

Figura 1.1 - Representação de um biossensor: biocatalizador	5
Figura 1.2 - Eletrodo de oxigênio de Clark. A) Eletrodo de trabalho Pt, B) eletrodo de referência Ag/AgCl, C) eletrólito semi-saturado de KCl, D) membrana de Teflon®, E) anel de borracha para fixação, F) fonte de tensão para polarização e G) instrumento para medição da corrente de saída	6
Figura 1.3 - Gráfico comparativo para os tipos de biossensores mais estudados	8
Figura 1.4 - Representação esquemática para biossensores amperométricos segundo o processo de transferência de cargas	9
Figura 1.5 – Biossensores amperométricos comerciais utilizados em análises clínicas	10
Figura 1.6 - Representação esquemática de um biossensor amperométrico de primeira geração	11
Figura 1.7 – (A) Estrutura de um MOSFET (a) em comparação com um ISFET (b). (B) Estrutura física de um MOSFET	13
Figura 1.8 – Montagem de um ENFET. (A) Substrato de Silício, (B) Dopagem e formação de óxido, (C) Deposição da membrana íon-seletiva e (D) imobilização da enzima e membrana protetora	14
Figura 1.9 – Ilustração de um biossensor óptico	15
Figura 1.10 – (A) Microbalança de cristal de quartzo; (B) Foto de um transdutor	16
Figura 1.11 – (A) Diagrama esquemático de um biossensor calorimétrico; (B) Ilustração de um termistor do tipo NTC	18
Figura 2.1 - Diagrama energético de reação catalisada e de reação não-catalisada	26
Figura 2.2 - Modelo chave-fechadura. A interação entre a enzima (com estrutura rígida) e seu substrato	28
Figura 2.3 - Modelo do encaixe induzido. A ligação do substrato à enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe	29
Figura 2.4 - Catálise por proximidade e orientação	30
Figura 2.5 - Representação esquemática do mecanismo para a reação catalisada pelo íon Metálico	31
Figura 2.6 - Reação ácido-base geral: hidrólise de um éster	32
Figura 2.7 - Representação de uma catálise covalente. Onde X = RCOO-, RNH <sub>2</sub> , ArOH, His, ROH, RSH	33
Figura 2.8 - Efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima	34
Figura 2.9 - Atividade enzimática <i>versus</i> pH	35
Figura 2.10 - Ilustração das técnicas de imobilização enzimática	36
Figura 2.11 - Ligação covalente da enzima (com agrupamento amina) na superfície do eletrodo. (A) Complexação com cloreto cianúrico, (B) ligação covalente por silanização, (C) complexação com carbodiimina e (D) glutaraldeído	40
Figura 2.12 - Acoplamento químico de uma molécula de glutaraldeído a duas enzimas	41

Figura 2.13 - Fotografias de Leonor Michaelis e Maud Menten	42
Figura 2.14 - Efeito da concentração de substrato na cinética enzimática	43
Figura 2.15 - Linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk	46
Figura 2.16 - Ilustração da reação catalisada pela enzima glicose oxidase	47
Figura 2.17 - Ilustração da estrutura da enzima glicose oxidase na forma de fitas.	48
Figura 2.18 - Ilustração da reação catalisada pela enzima colesterol oxidase	49
Figura 2.19 - Ilustração da estrutura da enzima colesterol oxidase na forma de fitas	51
Figura 2.20 - Ilustração da estrutura da enzima urease na forma de fitas	52
Figura 3.1 - Ilustração estrutural de um dendrímero GnPZn, n=4 (quarta geração)	59
Figura 3.2 – (a) Estruturas poliméricas clássicas. (b) Estruturas dendríticas	60
Figura 3.3 - Esquemática do crescimento em gerações do dendrímero PAMAM	61
Figura 3.4 – Primeira tentativa de síntese de um dendrímero pela rota divergente	62
Figura 3.5 – Representação esquemática do crescimento dendrítico pela rota divergente	63
Figura 3.6 – Número de publicações na área de dendrímeros nos últimos dez anos	64
Figura 3.7 - Representação esquemática de um dendrímero segundo o método divergente	67
Figura 3.8 - Representação esquemática da síntese de um dendrímero pelo método convergente	67
Figura 3.9 - Estrutura do políglicerol dendrítico de geração 4 (PGLD G4)	68
Figura 3.10 Estrutura do dendrímero de quitosana (CHD)	69
Figura 3.11 Representação das arquiteturas do dendrímero PPID	70
Figura 4.1 – Mecanismo de funcionamento das enzimas	73
Figura 4.2 - Estudo comparativo entre os valores de condutividade elétrica, $\sigma$ (S/ cm), de materiais poliméricos dopados com os de materiais convencionais	77
Figura 4.3 – Fórmula geral da polianilina (PANI)	78
Figura 4.4 – Representação da formação da banda de condução polarônica em polianilina	79
Figura 4.5 – Representação esquemática da Energia de Fermi para um sistema metal-semicondutor	81
Figura 4.6 – Representação física de um buffer	83
Figura 5.1 - Delineamento da estrutura dos constituintes de um neurônio biológico	90
Figura 5.2 – Ilustração esquemática do neurônio projetado por McCulloch e Pitts	92
Figura 5.3 - Rede de perceptrons proposta por Rosenblatt	93
Figura 5.4 - Ilustração representativa das redes ADALINE e MADALINE	94
Figura 5.5 - Estrutura do método Backpropagation; (a) camada de saída; (b) camada escondida; (c) camada de entrada	95
Figura 5.6 - Sinais funcionais e de erro de uma rede neural	96
Figura 5.6 – Representação de uma rede neural com três camadas	97
Figura 5.7 – Representação da arquitetura de uma Rede Neural Artificial	99
Figura 7.1 Esquema das arquiteturas dendríticas; CHD, PGLD e PPID, respectivamente	107
Figura 7.2 Ilustração do processo de imobilização das enzimas GOx, CHD e urease nos dendrímeros	108

Figura 7.3 Ilustração do biossensor preparado neste trabalho através da técnica de imobilização física dos bioconjugados nos nanotubos de polianilina	110
Figura 7.4 Unidade fonte medidora Keithley modelo 237 utilizado na caracterização do dispositivo biossensor	111
Figura 7.5 Ilustração da configuração da rede neural artificial utilizada neste trabalho	113
Figura 8.1 Vista lateral e frontal da configuração atômica de uma seção de um nanotubo de carbono. A estrutura cristalina deste tubo particular é denotada como (7, 7)	115
Figura 8.2 Micrografia MEV de PANINT's contendo os dendrímeros bioconjugados depositados eletroquimicamente em eletrodos de Al. Ampliações: 5000x (A) e 15.000 x (B)	118
Figura 8.3 Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase	121
Figura 8.4 A relação entre a corrente resposta e o potencial dos biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em NaPBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de Glicose: 20 mM	122
Figura 8.5 Curva de corrente-tempo para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C), a 300 mV, pH 7,4 e 37 °C, em solução de glicose de 20 mM	123
Figura 8.6 A relação entre corrente resposta e concentração de glicose para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em 0,1 M NaPBS e pH 7,4 a 37 °C	125
Figura 8.7 Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD: $[I]^{-1} = 0,02708[S]^{-1} + 0,00474$ ( $r^2 = 0,999$ ), CHD: $[I]^{-1} = 0,04351[S]^{-1} + 0,00648$ ( $r^2 = 0,997$ ) e PPID: $[I]^{-1} = 0,09491[S]^{-1} + 0,01258$ ( $r^2 = 0,994$ )	126
Figura 8.8 Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para glicose medida para os biossensores de PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a divergência medida em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em NaPBS (0.1 M, pH 7,4) a 4 °C	129
Figura 8.9 Representação da reação de catálise da enzima colesterol oxidase	130
Figura 8.10 A relação entre a corrente resposta e o potencial dos biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em PBS pH 7.02 a 37 °C. Concentração de colesterol: 1 mmol.dm <sup>-3</sup>	131
Figura 8.11 Dependência de tempo da corrente resposta para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) a 0.8 V em PBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de colesterol: 1 mM	133
Figura 8.12 A relação entre corrente resposta para o PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) eletrodos enzimáticos e concentração de colesterol de 0,1 M PBS, pH 7.02 a 37 °C e 0,8 V	134
Figura 8.13 Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores de colesterol PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD (A): $[I]^{-1} = 0,0096 [S]^{-1} - 0,01142$ ( $r^2 = 0,941$ ), CHD (B): $[I]^{-1} = 0,0159 [S]^{-1} - 0,0171$ ( $r^2 = 0,950$ ) e PPID: $[I]^{-1} = 18,621 [S]^{-1} + 2,977$ ( $r^2 = 0,854$ )	136

Figura 8.14 Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para medida de colesterol para os biossensores de PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a divergência medida em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em 0,1 M PBS, pH 7,4 a 4 °C	137
Figura 8.15 Esquema do biossensor de uréia	138
Figura 8.16 A relação entre corrente resposta e o potencial para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em 0,1 M NaPBS, pH 7,02 e 37 °C. Concentração de uréia: 10 mM	140
Figura 8.17 Dependência do tempo da corrente resposta para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) a 0,8 V em PBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de uréia: 10 mM	141
Figura 8.18 A relação da corrente resposta dos eletrodos enzimáticos PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) e a concentração de uréia em 0,1 M PBS, pH 7,02 a 37 °C e 0,6 V	142
Figura 8.19 Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores de uréia baseados nos sistemas PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD (A): $[I]^{-1} = 0.168[S]^{-1} - 9.86 \cdot 10^{-4}$ ( $r^2=0.990$ ), CHD (B): $[I] = 0,321[S]^{-1} - 0,0011$ ( $r^2=0.994$ ) e PPID: $[I]^{-1} = 0.305 [S]^{-1} + 0.016$ ( $r^2=0.999$ )	143
Figura 8.20 Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para uréia medida para os biossensores de uréia baseados nos sistemas PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a divergência medida em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em 0,1 M PBS, pH 7,4 a 4 °C	145
Figura 8.21 Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de glicose. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos: $Y = 1,023 (\pm 0,014) [\text{Glicose}] - 0,335 (\pm 0,177)$ , $R = 0,999$	149
Figura 8.22 Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de colesterol. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos: $Y = 0,943 (\pm 0,025) [\text{Colesterol}] - 0,02452 (\pm 0,0159)$ , $R = 0,997$	150
Figura 8.23 Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de uréia. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos: $Y = 0,998 (\pm 0,008) [\text{Uréia}] - 0,500 (\pm 0,0190)$ , $R = 0,999$	151

## Lista de Tabelas

---

Tabela 1.1 Alguns eletrodos enzimáticos utilizados em determinações analíticas	7
Tabela 2.1 Velocidade de reações não catalisadas e catalisadas por enzimas	23
Tabela 2.2 Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular	25
Tabela 5.1 Quadro comparativo entre cérebro e o computador	91
Tabela 5.2 Comparativo entre computadores e neurocomputadores	91
Tabela 8.1 Os três estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina	117
Tabela 8.2 Características físico-químicas características do PPID, CHD e PGLD sintetizados neste trabalho	120
Tabela 8.3 Parâmetros cinéticos eletroquímico para a GOx imobilizada em dendrímeros bioconjugados	127
Tabela 8.4 Parâmetros cinéticos eletroquímico para a CHO imobilizada em dendrímeros bioconjugados	135
Tabela 8.5 Parâmetros cinéticos eletroquímico para a urease imobilizada em dendrímeros bioconjugados	144
Tabela 8.6 Concentrações das soluções dos hemometabólitos glicose, uréia e colesterol para treinamento da rede neural	147
Tabela 8.7 Erro obtido durante o teste da rede neural para os hemometabólitos colesterol, glicose e uréia em ensaios in vitro	148

## Lista de Abreviaturas

---

ISFET- transistores de efeito de campo íon-seletivos

MOSFET- transistor de efeito de campo metal-óxido semicondutor

ENFET- Enzyme-field effect transistor

ENFET's- Transistores de Efeito de Campo Enzimáticos

FET- transistor de efeito de campo

GOx- glicose oxidase

POx- peroxidase

NTC- Negative Temperature Coefficient

(S)- substrato

(E)- enzima

(P)- produto

IUBMB- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

(E<sub>a</sub>)- energia de ativação

(ES)- enzima-substrato

(EP)- enzima-produto

K<sub>M</sub>- constante cinética de uma reação

V<sub>max</sub>- velocidade máxima

FAD- flavina adenina dinucleótido

FADH<sub>2</sub>- Flavina adenina dinucleotídeo reduzida

COx- colesterol oxidase

PAMAM – Poli(amidoamina)

G- número de geração

PGLD- poliglicerol dendrítico

PPID- poli(propileno imina) dendrítico

CHD- quitosana dendrítico

Unifei- Universidade federal de Itajubá

ICP- polímeros intrinsecamente condutores

PANI- polianilina

CTC- complexo de transferência de carga

EB- base esmeraldina  
ES -sal de hidrocloreto de esmeraldina  
HPM- heterojunções do tipo polímero-metal  
PANI/M- polianilina-metal  
IA- Inteligência Artificial  
SIH- sistema de informação hospitalar  
RNAs- Redes Neurais Artificiais  
RNA- Rede Neural Artificial  
DARPA- Defense Advanced Research Projects Agency  
INNS- International Neural Networks Society  
ENIAC- Eletronic Numerical Interpreter and Calculator  
VLSI- Very Large Scale Integration  
MLP- Multi-Layer Perceptrons  
PANINT's- nanotubos de polianilina  
NaPBS- solução tampão fosfato de sódio salino  
NTC's- nanotubos de carbono  
SWNT- nanotubos de parede simples  
MEV- microscopia eletrônica de varredura  
GPC- cromatografia de permeação em gel  
EPROM- erasable programmable read-only memory

## Resumo

---

Hoje em dia, os dendrímeros representam um interessante e promissor material orgânico sendo usado em desenvolvimento de novos materiais para a indústria farmacêutica, tais como sistemas de liberação de drogas e, mais recentemente, como propriedades sensoras para proteínas e hemometabólitos. As propriedades intrínsecas dos dendrímeros como a monodispersividade, elevados grupos funcionais periféricos em macromoléculas e boas propriedades biocompatíveis destas nanopartículas, tem conduzido para sua difusão e usados em uma variedade de aplicações na medicina e biotecnologia. Neste trabalho foram desenvolvidos biossensores de glicose, colesterol e uréia baseados em poliglicerol bioconjugado (PGLD), poli(propileno imina) (PPID) e dendrímeros de quitosana (CHD). Os dendrímeros PGLD, PPID e CHD foram bioconjugados com as enzimas glicose oxidase (GOx), colesterol oxidase (COx) e urease para obter dendrímeros com propriedades sensoras de glicose, colesterol e uréia. Os dendrímeros bioconjugados PGLD, PPID e CHD foram atraídos em nanotubos de polianilina (PANINT's) durante polimerização eletroquímica *template* de anilina. Os PANINT's foram usados como mediadores de elétrons, devido sua alta habilidade para promover as reações de transferência de elétrons, envolvendo catálise enzimática. A resposta de corrente observada em enzimas transformadas na interface do eletrodo demonstrou que nanotubos de polianilina são eficientes mediadores para desenvolver biossensores. As respostas de corrente para as propriedades dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia bioconjugados com PGLD, PPID e CHD, e GOx, COx e urease, ocorreram às tensões de 400 mV, 700 mV e 600 mV, respectivamente. Foi obtido que a corrente resposta para os bioconjugados PGLD, PPID e CHD facilmente atinge o estado de saturação. Os resultados correspondentes à corrente de saturação é mais acentuada para o biossensor de PGLD do que para os bioconjugados CHD e PPID. A constante aparente de Michaelis–Menten ( $K^{app}_M$ ) dá indicações da cinética enzima-substrato para os bioconjugados PPID, CHD e PGLD e foi calculada a partir da equação eletroquímica de Lineweaver–Burk. O biossensor baseado em PGLD, PPID e CHD mostrou uma boa performance em concentrações de interesse clínico de glicose, colesterol e uréia. A afinidade enzimática para o substrato ( $K^{app}_M$ ), indica que a atividade catalítica enzimática decai na ordem PGLD>CHD>PPID. O resultado mostra que o PGLD aparenta ser um candidato bastante promissor para o desenvolvimento de biossensores de alta performance, em comparação com os dendrímeros CHD e PPID. Uma rede neural artificial, tipo Back-Propagation com três

camadas de neurônios, foi treinada e aplicada, predizendo a quantia dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia através da resposta de corrente dos biossensores desenvolvidos. A rede neural desenvolvida para determinação de hemometabólitos mostrou-se ser eficiente em ambas fases, de treinamento e teste, respectivamente.

## Abstract

---

Today, dendrimers represent a promising and interesting organic material being used in developing new materials for pharmaceutical industry such as drug delivery systems and more recently, intelligent materials with sensing properties to proteins and haemometabolites. The intrinsic properties of dendrimers like as monodispersity, highly functional groups at macromolecule periphery and good biocompatible properties of these nanoparticles has led to their widespread use in a variety of applications in medicine and biotechnology. In this work glucose, cholesterol and urea biosensors based on bioconjugated polyglycerol (PGLD), poly(propylene imine) (PPID) and chitosan dendrimers (CHD) were developed. The dendrimers PGLD, PPID and CHD were bioconjugated with the enzymes glucose oxidase (GOx), cholesterol oxidase (COx) and urease to obtain dendrimers with glucose, cholesterol and urea sensing properties. The bioconjugated PGLD, PPID and CHD dendrimers were entrapped in polyaniline nanotubes (PANINT's) during template electrochemical polymerization of aniline. PANINT's were used as electron mediator due to their high ability to promote electron-transfer reactions involving enzyme catalysis. The current response observed in enzymes transformations at electrodes interfaces demonstrated that polyaniline nanotubes are an efficient mediator for biosensors design. The response current properties to haemometabolites glucose, cholesterol and urea of PGLD, PPID and CHD bioconjugated with GOx, COx and urease occurs at 400 mV, 700 mV and 600 mV, respectively. It was found that the response current of the PGLD, PPID and CHD bioconjugates easily reaches to steady state. The results about the current saturation peak for the PGLD biosensors are meaningfully higher than CHD and PPID bioconjugates. The apparent Michaelis–Menten constant ( $K_M^{app}$ ), which gives an indication of the enzyme–substrate kinetics for the PPID, CHD and PGLD bioconjugates were calculated from the electrochemical Lineweaver–Burk equation. The based PGLD, PPID and CHD biosensors showed a good performance in glucose, cholesterol and urea concentrations of clinical interest. The enzyme affinity for the substrate ( $K_M^{app}$ ) indicate that the enzyme catalytic activity declines in the crescent order PGLD>CHD>PPID. The results show that PGLD appears to be a very promising candidate for development of high-performance biosensors relatively to the CHD and PPID dendrimers. An artificial neural network Back-Propagation type with three layers of neurons was trained, and applied, in predicting the amount of haemometabolites glucose, cholesterol and urea

in relation to the current response of developed biosensors. The neural network developed for determining the haemometabolites was shown to be efficient in both, training phase and the test, respectively.

## Introdução

---

O aumento da longevidade humana visto ao longo do último século, fez com que um grande número de indivíduos viesse a atingir uma idade crítica para o desenvolvimento de inúmeras doenças. Conseqüentemente, como resultado da maior longevidade humana há o aparecimento de morbidades relacionadas ao envelhecimento, como: hipercolesterolemia, hiperglicemia e elevação nos níveis de uréia no sangue.

A hipercolesterolemia é um importante fator de risco cardiovascular porque o colesterol exerce efeito pró-oxidante que leva ao aumento na produção de radicais livres, os quais têm importante papel na gênese da aterosclerose. A hiperglicemia, caracterizada pelo excesso de açúcar no sangue, é uma disfunção causada pela falta de insulina, pela diminuição na produção ou ainda pela incapacidade de exercer suas funções. Já o excesso de uréia no sangue, é um indicativo forte de que o indivíduo possui doenças renais e hepáticas.

Tendo em vista a problemática acima mencionada, verifica-se a importância do controle dos níveis de glicose, colesterol e uréia no fluido sanguíneo, uma vez que estes estão sujeitos a flutuações contínuas. As conseqüências do descontrole dos níveis de glicose, colesterol e uréia são diabetes melito, infarto do miocárdio, amputação de membros inferiores, hemodiálise, perda da visão dentre outras. Surge então a necessidade de se criar um dispositivo que monitore diariamente os níveis destes hemometabólitos simultaneamente.

A aplicação ideal de um biossensor multienzimático seria a produção de um dispositivo implantável para monitoramento contínuo dos metabólitos. Este dispositivo estaria conectado a um microprocessador de controle de um sistema de liberação de fármacos pela pele, que controlaria os níveis de glicose, colesterol e uréia.

A evolução dos mecanismos utilizados na monitoração de hemometabólitos, seu funcionamento e suas aplicações são apresentados no capítulo 1. Como pode ser observado neste capítulo, os biossensores amperométricos são ainda os mais pesquisados em função de suas características únicas, tais como transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo trabalhando a baixos potenciais.

Uma vez que as enzimas são os biocatalizadores responsáveis pela geração do sinal no transdutor, o capítulo 2 trata da natureza química das enzimas, suas classificações, grupos aos

quais pertencem e aponta os mecanismos das reações catalisadas por estes compostos, vantagens e desvantagens. É apresentando ainda neste capítulo os modelos para os mecanismos de catálise enzimática bem como os fatores que influenciam a atividade do biocatalizador. As técnicas de imobilização físicas e químicas das enzimas também são tratadas neste capítulo. Um outro fator que deve ser levado em consideração é a cinética da enzima; neste intuito a equação eletroquímica de Michaelis-Menten foi estudada e sua linearização foi feita a partir do gráfico de Lineweaver-Burk. Para finalizar o capítulo, uma abordagem do uso das enzimas glicose oxidase, colesterol oxidase e urease estudadas nesta dissertação no emprego de biossensores e seus mecanismos foram relatados.

As enzimas para serem imobilizadas, necessitam de um suporte ideal, com este intuito, estruturas altamente ramificadas, com peso molecular uniforme e com elevada concentração de grupos funcionais em suas periferias foram estudadas no capítulo 3. Macromoléculas dendríticas de poliglicerol (PGLD), quitosana (CHD) e poli(propileno imina) foram sintetizados, purificados e caracterizados anteriormente pelo grupo de biomateriais da Unifei. O capítulo 3 aborda essencialmente algumas características destas macromoléculas.

Uma das principais preocupações na construção de biossensores amperométricos é a velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo o qual transmite o sinal para o sistema que irá converter o sinal da reação biológica em um sinal elétrico. O capítulo 4 trata dos mediadores de elétrons mais utilizados, em especial a polianilina (PANI) que é um polímero condutor. Os polímeros intrinsecamente condutores podem combinar as propriedades mecânicas e a processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, ótico e/ou mecânico semelhantes ao de metais e semicondutores inorgânicos.

Houve a necessidade de um sistema que pudesse tratar estatisticamente os dados das reações das concentrações dos substratos em relação aos picos de corrente gerados pela reação enzima/ substrato. No capítulo 5, um sistema inteligente denominado Rede Neural, foi utilizado com o intuito de distinguir os valores das concentrações dos hemometabólitos: uréia, colesterol e glicose. É tratado neste capítulo as aplicações das redes neurais, seus mecanismos de funcionamento e sua evolução no decorrer do tempo. Um paralelo entre a rede neural utilizada e a rede neural natural (do cérebro humano), foi traçado; afinal a rede neural foi projetada a partir do

modelo do cérebro humano. Foi utilizado o algoritmo backpropagation como método de aprendizagem.

O capítulo 6 define os principais objetivos desta dissertação.

No capítulo 7 é descrita a metodologia experimental adotada para este trabalho e no capítulo 8 os resultados obtidos com relação à resposta do biossensor são discutidos.

No capítulo 9 são apresentadas as principais conclusões obtidas neste trabalho.

# Capítulo 1- Biossensores para a monitoração de hemometabólitos

---

## 1.1- Introdução

A enzimologia clínica surge como um meio de desenvolver e utilizar exames clínicos que ofereçam o máximo de informação com um mínimo de invasibilidade, auxiliando no diagnóstico de doenças, no prognóstico de quadros clínicos diversos e na avaliação do estado nutricional dos pacientes.

A história da enzimologia é relativamente recente, tendo dado seus primeiros passos a partir dos trabalhos publicados por Vitor Henri em 1901, e por Leonor Michaelis entre 1910 e 1914. Estas pesquisas ofereceram subsídio teórico para que em 1927, King e Armstrong utilizassem pela primeira vez a enzima fosfatase alcalina para o diagnóstico clínico. Em meados da década de 1940, as enzimas séricas já eram utilizadas como meio auxiliar de diagnóstico.<sup>1</sup>

O método mais utilizado nos laboratórios de análises clínicas é o método enzimático, por ser de baixo custo e simples. Assim, o exame rotineiro de hemometabólitos é realizado por este método, identificando a concentração de glicose, colesterol, uréia, dentre outros metabólitos.

Os hemometabólitos de interesse neste trabalho são a glicose, o colesterol e a uréia. Por serem de suma importância nos diagnósticos de doenças e necessitarem de monitoramento constante.

As análises clínicas são de custo elevado uma vez que dependem de instrumentos de grande porte caros, funcionários devidamente qualificados e local apropriado dentre outros custos. Além disso, trazem ao paciente certo incômodo pelo fato da amostragem do fluido biológico para realização das análises clínicas, podendo assim ser considerado um método invasivo.

Os biossensores surgem então como alternativa para substituírem os métodos colorimétricos convencionais do laboratório clínico. A análise pode ser feita pelo próprio paciente a qualquer hora do dia e local, necessitando apenas de uma única gota de sangue.

Além de ser uma ferramenta analítica pouco invasiva, os dispositivos biossensores geram no sistema de saúde uma economia considerável em relação aos exames convencionais. Outra vantagem do uso de biossensores para o monitoramento de hemometabólitos se deve ao fato de

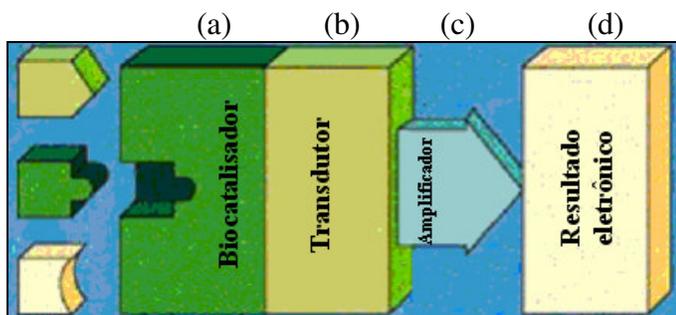
que há pacientes que necessitam de monitoramento diário dos níveis desses hemometabólitos, como por exemplo, os pacientes diabéticos.

## 1.2- Histórico do desenvolvimento dos biossensores e o Estado da arte

Biossensores são dispositivos eletrônicos capazes de converter uma reação biológica/bioquímica em um sinal apropriado. Este sinal pode ser potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, piezelétrico ou entalpimétrico.<sup>2-3</sup> O sinal produzido é proporcional à concentração de analito, também conhecido como substrato. Com isso, ocorre a união da especificidade e sensibilidade dos sistemas biológicos com o poder da engenharia, oferecendo uma ferramenta muito poderosa para ser utilizada em análises clínicas.

As espécies imobilizadas nos biossensores agem como biocatalizadores necessários para detecção dos respectivos analitos. Estas espécies imobilizados nas superfícies dos transdutores podem ser de vários tipos, tais como, tecidos celulares, microorganismos, organelas, membranas, enzimas, anticorpos, dentre outros.<sup>4</sup>

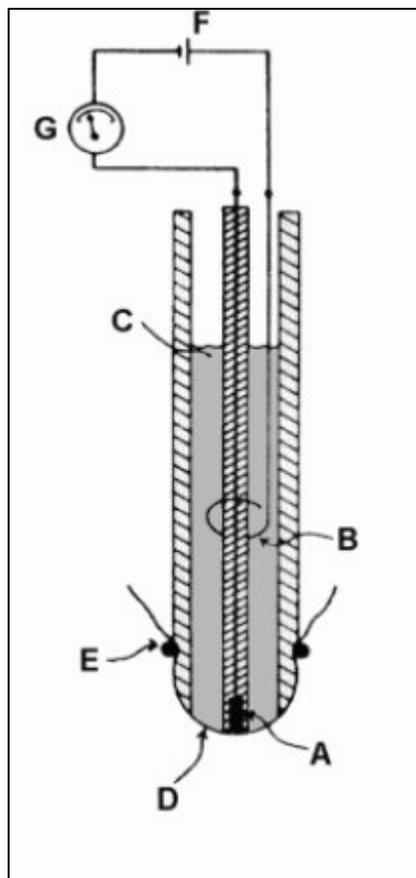
A Figura 1.1 mostra os componentes básicos de uma biossensor. Em (a), tem-se o biocatalizador, onde ocorre a reação bioquímica responsável pela geração do sinal, em (b) tem-se o transdutor, em (c) o amplificador e em (d) a apresentação do resultado.



**Figura 1.1-** Representação de um biossensor: biocatalizador.<sup>5</sup>

Em 1962, Clark e Lions desenvolveram o primeiro biossensor, o qual ficou conhecido como eletrodo enzimático<sup>6</sup> (ver Figura 1.2). A partir deste marco, diversos tipos de biossensores foram desenvolvidos para os mais diversos tipos de análises clínicas, obtendo maior destaque as análises biomédicas. O monitoramento de hemometabólitos no sangue humano (como glicose, colesterol e uréia), a detecção de atividades bacterianas (principalmente em alimentos), a

detecção de tipos específicos de proteínas bem como a determinação da concentração de certos íons em soluções biológicas, tem despertado a atenção de vários pesquisadores.<sup>7-8</sup>



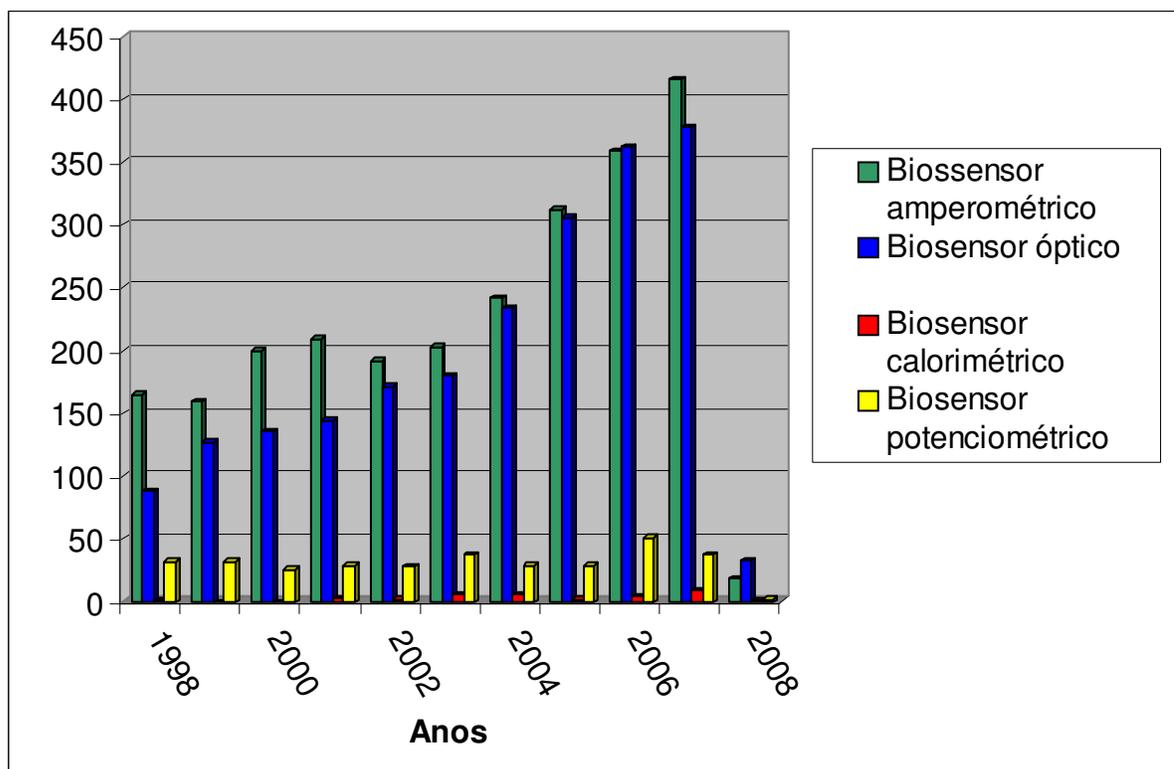
**Figura 1.2**– Eletrodo de oxigênio de Clark. A) Eletrodo de trabalho Pt, B) eletrodo de referência Ag/AgCl, C) eletrólito semi-saturado de KCl, D) membrana de Teflon<sup>®</sup>, E) anel de borracha para fixação, F) fonte de tensão para polarização e G) instrumento para medição da corrente de saída.<sup>9</sup>

Os biossensores ou eletrodos enzimáticos são usados em uma série de determinações analíticas (Tabela 1.1), das quais, a detecção da taxa de glicose no sangue (analito de informação vital para o controle do diabetes) é destaque.<sup>10</sup>

**Tabela 1.1-** Alguns eletrodos enzimáticos utilizados em determinações analíticas.<sup>11</sup>

<b>Analito</b>	<b>Enzima</b>	<b>Espécie monitorada</b>
<i>Glicose</i>	<i>Glicose oxidase</i>	<i>Pt(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/O<sub>2</sub></i>
<i>Uréia</i>	<i>Urease</i>	<i>NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub></i>
<i>Ácido úrico</i>	<i>Uricase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>Álcool</i>	<i>Álcool oxidase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>L-tirosina</i>	<i>Tirosina descarboxilase</i>	<i>CO<sub>2</sub></i>
<i>Oxalato</i>	<i>Oxalato oxidase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>Salicilato</i>	<i>Salicilato hidroxilase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>Creatinina</i>	<i>Creatininase</i>	<i>NH<sub>3</sub></i>
<i>Ascorbato</i>	<i>Ascorbato oxidase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>L-lisina</i>	<i>lisina descarboxilase</i>	<i>CO<sub>2</sub></i>
<i>Acúcar</i>	<i>Invertase ou glicose oxidase</i>	<i>Pt(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/O<sub>2</sub></i>
<i>Lactato</i>	<i>Lactato dehidrogenase</i>	<i>O<sub>2</sub></i>
<i>Penicilina</i>	<i>Penicilinase</i>	<i>Ph</i>

Os biossensores geralmente são classificados de acordo com o sinal que é gerado no transdutor. Os biossensores amperométricos são os tipos mais usados e pesquisados, como pode ser verificado na Figura 1.3. Porém, existem outros tipos de biossensores baseados em outros tipos de sinais, dos quais, os mais usados serão brevemente abordados nos tópicos seguintes.



**Figura 1.3**– Gráfico comparativo para os tipos de biossensores mais estudados. Fonte: Scielo.

### 1.3- Biossensores eletroquímicos

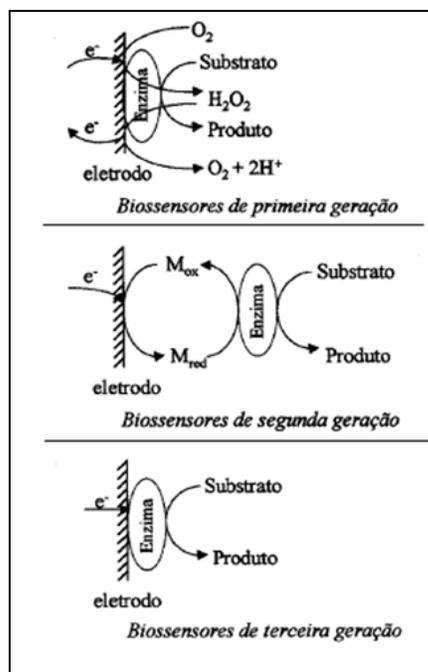
Os biossensores eletroquímicos são dispositivos capazes de fornecer sinais analíticos do meio operacional através do uso de componentes biológicos como parte do sensor. O biocomponente é responsável pela alta seletividade molecular e pela formação de produtos detectáveis, se o analito em si não for eletroativo.<sup>12</sup> A detecção eletroquímica pode ser amperométrica (medindo-se uma diferença de cargas), potenciométrica (medindo-se uma diferença de potencial), condutométrica (medindo-se mudanças na condutância entre eletrodos), impedanciométrica (medindo-se mudanças de impedância no eletrodo).<sup>13-14</sup> No entanto, os biossensores amperométricos são os mais pesquisados, em função de seu relativo baixo custo de construção, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis.

### 1.3.1- Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos fornecem a possibilidade de se captar um sinal elétrico que seja proporcional à concentração de analito. A linearidade da resposta do biossensor faz com que este seja recalibrado. Se o oxigênio é suprido por uma membrana de espessura  $d$  e área  $A$ , a corrente  $i$  pode ser aproximada pela Equação 1.1; onde  $D$  é o coeficiente de difusão,  $\alpha$  e  $p$  a solubilidade e a pressão parcial de  $O_2$  na membrana, respectivamente, e  $F \approx 96500$  C.

$$I = 4FAD\alpha\frac{p}{d} \quad (1.1)$$

Através da aplicação de um nível de tensão contínua apropriada, a concentração de substrato pode ser medida pela transferência de carga entre a superfície do eletrodo e o substrato. Os biossensores amperométricos, se dividem em três grupos, segundo o processo envolvido na transferência de carga; primeira, segunda e terceira geração; como ilustrado na Figura 1.4.



**Figura 1.4-** Representação esquemática para biossensores amperométricos segundo o processo de transferência de cargas.<sup>15</sup>

Em suma, os biossensores amperométricos baseiam-se em reações de transferência de cargas (oxi-redução) entre o material biocatalítico e o analito com um eletrodo de referência polarizado a uma tensão pré-definida.<sup>14</sup>

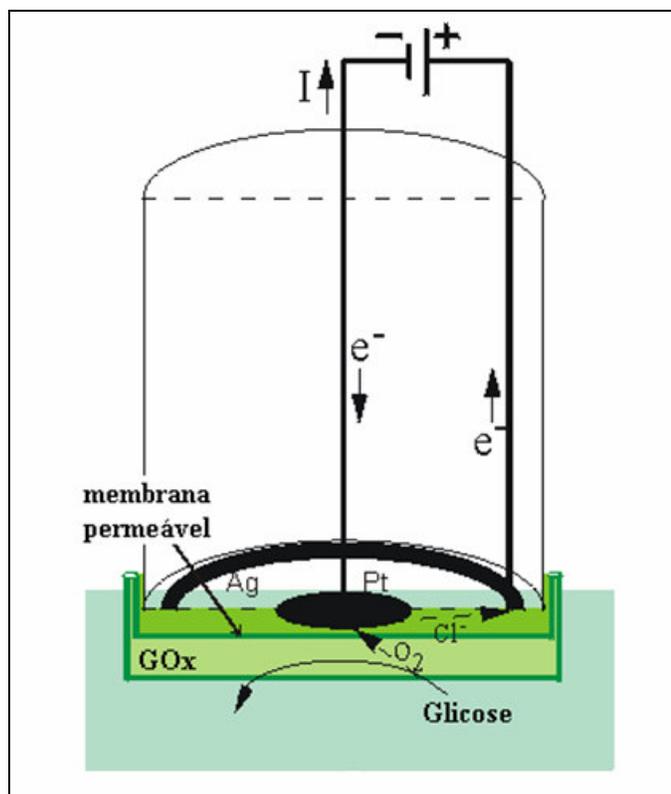
O primeiro biossensor amperométrico foi desenvolvido por Updike e Hicks em 1967 para a medida de glicose, no qual se fazia uso do eletrodo enzimático desenvolvido por Clark e Lions.<sup>16</sup>

A maior parte dos biossensores utilizados para a análise de hemometabólitos se baseiam no uso de mediadores, com limites de leitura de cerca de 10 a 600 mg.dL<sup>-1</sup>. Esses biossensores são vendidos em lotes (10, 25 ou 50 biossensores, para o caso da Accu-Chec) separadamente do dispositivo eletrônico para análise. Os preços no mercado para a Accu-Chec (o mais comum), variam, aproximadamente R\$2,50 cada fita, dependendo da quantidade de fitas no lote e do local de compra. A Figura 1.5 ilustra um modelo comercial de um biossensor amperométrico, utilizado na monitoração de hemometabólitos tais como; colesterol, uréia e glicose.



**Figura 1.5-** Biossensores amperométricos comerciais utilizados em análises clínicas.<sup>5</sup>

Os biossensores amperométricos de primeira geração baseiam-se na diminuição da concentração de oxigênio, no qual os dois eletrodos são separados da amostra por uma membrana de gás permeável. Neste caso, o oxigênio difundido através da membrana é reduzido num eletrodo catodicamente polarizado na presença de um eletrodo de referência. Os biossensores amperométricos, podem ser baseados também na detecção da concentração de peróxido de hidrogênio que é oxidado em um eletrodo polarizado anodicamente, gerando o sinal elétrico.<sup>16</sup> A Figura 1.6, ilustra um biossensor amperométrico de primeira geração.



**Figura 1.6-** Representação esquemática de um biossensor amperométrico de primeira geração.<sup>16</sup>

Os biossensores amperométricos de primeira geração trabalham a elevados potenciais e se baseiam na diminuição da concentração de oxigênio, onde dois eletrodos são separados da amostra por uma membrana permeável a gás. Deste modo, o oxigênio difundido através da membrana é reduzido em um eletrodo catodicamente polarizado na presença de um eletrodo de referência.

Um biossensor de segunda geração se baseia no uso de um mediador para transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo.<sup>17</sup> Esses mediadores podem ser materiais orgânicos, inorgânicos ou complexos de metais de transição e ainda polímeros condutores.

Finalmente, os biossensores de terceira geração se caracterizam pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo trabalhando a baixos potenciais.<sup>18</sup>

As principais aplicações dos biossensores amperométricos são na indústria, na medicina e no monitoramento do meio ambiente. Eles dão uma análise mais precisa do analito a ser medido,

pois a relação entre a quantidade de substrato e o sinal gerado varia linearmente de acordo com a equação 1.2.<sup>19</sup>

$$I = nFAv_a \quad (1.2)$$

sendo I a corrente criada na reação, n o número de elétrons transferidos, A área do eletrodo, F a constante de Faraday e  $v_a$  a velocidade com que a reação ocorre, sendo esta proporcional à concentração do substrato.

### 1.3.2- Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos são dispositivos íons-seletivos os quais são constituídos de uma membrana contendo enzimas imobilizadas onde a reação catalisada enzimaticamente gera ou absorve íons de hidrogênio, alterando o pH do meio. Uma diferença de potencial é criada entre um eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo.<sup>20</sup>

A resposta de um biossensor potenciométrico é dada pela equação de Nerst.<sup>21</sup>

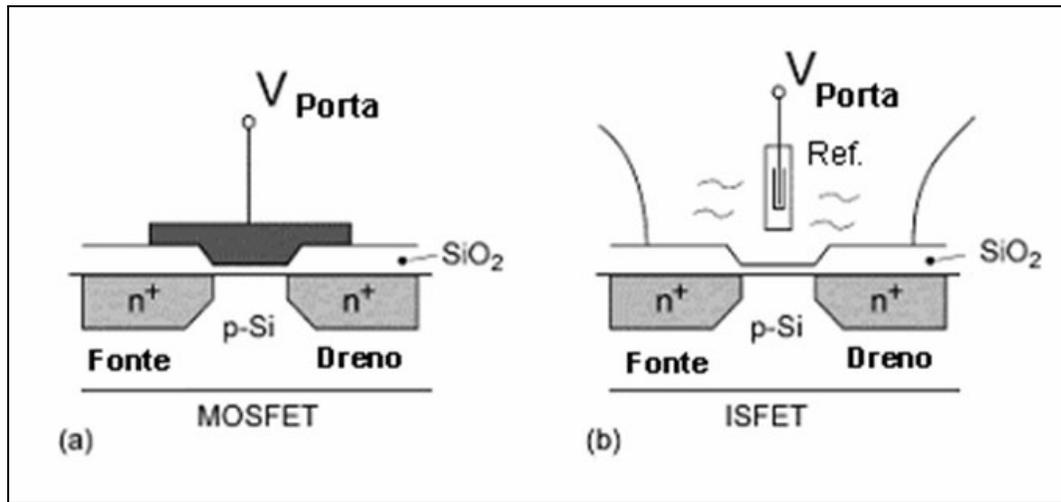
$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln([i]) \quad (1.3)$$

sendo E o potencial medido,  $E_0$  é o potencial característico do meio, R a constante universal dos gases, T a temperatura absoluta, z o número de cargas trocadas na reação, F a constante de Faraday e [i] a concentração de íons livres na solução.

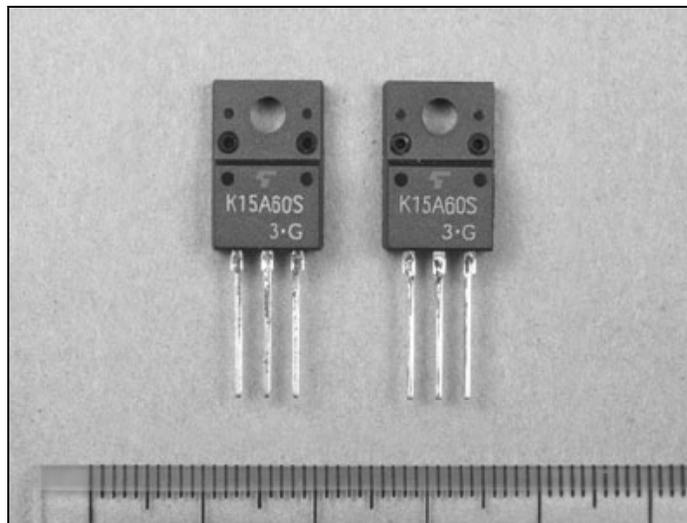
Um desenvolvimento recente de eletrodos íon-seletivos, é a produção de transistores de efeito de campo íon-seletivos (ISFETs).<sup>22</sup> Um ISFET é um MOSFET (Transistor de efeito de campo metal-óxido semiconductor) modificado. A diferença, é que o eletrodo porta do MOSFET é substituído por um eletrodo de referência contido em uma solução e em contato com o óxido da região da porta, agora não mais existente. O contato entre o óxido e o eletrodo de referência é feito geralmente através da solução. Uma alteração do potencial da solução controla o fluxo de

corrente entre a fonte e o dreno do ISFET. A Figura 1.4 ilustra a estrutura de um ISFET em comparação a um MOSFET.

(A)



(B)

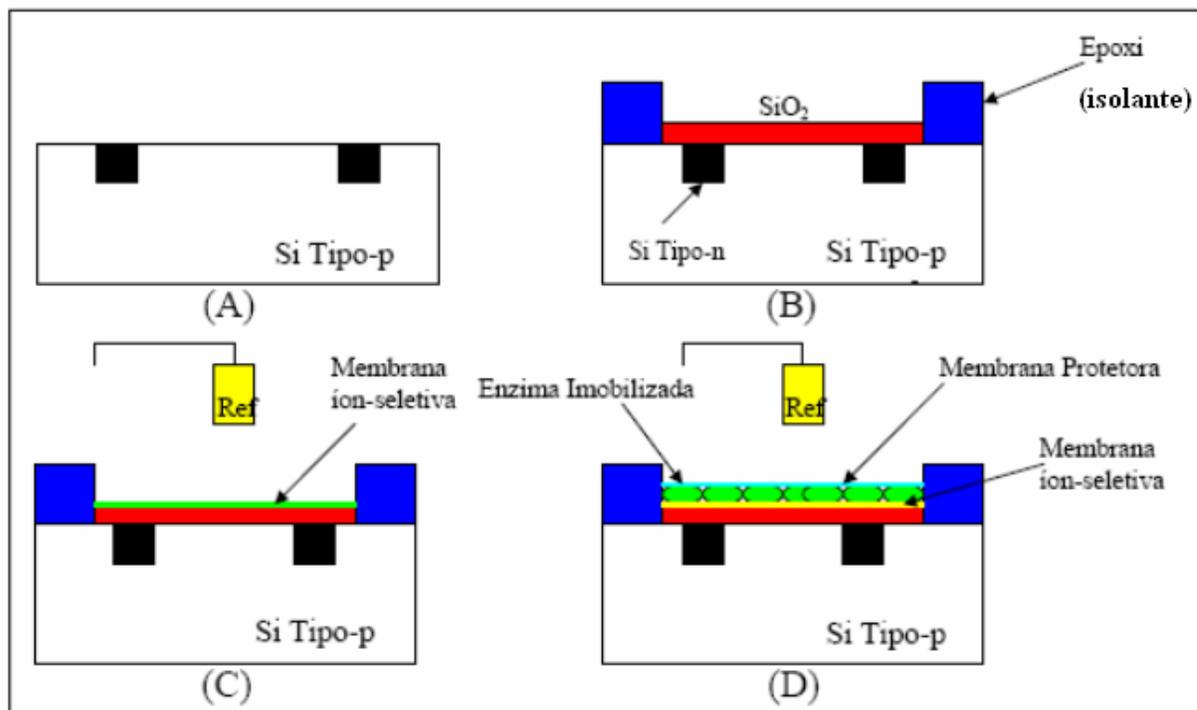


**Figura 1.7-** (A) Estrutura de um MOSFET (a) em comparação com um ISFET (b). (B) Estrutura física de um MOSFET.<sup>9-23</sup>

Através da imobilização de enzimas no eletrodo porta, estes dispositivos eletrônicos podem ser aplicados em biossensores. São os chamados ENFET's (Transistores de Efeito de

Campo Enzimáticos), ilustrado na Figura 1.5. Neste caso é a reação catalizada pela enzima que altera o potencial do meio, sendo esta alteração proporcional à concentração do analito.<sup>24</sup>

A vantagem desses dispositivos é a possibilidade do uso da microeletrônica na sua produção, possibilitando a confecção em larga escala. Em contra partida, a principal desvantagem é a dificuldade de isolamento do FET do meio reacional, o que pode influenciar o desempenho do biossensor.<sup>22</sup>



**Figura 1.8-** Montagem de um ENFET. (A) Substrato de Silício, (B) Dopagem e formação de óxido, (C) Deposição da membrana íon-seletiva e (D) imobilização da enzima e membrana protetora.<sup>9</sup>

### 1.3.3- Biossensores ópticos

Biossensores ópticos baseiam-se na determinação das mudanças de absorção entre os reagentes e produtos da reação, ou na medida da saída de luz por um processo luminescente.<sup>25</sup> A forma mais comum envolve o uso de tiras colorimétricas, as quais, contém enzimas oxi-redutoras e um cromógeno. O produto gerado na reação entre a enzima e o analito (na maioria das vezes  $H_2O_2$ ), oxida o cromogênio. A absorvância do composto formado é proporcional à concentração do analito a ser determinada.

O uso mais comum de biossensores ópticos é o controle do diabetes pela determinação do nível de glicose no sangue usando-se as enzimas glicose oxidase (GOx) e peroxidase (POx),

juntamente com o composto que não absorve luz na região visível. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultante da oxidação da glicose pela GOx, na presença da POx, oxida o composto sem absorvância no visível em um composto colorido. A avaliação das tiras tingidas é feita pelo uso de medidores portáteis de reflectância ou pela comparação com uma cartilha colorida previamente elaborada.

A Figura 1.5 ilustra um biossensor óptico comercial de última geração. O paciente pode acompanhar a concentração dos hemometabólitos de interesse analisando a cor da lente e comparando esta resposta com uma tabela de cores do estojo, para verificar a qualquer hora do dia a concentração dos hemometabólitos.



**Figura 1.9-** Ilustração de um biossensor óptico.<sup>26</sup>

#### 1.3.4- Biossensores piezoelétricos

Esses tipos de biossensores contêm cristais piezoelétricos em seus transdutores com espécies imobilizadas. A Figura 1.10 ilustra os componentes de um biossensor piezoelétrico.

Todos os cristais piezoelétrico vibram na presença de um campo elétrico. A frequência ( $f$ ) dessa vibração depende da espessura e do corte do cristal, sendo que cada cristal possui um frequência de vibração característica. Esta frequência característica muda quando o cristal absorve ou desadsorve moléculas em sua superfície, de acordo com a Equação 1.4.<sup>27</sup>

$$\Delta f = \frac{k_p \cdot f^2 \Delta m}{A} \quad (1.4)$$

sendo  $\Delta f$  a variação da frequência característica,  $\Delta m$  é a variação da massa do material adsorvido,  $k$  é uma constante dependente cristal e  $A$  é a área de superfície adsorvida. Como a variação de frequência é proporcional à variação de massa do material adsorvido, tal variação pode ser determinada por circuitos eletrônicos.<sup>27</sup>

Um bom exemplo de um biossensor piezoelétrico é um transdutor para a detecção de formaldeído gasoso.<sup>28</sup> Este é basicamente formado por dehidrogenase imobilizada em um cristal de quartzo. Este sistema é sensível ao formaldeído gasoso.

O principal inconveniente destes dispositivos é a interferência da umidade atmosférica na medida e a dificuldade em usá-los para a determinação de analitos em solução.<sup>29</sup> Entretanto, biossensores piezoelétricos são relativamente baratos, pequenos e capazes de dar uma resposta rápida.<sup>30</sup> A exemplo, a Figura 1.10 ilustra uma microbalança de quartzo que realiza medidas de massa e viscosidade em processos que ocorrem em superfícies, próximos a superfícies ou no interior de filmes finos. Realiza também, medidas de frequência e resistência.



**Figura 1.10-**Microbalança de cristal de quartzo (A); Transdutor de precisão de massa (B).<sup>31-32</sup>

### 1.3.5 - Biossensores térmicos ou calorimétricos

Muitas reações que são catalizadas enzimaticamente são exotérmicas, ou seja, geram calor. Dessa forma, os biossensores calorimétricos baseiam-se na medida da variação de temperatura entre a entrada e a saída de uma pequena coluna contendo um biocatalizador

(enzima) imobilizado à temperatura constante. Tal medida é efetuada através de termistores, que são semicondutores sensíveis à temperatura.<sup>33</sup>

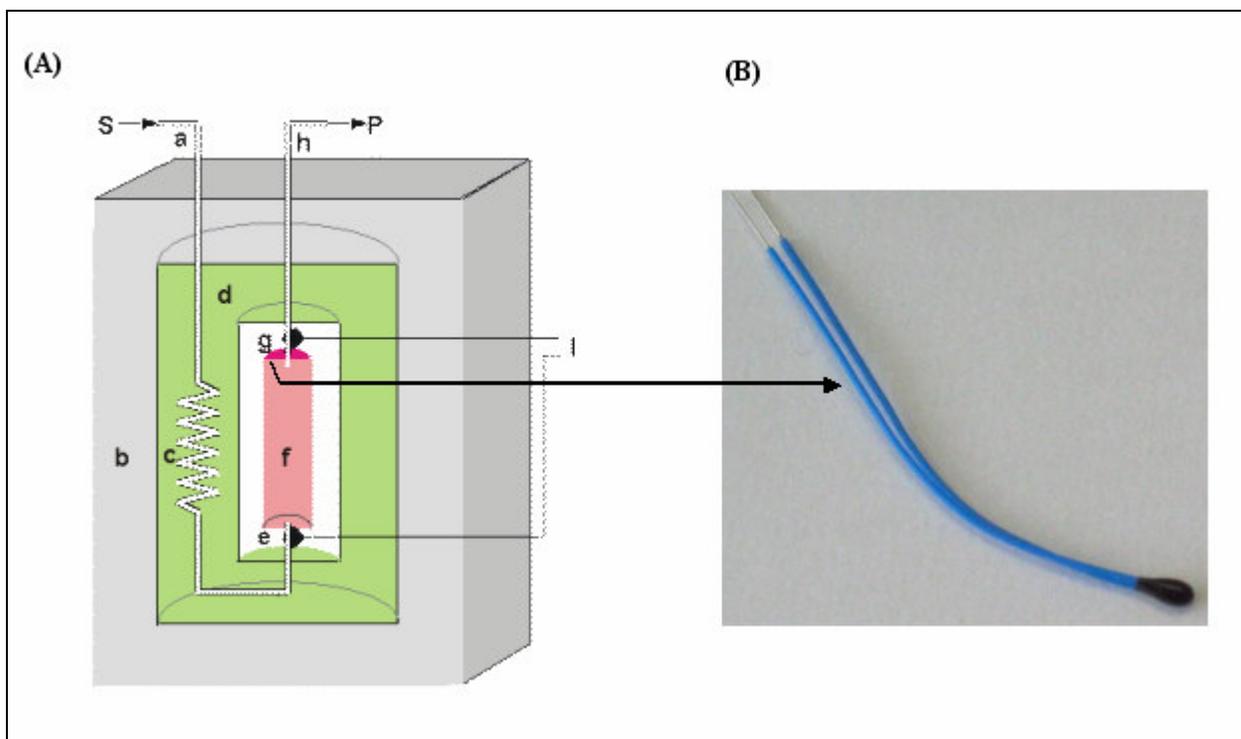
Os termistores, usados para detectar a mudança de temperatura funcionam variando sua resistência elétrica com a temperatura, obedecendo à relação:

$$\frac{R_1}{R_2} = e^{B\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)} \quad (1.5)$$

onde,  $R_1$  e  $R_2$  são as resistências dos termistores nas temperaturas absolutas  $T_1$  e  $T_2$ , e  $B$  é uma temperatura constante característica do termistor.

A principal vantagem de um biossensor calorimétrico é sua aplicabilidade geral e a possibilidade de uso em soluções densas e fortemente coloridas. Porém existe a dificuldade de se manter a temperatura do biocatalizador constante, fato que pode levar à desnaturação da enzima, prejudicando assim, o funcionamento do biossensor.

A Figura 1.11 ilustra o funcionamento de um biossensor calorimétrico. O fluxo de amostra (a) atravessa a caixa separadora externa (b) para o controlador de calor (c) dentro de um bloco de alumínio (d), de onde flui para o termistor de referência (e) e no bioreator de cama acumulado (f) 1 ml de volume, contendo o biocatalizador onde a reação acontece. A mudança de temperatura é determinada pelo termistor (g) e o produto final (h).



**Figura 1.11-** (A) Diagrama esquemático de um biossensor calorimétrico; (B) Ilustração de um termistor do tipo NTC.<sup>34-35</sup>

O NTC (Negative Temperature Coefficient) é um termistor ou componente eletrônico semicondutor sensível a temperatura, utilizado para controle, medição ou polarização de circuitos eletrônicos. Possui um coeficiente de variação de resistência que varia negativamente conforme a temperatura aumenta, ou seja, a sua resistência elétrica diminui com o aumento da temperatura.<sup>35</sup>

### 1.7- Considerações parciais

Biossensores são dispositivos compactos, capazes de fornecer uma resposta quantitativa para o monitoramento de diversos analitos. Eles são classificados de acordo com o sinal que é gerado (amperométrico, óptico, potencimétrico etc) na reação entre o analito e o material biológico (na maioria das vezes enzimas) imobilizado na superfície de um elemento transdutor.

A simplicidade relativa das análises promovidas pelos biossensores faz deste dispositivo um excelente candidato para monitoração diária dos níveis dos hemometabólitos.

Os biossensores enzimáticos são alternativas interessantes para o monitoramento dos hemometabólitos, pelo baixo custo e elevada seletividade.

Os biossensores enzimáticos vêm sendo empregados em um grande número de determinações analíticas, principalmente em análises clínicas. A monitoração da taxa de glicose dentre outras análises como concentração de uréia, ácido úrico, colesterol, oxalato, creatinina, lisina, lactato, e cisteína, estão entre os principais metabólitos, cujas concentrações plasmáticas, teciduais ou urinárias são relevantes para o diagnóstico clínico.<sup>36-37</sup>

O elemento principal de um biossensor é o biocatalizador utilizado no reconhecimento do analito a ser quantificado. Neste sentido, uma análise mais detalhada a respeito do mecanismo de atuação dos sistemas enzimáticos é apresentada no capítulo seguinte.

### 1.8- Referências

- [1] BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz: Fundamentos de Química Clínica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998, 836 p.
- [2] THÉVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. **Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification**. Disponível em <[www.iupac.org/reports/1999/7112thevenot/](http://www.iupac.org/reports/1999/7112thevenot/)> Acessado em 05 jan. 2008.
- [3] KARUBE, I.; OMURA, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 10, p. 177-181, 2000.
- [4] WILSON, G.S.; GIFFORD, R. Biosensor for real-time in vivo measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 20, p. 2388-2403, 2005.
- [5] PALMER, E. **Sensing things to come**. Disponível em <<http://www.chemsoc.org/chembytes/ezone/1998/palmer.htm>> Acessado em 21 mar. 2008.
- [6] CLARK, L.C.Jr.; LION, C. Annals of the New York Academy of Sciences, n. 29, p. 102-123, 1968.
- [7] RICHARDSON, N.J.; GARDNER, S.; RAWSON, D.M. A chemically mediated amperometric biosensor of monitoring eubacterial respiration. **Journal of applied bacteriology**, n. 70, p. 422-426, 1991.
- [8] RAHMAN, M.A; PARK, D.S; CHANG, S.C; MCNEIL, C.J; SHIM, Y.B. The biosensor based on the pyruvate oxidase modified conducting polymer for phosphate ions determinations. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 21, p.1116-1124, 2006.

- [9] FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.
- [10] NEWMAN, J.D.; TURNER, A.P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 20, p. 2435-2453, 2005.
- [11] OLIVEIRA NETO, G.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Química Nova**, n. 11, p. 432-435, 1988.
- [12] WALLACE, G. G.; SMITH, M.; ZHAO, H. Trends in Anal. Chem, n. 18, p. 245, 1999.
- [13] ROSSATO, S.S. **Desenvolvimento de um biosensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada**. 2000. Dissertação (Doutorado em Química) - Universidade de Campinas – Instituto de Química.
- [14] STRADIOTTO, N.R., YAMANAKA, H.; ZANONI, M.V.B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **J. Brazil. Chem. Soc.**, n. 14, p.159-73, 2003.
- [15] WANG, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. **J. Pharm. Biom. An.**, n. 19, p. 47-53, 1999.
- [16] UPDIKE, S.J.; HICKS, G.P. The enzyme electrode. **Nature**, n. 214, p.986-988, 1967.
- [17] SCHELLER et. Al. Second Generation biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 6, p. 245-253, 1991.
- [18] DI, J.; BI, S.; ZHANG, M. Third-generation superoxide anion sensor based on superoxide dismutase directly immobilized by sol-gel thin film on gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 19, p. 1479-1486, 2004.
- [19] PETER, T.K. **Introduction to Amperometric Biosensor Configurations**. Disponível em <<http://www.currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3f.pdf>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [20] KURALAY, F.; ÖZYÖRÜK, H.; YILDIZ, A. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized uréase in poly(vinylferrocenium) film. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 109, p. 194-199, 2005.
- [21] **Potentiometric Biosensors**. Disponível em <<http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/potenciometric.html>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [22] BERGVELD, P. Thirty years of Isfectology: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 88, p.1-20, 2003.

- [23] Disponível em <[http://www.semicon.toshiba.co.jp/eng/product/transistor/selection/topics/1177784\\_2470.html](http://www.semicon.toshiba.co.jp/eng/product/transistor/selection/topics/1177784_2470.html)> Acessado em 22 mar. 2008.
- [24] LUO et. Al. Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO<sub>2</sub> nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 97, p. 249-255, 2004.
- [25] **Optical Biosensors**. Disponível em <<http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/optical.html>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [26] VLADIMIR, L.; ALEXEEV, S. D.; DAVID, N. F.; SANFORD, A. A. Photonic Crystal Glucose-Sensing Material for Noninvasive Monitoring of Glucose in Tear Fluid. **Clinical Chemistry**, n. 50, p. 2353- 2360, 2004.
- [27] **Piezo-electric Biosensors**. Disponível em <<http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/piezo.html>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [28] KUMAR, A. **Biossensores Base don Piezoelectric Cristal Detectors: Teory and Application**. Disponível em <<http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/Kumar-0010.html>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [29] GUIBAULT, G.G. Biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**, p. 3-8, 1991.
- [30] BARNES, C.; D' SILVA, C.; JONES J. P.; LEWIS, T.J. A concanavalin A-coated piezoelectric crystal biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 3, p. 295-304, 1991.
- [31] **Ambriex**. Disponível em <<http://www.ambriex.net/Produto.aspx?idProduct=24>> Acessado em 25 mar. 2008.
- [32] **Transmisores de presión de masa**. Disponível em <<http://http://www.dynisco.com/products.aspx?lang=es>> Acessado em 22 abr. 2008.
- [33] **Calorimetric Biosensors**. Disponível em <<http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/calorimetric.html>> Acessado em 06 jan. 2008.
- [34] **Calorimetric Biosensors**. Disponível em <[http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/images/fig6\\_2.gif](http://www.Isbu.ac.uk/biology/enztech/images/fig6_2.gif)> Acessado em 22 mar. 2008.
- [35] **Negative Temperature Coefficient**. Disponível em <[http://www.tiosam.com/enciclopedia/?q=Negative\\_Temperature\\_Coefficient](http://www.tiosam.com/enciclopedia/?q=Negative_Temperature_Coefficient)> Acessado em 25 mar. 2008.
- [36] NETO, G. O.; YAMANAKA, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. **Química Nova**. 1988, v. 11, p. 432.
- [37] FATIBELLO, O. F.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**. 1992, v. 15, p. 28.

## Capítulo 2- Natureza química das enzimas

---

### 2.1- Noções gerais

O componente fundamental de um biossensor enzimático são as enzimas. As enzimas são biocatalisadores que apresentam alta seletividade; observada especialmente para as enzimas glicose oxidase, colesterol oxidase e urease, utilizadas no presente trabalho.

A palavra enzima foi introduzida por Kuhne em 1878 para designar a ocorrência no levedo de algo responsável pela sua atividade fermentativa. Berzelius, 50 anos antes, tinha reconhecido a presença de fermentos de ocorrência natural que promoviam reações químicas e antecipou o conceito de catalisadores biológicos. Berzelius classificou os fermentos em organizados e não-organizados com base na presença ou ausência de microorganismos intactos. Kuhne aplicou a palavra enzima aos fermentos derivados de extratos de levedos.<sup>1</sup>

Em 1897 Büchner preparou um filtrado de extratos de levedo que foi o primeiro extrato enzimático removido de células vivas que pode catalisar a fermentação. A natureza química das enzimas permaneceu controversa. Em 1926, Sumner cristalizou a urease a partir de extratos de feijão, no entanto, a preparação tinha pequena atividade catalítica e outros investigadores atribuíram o efeito catalítico a contaminantes e não à proteína. Willstätter, por outro lado, purificou a peroxidase com elevada capacidade catalítica e ausência de outras proteínas. No início dos anos 30, Northrop e colaboradores cristalizaram a pepsina e a tripsina demonstrando definitivamente que as enzimas eram proteínas.<sup>2</sup>

As enzimas são proteínas com a função específica de acelerar reações químicas que ocorrem sob condições termodinamicamente não favoráveis. Elas aceleram consideravelmente a velocidade das reações químicas em sistemas biológicos quando comparadas com as reações correspondentes não catalisadas. Consegue-se isso através do abaixamento da energia de ativação necessária para que ocorra uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para aplicações industriais, como na indústria farmacêutica ou na alimentar.

Em sistemas vivos, a maioria das reações bioquímicas dá-se em vias metabólicas, que são sequências de reações em que o produto de uma reação é utilizado como reagente na reação seguinte. Diferentes enzimas catalisam diferentes passos de vias metabólicas, agindo de modo a não interromper o fluxo nessas vias. Cada enzima pode sofrer regulação da sua atividade,

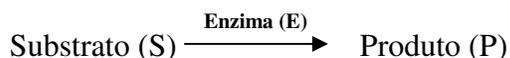
aumentando-a, diminuindo-a ou mesmo interrompendo-a, de modo a modular o fluxo da via metabólica que se requer.

Algumas enzimas são capazes de aumentar a velocidade de certas reações cerca de  $10^{14}$  vezes, sem requerer condições extremas de temperatura, pressão e pH.<sup>3</sup> A Tabela 2.1 ilustra as velocidades de reações catalisadas e não catalisadas por enzimas.

**Tabela 2.1-** Velocidade de reações não catalisadas e catalisadas por enzimas.<sup>3</sup>

Enzima	Não-catalisada (s <sup>-1</sup> )	Catalisada (s <sup>-1</sup> )	Aumento da velocidade
Anidrase carbônica	$1,3 \times 10^{-1}$	1.000.000	$7,7 \times 10^6$
Adenosina-deaminase	$1,8 \times 10^{-10}$	370	$2,1 \times 10^{12}$
Nuclease estafilocócica	$1,7 \times 10^{-13}$	95	$5,6 \times 10^{14}$
Triose-fosfato-isomerase	$4,3 \times 10^{-6}$	4.300	$1,0 \times 10^9$
Quimiotripsina	$1,0 \times 10^{-9}$	190	$1,7 \times 10^{11}$
Orotidina-descarboxilase	$2,8 \times 10^{-16}$	39	$1,4 \times 10^{17}$

A reação catalisada por uma enzima pode ser ilustrada como:



A enzima atua sobre o substrato (S) que se transforma em produto(P). Na ausência de enzima pouco produto (ou nenhum) é formado, mas em presença da mesma, a reação se processa em alta velocidade. Como a maioria das reações é reversível, os produtos da reação numa direção tornam-se substratos para a reação inversa.

As enzimas são os catalisadores mais específicos que se conhece, tanto para o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato como para o tipo de reação efetuada sobre o substrato. A especificidade inerente da enzima reside em uma cavidade ou fenda de ligação do substrato, que está situada na superfície da proteína enzimática. A cavidade, denominada sítio ativo, é um arranjo de grupos presentes em cadeias laterais de certos aminoácidos que ligam o substrato por ligações não-covalentes. Muitas vezes, os resíduos de aminoácidos que formam o

sítio ativo ficam em regiões distantes, na seqüência primária, mas próximos no sítio ativo, pelo enovelamento de cadeia polipeptídica (estrutura terciária).

Algumas enzimas têm outra região na molécula, o sítio alostérico, afastada do sítio ativo. No sítio alostérico moléculas pequenas específicas se ligam e causam alterações na conformação protéica que afetam o sítio ativo, aumentando ou reduzindo a atividade enzimática.

A maioria das enzimas necessita de moléculas orgânicas ou inorgânicas pequenas, essenciais à sua atividade e denominadas coenzimas e co-fatores.

## **2.2- Classificação das enzimas**

Com a descoberta de grande número de enzimas, houve a necessidade de sistematização da nomenclatura. A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) adotaram um sistema racional e prático de nomenclatura identificando as enzimas em seis classes, de acordo com a natureza da reação química que catalisam. Para cada enzima, são atribuídos dois nomes e um número de classificação de quatro dígitos que identificam as classes, as subclasses e as sub-subclasses.

Na classificação internacional sistemática, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada, como pode ser visto na Tabela 2.2.

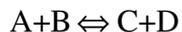
**Tabela 2.2-** Classificação das enzimas segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).<sup>4</sup>

1.	<i>Oxirredutases</i> (reações de oxirredução ou transferência de elétrons – Desitrogenases e Oxidases)
	1.1 atuando em CH-OH
	1.2 atuando em C=O
	1.3 atuando em C=O-
	1.4 atuando em CH-NH <sub>2</sub>
	1.5 atuando em CH-NH-
	1.6 atuando em NADH, NADPH
2.	<i>Transferases</i> (transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil – <i>Quinases e Transaminases</i> )
	2.1 grupo com um carbono
	2.2 grupos aldeído ou acetona
	2.3 grupos acil
	2.4 grupos glicosil
	2.5 grupos fosfatos
	2.6 grupos contendo enxofre
3.	<i>Hidrolases</i> (reações de hidrólise de ligação covalente – Peptidases)
	3.1 ésteres
	3.2 ligações glicosídicas
	3.3 ligações peptídicas
	3.4 outras ligações C-N
	3.5 anidridos ácidos
4.	<i>Liases</i> (catalisam a quebra de ligações covalentes e remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico – <i>Dehidratases e Descarboxilases</i> )
	4.1 =C=C=
	4.2 =C=O
	4.3 =C=N-
5.	<i>Isomerases</i> (reações de interconversão entre isômeros óticos ou geométricos – <i>Epimerases</i> )
	5.1 racemases
6.	<i>Ligases</i> (catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas pré-existentes, sempre às custas de energia – <i>Sintetases</i> )
	6.1 C-O
	6.2 C-S
	6.3 C-N
	6.4 C-C

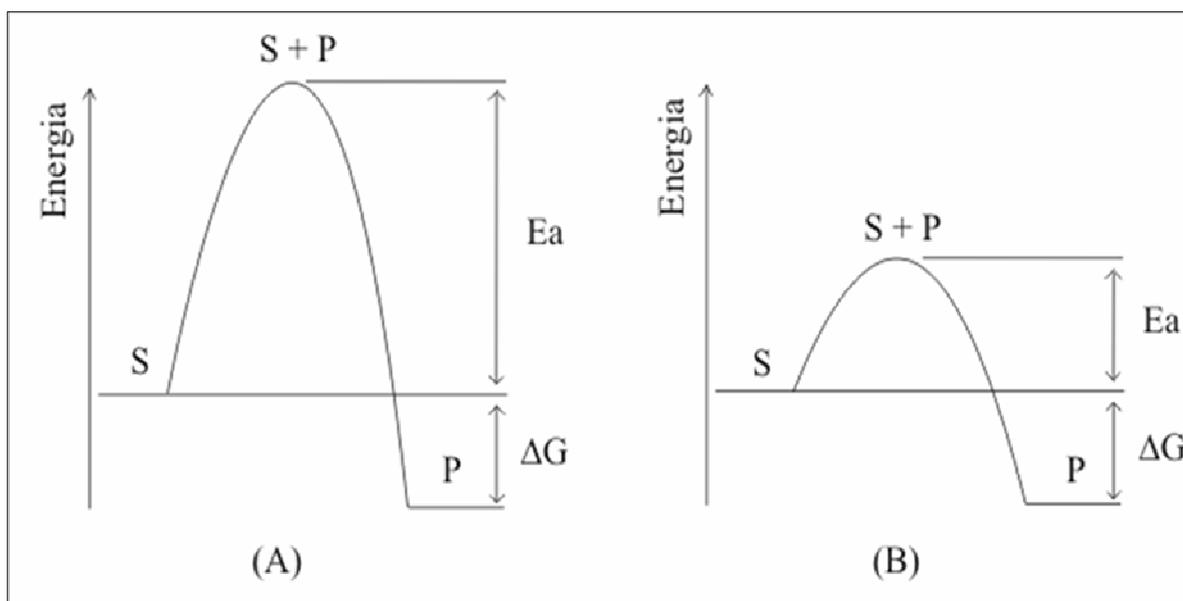
### 2.3– Mecanismos das reações catalisadas por enzimas

Para reagirem, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e com a quantidade de energia que lhes permitiam formar o complexo ativado, denominado estado de transição que representa os reagentes em seu estado ativado. Para atingir o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como energia de ativação ( $E_a$ ) ou mais comum em bioquímica energia livre de ativação,  $\Delta G^\ddagger$  (o símbolo ( $\ddagger$ ) indica o processo de ativação). Sob condições fisiológicas, a velocidade das reações pode ser aumentada pela redução da energia livre de ativação conseguida pela ação das enzimas.<sup>2-3</sup>

A comparação do perfil energético das reações catalisadas e não-catalisadas é mostrada na Figura 2.1 para a reação:



Na Figura 2.1, o estado de transição correspondente ao ponto de mais alta energia da reação não-catalisada é a medida da energia livre de ativação,  $\Delta G^\ddagger$ . Ou ainda,  $\Delta G^\ddagger$  é a energia livre do estado de transição subtraída da energia livre dos reagentes. No complexo ativado (estado de transição do sistema), os reagentes estão em forma intermediária de alta energia e não podem ser identificados nem como reagentes nem como produtos. O complexo do estado de transição é aquele em que pode ser decomposto em produtos ou voltar aos reagentes.<sup>5</sup> No estado de transição é o exato momento onde o substrato se transforma em produto, este estado corresponde ao máximo de energia.



**Figura 2.1-** Diagrama energético de reação catalisada e de reação não-catalisada.<sup>6</sup>

A diferença entre os valores da energia de ativação de uma reação catalisada e de uma reação não-catalisada indica a eficiência do catalisador.

A velocidade de uma reação é inversamente proporcional ao valor de sua energia livre de ativação. Quanto maior o valor de  $\Delta G^\ddagger$ , menor será a velocidade da reação. Os catalisadores aumentam a velocidade da reação reduzindo a energia livre de ativação.<sup>5</sup>

Três propriedades distintas das enzimas permitem que elas exerçam papel central na promoção e regulação dos processos celulares, caracterizando-as como componentes vitais aos sistemas vivos.<sup>7</sup>

- i) Elevada especificidade da reação. Como em geral, cada reação sob condições apropriadas é catalisada por uma enzima específica. Diante de várias rotas potencialmente possíveis, a enzima escolhe a com menor energia livre de ativação.
- ii) Condições reacionais mais brandas. A atividade de cada enzima é dependente do pH, da temperatura, da presença de vários co-fatores e das concentrações de substratos e produtos.
- iii) Capacidade de regulação da concentração e da atividade. Permite o ajuste fino do metabolismo em diferentes condições fisiológicas.

#### **2.4- Sítio ativo catalítico**

Sítio ativo é a região na superfície da enzima onde ocorre a catálise. O substrato liga-se ao sítio ativo por ligações não-covalentes (interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas). Os grupos que participam das ligações são a carboxila do ácido glutâmico ou do ácido aspártico, o grupo  $\epsilon$ -amino da lisina, o amidazol da histidina, a hidroxila da serina etc.

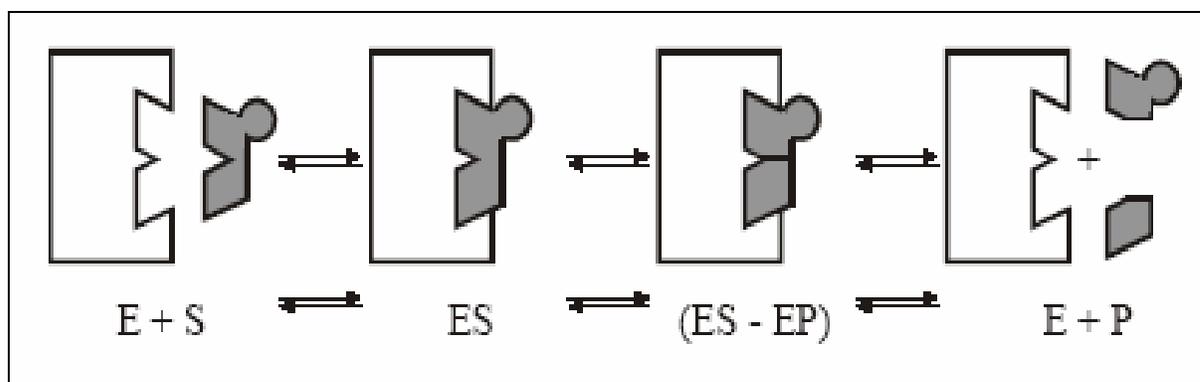
Somente uma pequena porção do substrato onde ocorre transformação está ligada à enzima. Isso não implica, entretanto, que os aminoácidos no sítio ativo estejam um ao lado do outro na estrutura primária da proteína. Em consequência das dobras e enovelamento da enzima (estrutura secundária e terciária), certos resíduos de aminoácidos podem estar distantes um do outro na sequência primária, ainda que juntos no sítio ativo da proteína completa.

A especificidade da ligação enzima-substrato depende do arranjo precisamente definido de átomos no sítio ativo. Uma das explicações para a elevada especificidade das enzimas é que suas estruturas tridimensionais permitem um perfeito encaixe com o substrato. Dois modelos

foram propostos para explicar a especificidade enzimática, o modelo chave-fechadura e o modelo do encaixe induzido.

#### 2.4.1- Modelo chave-fechadura

Foi sugerido por Emil Fischer, em 1894, que esse fato era devido a que tanto as enzimas como os substratos apresentam formas geométricas complementares, fazendo com que encaixem de maneira precisa umas nos outros.<sup>7</sup> Este processo é muitas vezes referido como modelo chave-fechadura. No entanto, apesar de deste modelo explicar a especificidade das enzimas, falha em explicar a estabilização dos estados de transição que as enzimas exibem. A Figura 2.2 ilustra o modelo chave-fechadura descrito por Emil Fischer.

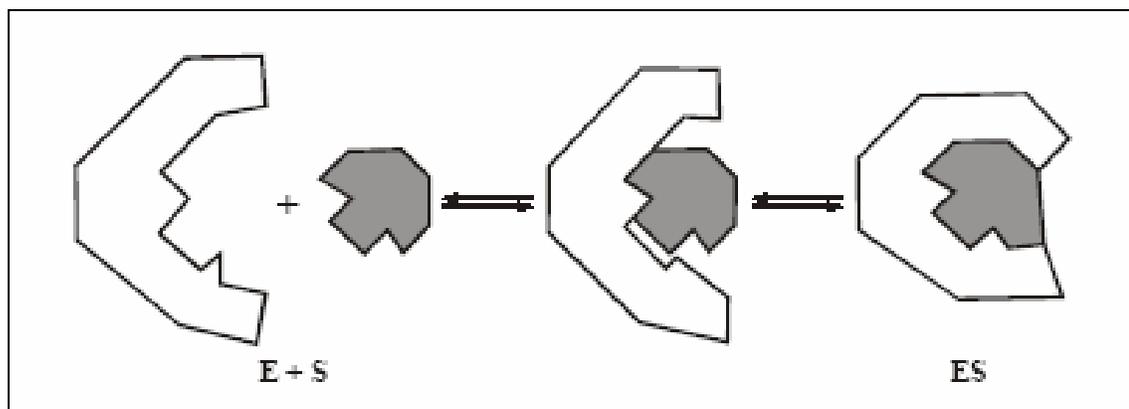


**Figura 2.2** - Modelo chave-fechadura. A interação entre a enzima (com estrutura rígida) e seu substrato.<sup>7</sup>

#### 2.4.2- Modelo do encaixe induzido

Em 1958, Daniel Koshland sugeriu uma modificação ao modelo de chave-fechadura: uma vez que as enzimas exibem estruturas flexíveis, os sítios ativos alteram a sua forma de maneira continuada através de interações com o substrato, enquanto esse mesmo substrato vai interagindo com a enzima.<sup>8</sup> Como resultado, o substrato não se liga simplesmente a um sítio ativo que é rígido. As cadeias laterais dos aminoácidos que formam os sítios ativos sofrem uma reorientação de maneira a que as suas posições potenciem a ação catalítica da enzima. Em alguns casos, como nas glicosidases, a molécula de substrato também sofre alterações de conformação à medida que vai se aproximando do sítio ativo.<sup>9</sup> O sítio ativo continua a sofrer modificações até que o

substrato esteja completamente ligado e é neste momento em que a conformação final e a carga são determinadas.<sup>10</sup> A Figura 2.3 ilustra o modelo encaixe-induzido descrito por Daniel Koshland.



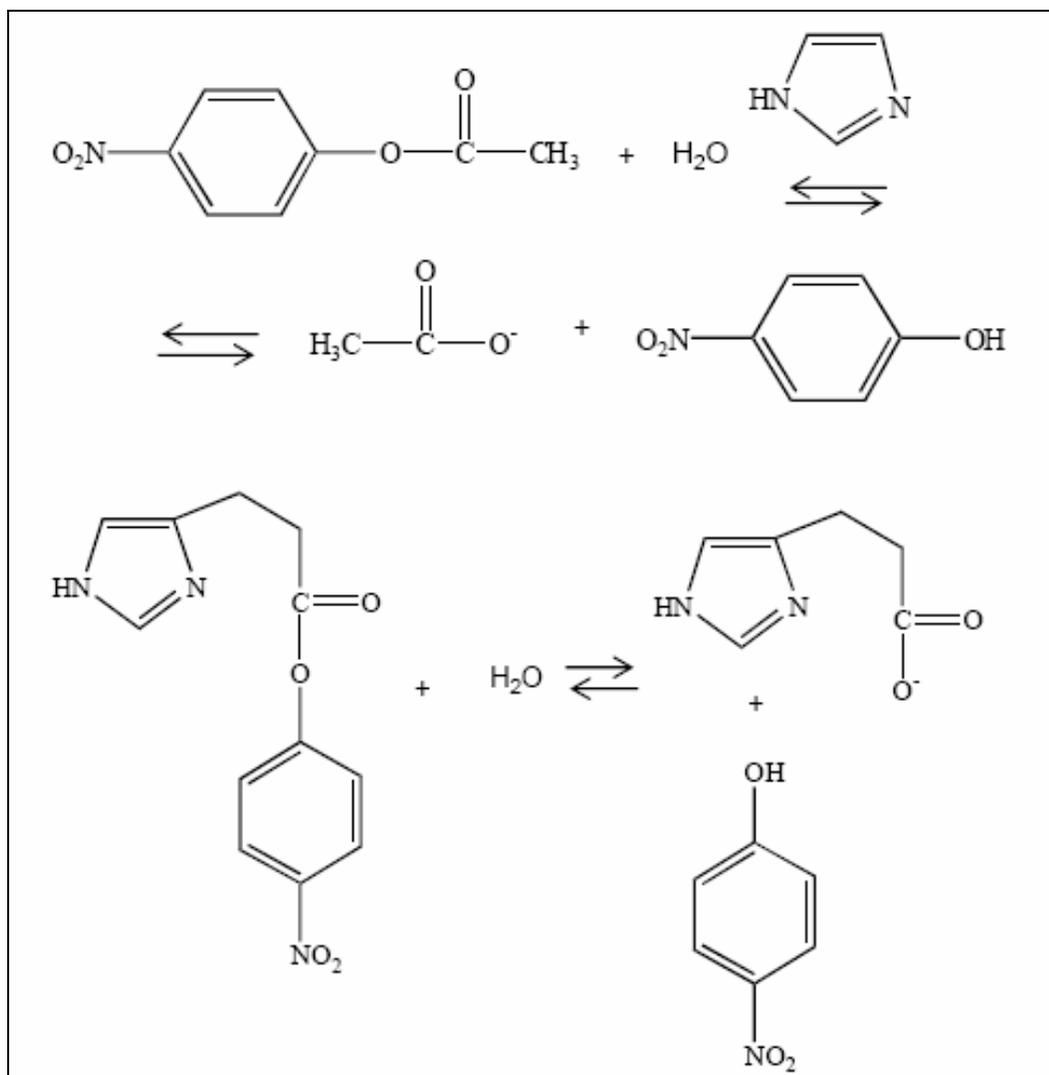
**Figura 2.3-** Modelo do encaixe induzido. A ligação do substrato à enzima induz uma mudança conformacional na enzima produzindo um melhor encaixe.<sup>8</sup>

## 2.5- Mecanismos catalíticos<sup>11</sup>

As reações químicas envolvidas na transformação dos substratos variam com os mecanismos de ação das enzimas. Os principais tipos de mecanismos catalíticos que as enzimas utilizam são: (i) efeitos de proximidade e orientação, (ii) catálise eletrostática, (iii) catálise ácido-básica e (iv) catálise covalente.

### (i) Efeitos de proximidade e orientação

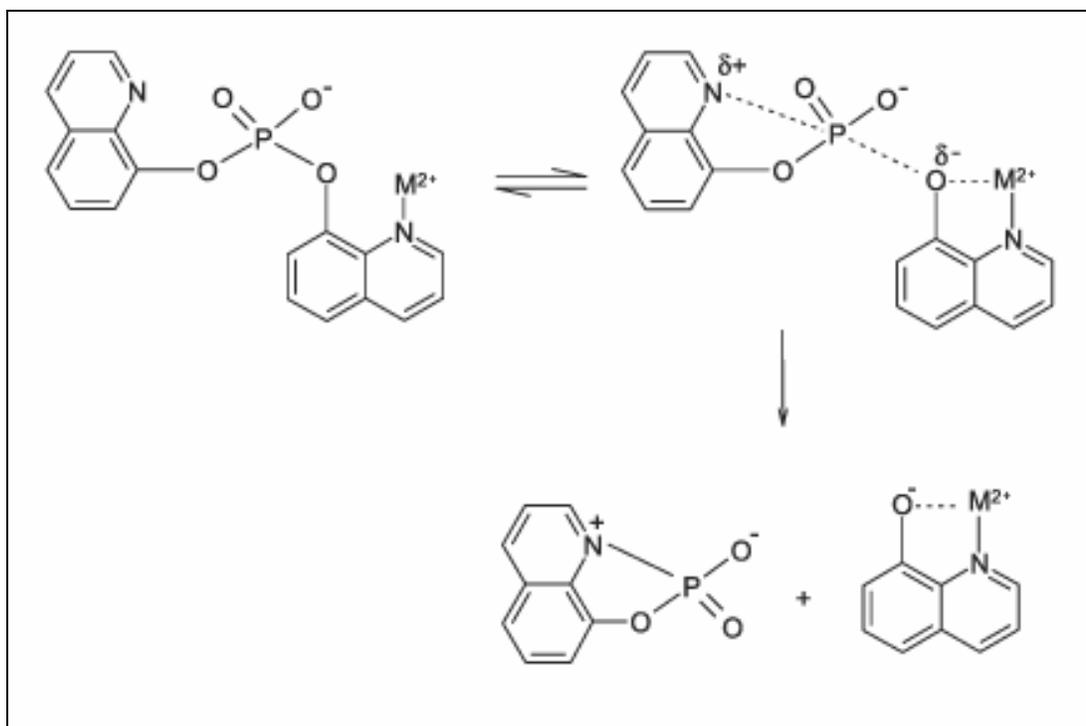
Os substratos se aproximam dos grupos funcionais catalíticos da enzima em uma orientação espacial apropriada para que a reação possa ocorrer. Após o correto posicionamento do substrato, uma modificação na conformação da enzima resulta em um complexo enzima-substrato orientado. Essa orientação leva o complexo enzima-substrato ao estado de transição, como pode ser visto na Figura 2.4.



**Figura 2.4**– Catálise por proximidade e orientação.<sup>12</sup>

(ii) Catálise por íons metálicos

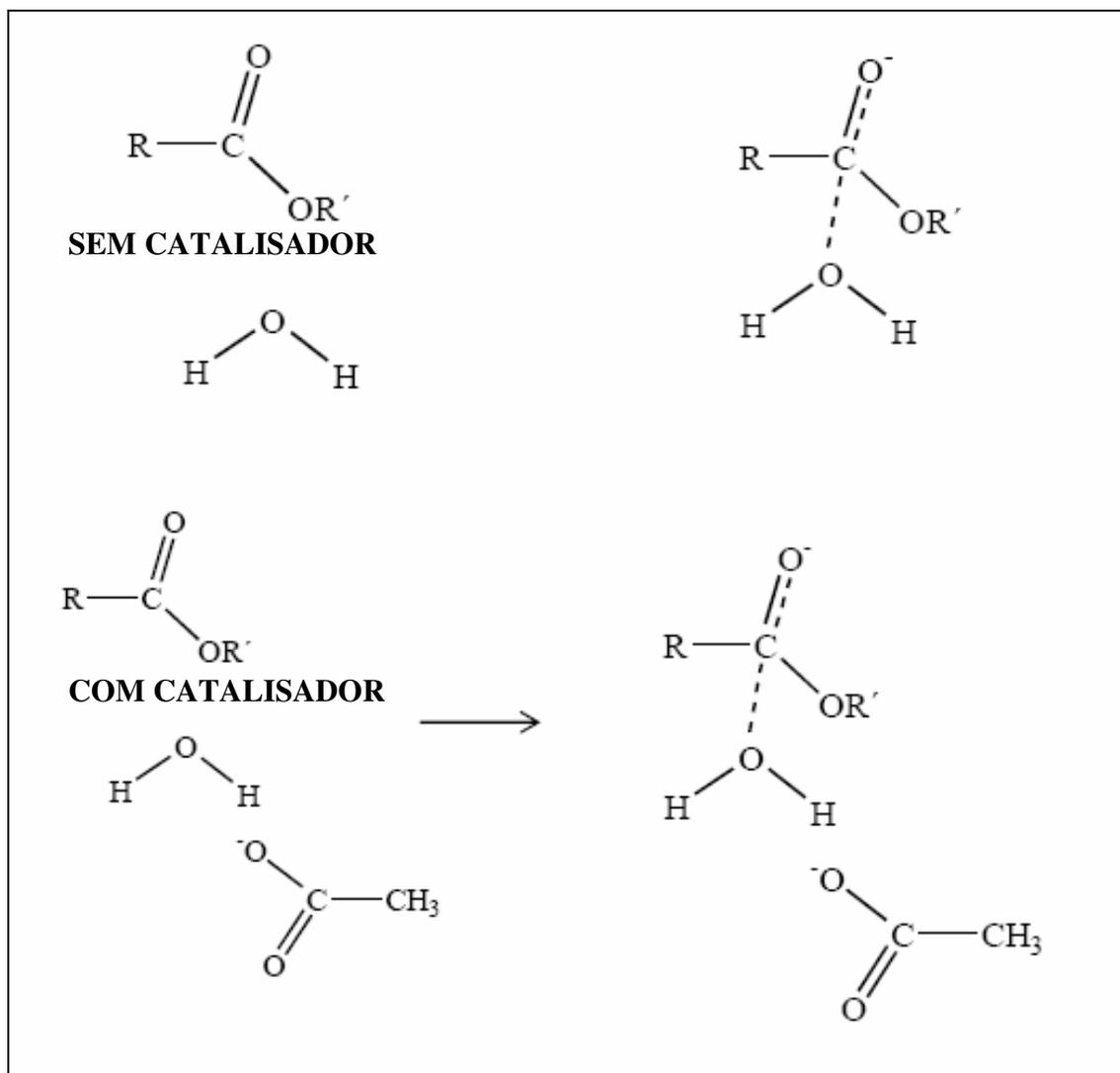
A força das interações eletrostáticas está relacionada com a capacidade das moléculas solventes vizinhas em reduzir os efeitos de atração entre os grupos químicos. Como a água é excluída do sítio ativo quando o substrato se liga, a constante dielétrica local é muitas vezes baixa. A distribuição de cargas nos sítios ativos das enzimas pode influenciar a reatividade química do substrato. Uma ligação mais eficiente do substrato reduz a energia livre do estado de transição, que acelera a reação (ver Figura 2.5).



**Figura 2.5**– Representação esquemática do mecanismo para a reação catalisada pelo íon Metálico.<sup>12</sup>

### (iii) Catálise ácido-base geral

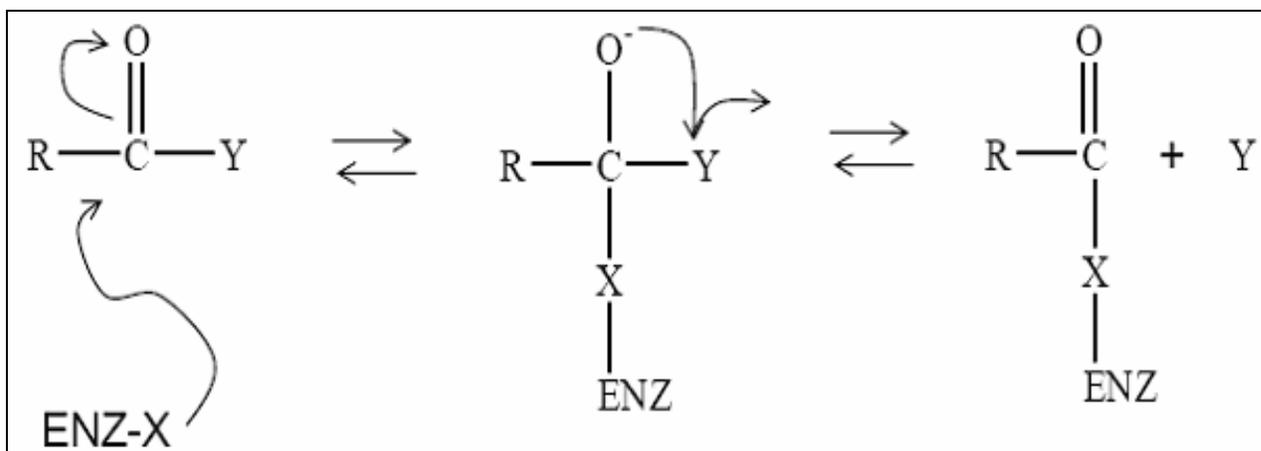
Os grupos químicos podem se tornar mais reativos pela adição ou remoção de prótons (ver Figura 2.6). Os sítios ativos das enzimas contêm cadeias laterais que podem atuar como doadores ou receptores de prótons. Esses grupos são denominados ácidos gerais ou bases gerais. Por exemplo, a cadeia lateral da histidina (grupo imidazol) muitas vezes atua como catalisador ácido e/ou básico em concerto porque tem  $pK_a$  na faixa de pH fisiológico.



**Figura 2.6**– Reação ácido-base geral: hidrólise de um éster.<sup>12</sup>

(iv) Catálise covalente

Acelera a velocidade da reação pela formação de uma ligação covalente transitória entre a enzima e o substrato. Um grupo nucleofílico da cadeia lateral do catalisador forma uma ligação covalente instável com um grupo eletrofílico do substrato. O complexo enzima-substrato então forma o produto (ver Figura 2.7).

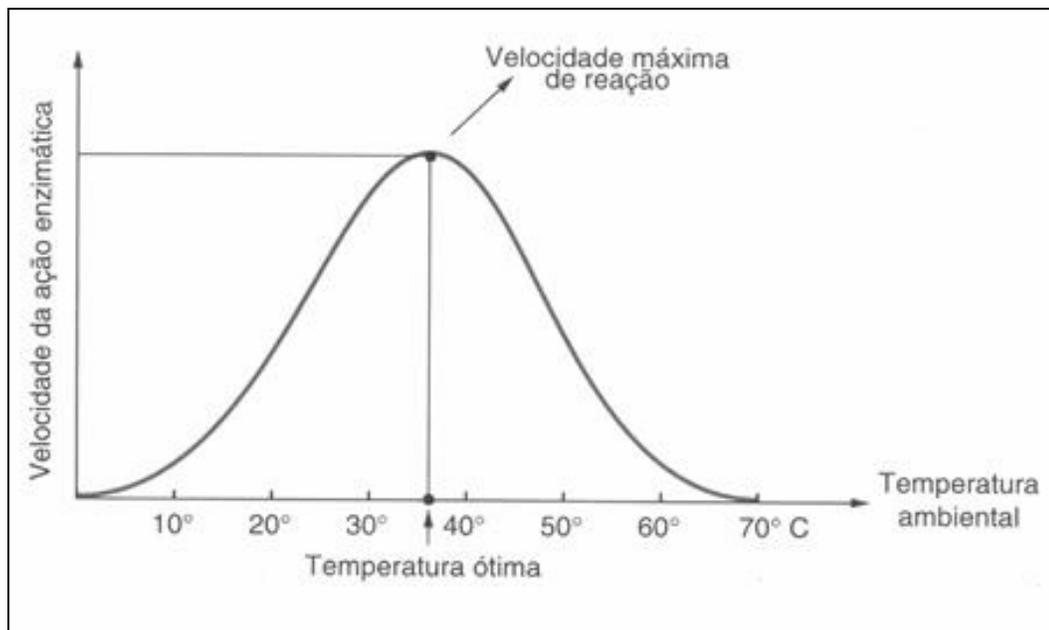


**Figura 2.7-** Representação de uma catálise covalente. Onde  $X = RCOO^-$ ,  $RNH_2$ ,  $ArOH$ , His,  $ROH$ ,  $RSH$ .<sup>13</sup>

## 2.6- Fatores que influenciam a atividade enzimática

Vários fatores influenciam a atividade enzimática, incluindo a temperatura, pH, concentração do substrato, tempo e produto da reação.<sup>14</sup>

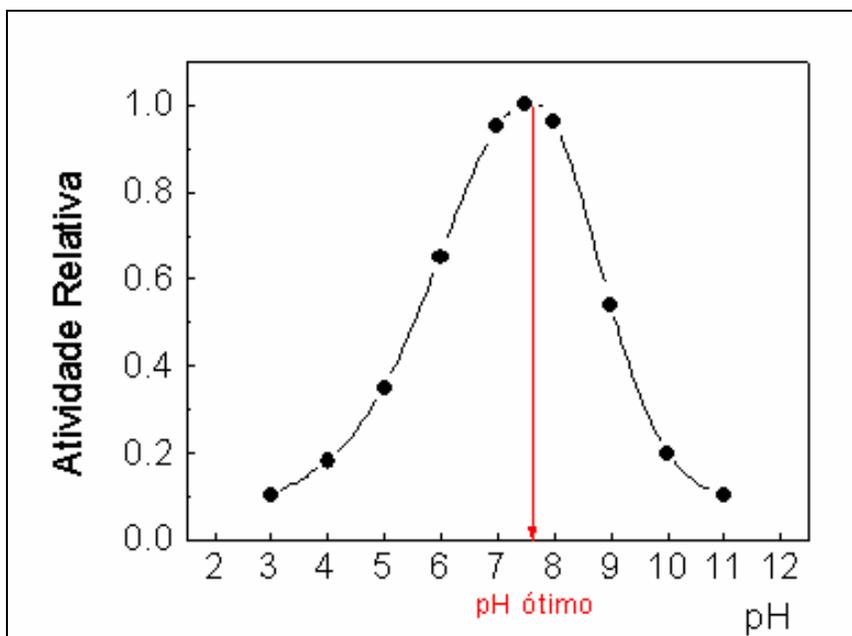
Com relação à temperatura, as reações químicas são afetadas de acordo com a lei de Vant'Hoff. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação. A velocidade aumenta porque mais moléculas adquirem energia suficiente para atingir o estado de transição. Em reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com a máxima eficiência. Como as enzimas são proteínas, os valores de temperatura ótima situam-se entre 35 a 40°C e dependem do pH e da força iônica. Acima dessa temperatura, a atividade das enzimas declina abruptamente por desnaturação protéica. Sob condições de hipotermia, a atividade enzimática é deprimida. As relações acima descritas são ilustradas na Figura 2.8.



**Figura 2.8-** Efeito da temperatura sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.<sup>15</sup>

A concentração de íons hidrogênio afeta as enzimas de vários modos. Primeiro, a atividade catalítica das enzimas está relacionada à ionização de aminoácidos no sítio ativo. Por exemplo, a atividade catalítica de certas enzimas necessita a forma protonada da cadeia lateral do grupo amina. Se o pH torna-se suficientemente alcalino de tal modo que o grupo amina perde seu próton, a atividade da enzima pode ser reduzida. Além disso, os substratos podem também ser afetados. Se um substrato contém um grupo ionizável, as mudanças no pH afetam a capacidade de ligação ao sítio ativo. Segundo alterações nos grupos ionizáveis podem modificar a estrutura terciária das enzimas. Mudanças drásticas no pH promovem a desnaturação de muitas enzimas.<sup>16-</sup>

<sup>17-18</sup> A Figura 2.9 ilustra a atividade enzimática *versus* pH de uma enzima.



**Figura 2.9-** Atividade enzimática *versus* pH (considerando-se os outros fatores constantes).<sup>19</sup>

Enzimas tal como a quimotripsina (enzima que hidrolisa proteína) ou a triosefosfato isomerasas são ativas sem necessitar a presença de outro fator. No entanto, quase um terço das enzimas conhecidas requer um componente não protéico para sua atividade, denominado cofator. Os cofatores podem ser íons metálicos  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$ , ou moléculas orgânicas, muitas delas derivadas de vitaminas do complexo B.

Certas moléculas podem inibir a ação catalítica de uma enzima, denominadas de inibidores. Estes podem ocupar temporariamente o centro ativo por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou alterar a conformação espacial da enzima, impedindo sua união ao substrato (inibidor não competitivo).

Em análises clínicas as condições ideais para análise são similares às do fluido fisiológico, ou seja, pH 7,4 e temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Em um biossensor a enzima encontra-se normalmente imobilizada na superfície do eletrodo. É necessário analisar as técnicas de imobilização a serem utilizadas para que se possa obter uma melhor atividade enzimática, a partir do melhor método de imobilização para o processo requerido.

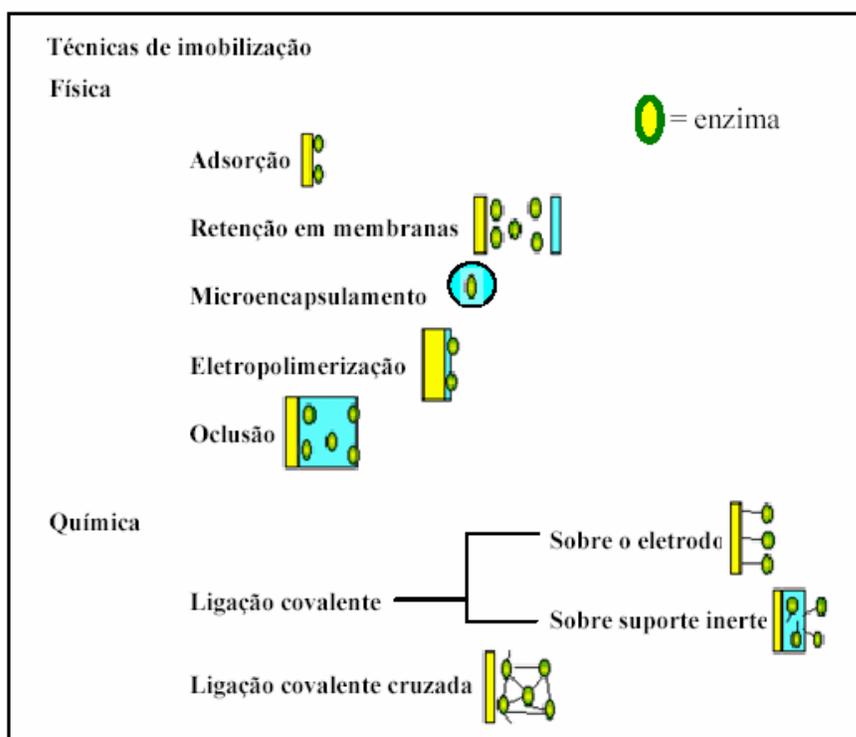
## 2.7- Técnicas de imobilização

Pelo seu alto poder catalítico e especificidade, as enzimas têm sido utilizadas na construção de biossensores. Dessa forma, a enzima deve ser imobilizada na superfície do eletrodo, mantendo sua atividade catalítica. A enzima imobilizada pode ser reutilizada, o que diminui o custo consideravelmente.

As características ideais para o suporte devem girar em torno da insolubilidade em água, se ligar facilmente à enzima e ser inerte quimicamente.

Em 1916, Nelson e Griffing,<sup>20</sup> mostraram que a invertase imobilizada por adsorção em carvão ativado conservava sua atividade catalítica. A partir de então, muito tem sido pesquisado em termos de novos suportes e técnicas de imobilização.

Em termos gerais, os métodos<sup>21</sup> para imobilização enzimática podem ser classificados em retenção física, onde a enzima não sofre nenhuma alteração em sua estrutura química, e ligação química, onde a enzima é quimicamente ligada ao suporte por ligações covalentes, como pode ser observado na Figura 2.10.



**Figura 2.10-** Ilustração das técnicas de imobilização enzimática.<sup>22</sup>

## **2.7.1– Métodos de imobilização de enzimas por retenção física**

### **2.7.1.1– Adsorção**

As enzimas se unem ao suporte mediante ligações fracas como força de Van der Waals ou ligações de hidrogênio. Sobre o ponto de vista mecânico, são pouco estáveis e a união ao suporte é fraca (podendo haver desorção devido à mudança de temperatura, pH, pelo substrato, solvente ou convecção), porém, o método é o mais simples e pode ser realizado em condições brandas de imobilização, preservando-se a enzima (mudança conformacional mínima ou nula). Coloca-se uma gota da solução aquosa contendo a enzima em contato com a superfície do suporte que, após seco, estará pronto para uso.<sup>23</sup>

### **2.7.1.2– Retenção em membranas**

A retenção de enzimas em membranas poliméricas foi a primeira técnica descrita para fabricação de biossensores, onde a enzima foi colocada sobre o eletrodo e retirada por uma membrana polimérica dialítica. Uma membrana adicional semipermeável pode barrar elementos interferentes e possibilitar somente a passagem dos produtos da reação enzimática.<sup>24</sup>

### **2.7.1.3– Microencapsulamento**

Nesta técnica, as enzimas estão envolvidas por membranas semipermeáveis que permitem a passagem de moléculas de substrato e produto, mas não da enzima; são de forma esférica com tamanhos entre 1 a 100 micrometros de diâmetro.<sup>21</sup> A enzima e um monômero hidrofílico são misturados em solução aquosa e adicionados em solvente orgânico insolúvel em água. Com a adição de monômero hidrofóbico, se inicia a reação de polimerização, levando à formação de microesferas.<sup>24</sup> Com este método pode-se encapsular simultaneamente uma grande variedade de enzimas, o que faz com que reações que se sucedem em múltiplas etapas possam ser levadas a cabo. Os principais tipos de membranas utilizadas são: Teflon<sup>®</sup>, Nafion<sup>®</sup>, colágeno acetato de celulose e policarbonato.

### **2.7.1.4 – Eletropolimerização**

No método da imobilização enzimática por eletropolimerização, um monômero em solução contendo a enzima, ao se polimerizar pela ação de um potencial elétrico, sofre deposição na superfície do eletrodo aprisionando simultaneamente a enzima. O monômero é eletricamente

oxidado em potencial que facilita o crescimento de radicais livres do monômero e, este, é adsorvido pela superfície do eletrodo onde uma série de reações ocorre para a formação da matriz polimérica.<sup>25</sup>

O processo será regido pelo potencial do eletrodo e pelo tempo de reação, o que permite o controle da espessura do filme resultante. Para algumas reações de polimerização, devido a acidez do meio, este pode não ser o mais adequado, pois a enzima pode sofrer desnaturação e ter sua atividade catalítica comprometida.

### **2.7.1.5- Oclusão em matriz polimérica**

Neste método, a enzima é retida dentro de uma rede polimérica tridimensional insolúvel em água. A oclusão pode ser feita em gel <sup>26</sup> (a solução de enzima é misturada a um monômero, que é então polimerizado a um gel, retendo a enzima), em eletrodos de pasta de carbono <sup>27</sup> (a enzima pode ser misturada a uma pasta consistindo de pó de grafite e um óleo e a pasta pode ser misturada a diferentes componentes) e em polímeros (a enzima pode ser adicionada a um monômero, em solução aquosa, e este ser quimicamente polimerizado junto com a enzima). A enzima também pode ser imobilizada dentro de matrizes sólidas porosas.<sup>28</sup>

### **2.7.2- Métodos de imobilização de enzimas por ligação química**

Pode-se imobilizar a enzima em um suporte, ou eletrodo, por meio de reações químicas específicas deste com grupos funcionais presentes na estrutura protéica, tais como amino grupos, grupos carboxílicos, grupo imidazol da histidina e etc. Os métodos químicos incluem ligação covalente e reticulação.<sup>21</sup>

#### **2.7.2.1- Ligação covalente**

Este método consiste no uso de grupos químicos do suporte, por meio da ativação da matriz sólida, e conseqüente união com a enzima. Dos 20 aminoácidos que compõem a estrutura enzimática, os mais empregados para ligarem-se ao suporte são principalmente a lisina, cisteína, tirosina e histidina, e em menor grau, a metionina, triptofano, arginina e os ácidos aspártico e glutâmico. O restante, devido ao caráter hidrofóbico, não se encontra expostos na superfície protéica, e não podem então intervir nas ligações. A ativação da matriz pode consistir em

silanização (Pt, vidro, quartzo), reação com carboimidias (amidas, nylon®, grafite) e glutaraldeído (aminas).<sup>29-30</sup>

Para tal método, faz-se necessário conhecer a densidade de grupos funcionais por unidade de superfície, já que este condiciona o número de uniões enzima-substrato bem como prevê a posição da enzima na superfície do eletrodo. O processo de imobilização pode alterar a estrutura do centro ativo inativando total ou parcialmente a enzima.

Geralmente os suportes poliméricos insolúveis para o acoplamento químico de enzimas contém grupos funcionais que após ativação podem imobilizar o composto bioativo via um grupo funcional específico. Os principais grupos funcionais de suportes poliméricos insolúveis utilizados no processo de imobilização enzimática são: hidroxilas (-OH), carbonilas (C=O), carboxilas (CO(OH)) e aminas primárias (NH<sub>2</sub>).

Os grupos funcionais podem ser ativados quimicamente para imobilização da enzima via seu grupo NH<sub>2</sub> funcional, mantendo a atividade enzimática em níveis adequados para o desenvolvimento de biossensores.

Cada suporte contendo um grupo funcional requer uma ativação específica como pode ser verificado na Figura 2.11.

#### (i) Hidroxilas

Suportes contendo hidroxilas podem ser ativados pela reação com cloreto cianúrico e este se ligar à enzima por meio da reação entre o seu grupo funcional hidroxila e o grupo funcional amina da enzima.

#### (ii) Carbonilas

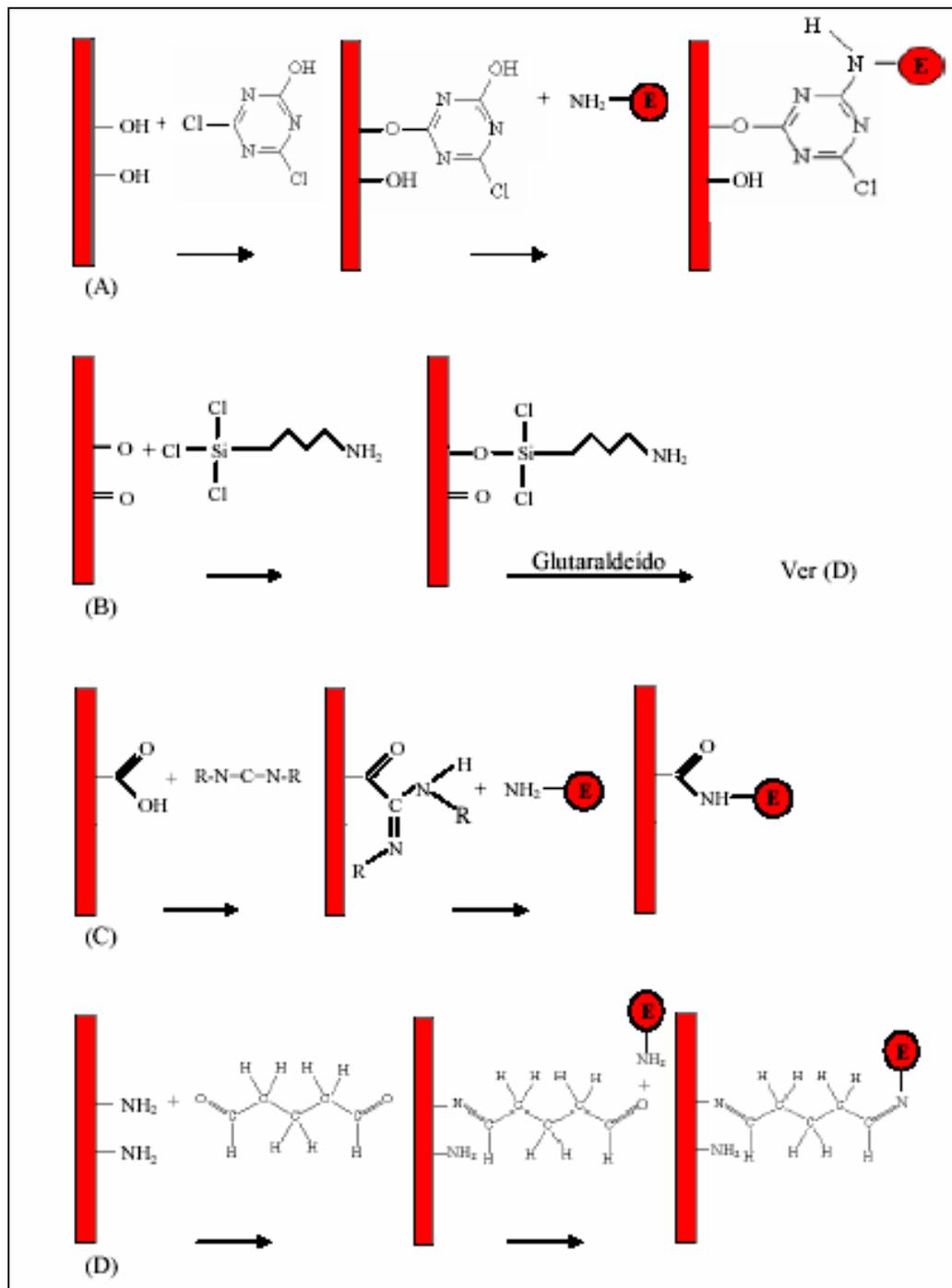
Suportes ricos em grupos funcionais carbonílicos podem sofrer um processo de silanização para posterior complexação com glutaraldeído possibilitando, assim, reações com as aminas enzimáticas.

#### (iii) Carboxilas

Suportes contendo carboxilas podem ser ativados com carbodiiminas e estas servirem de complexo de ligação às enzimas.

#### (iv) Aminas primárias

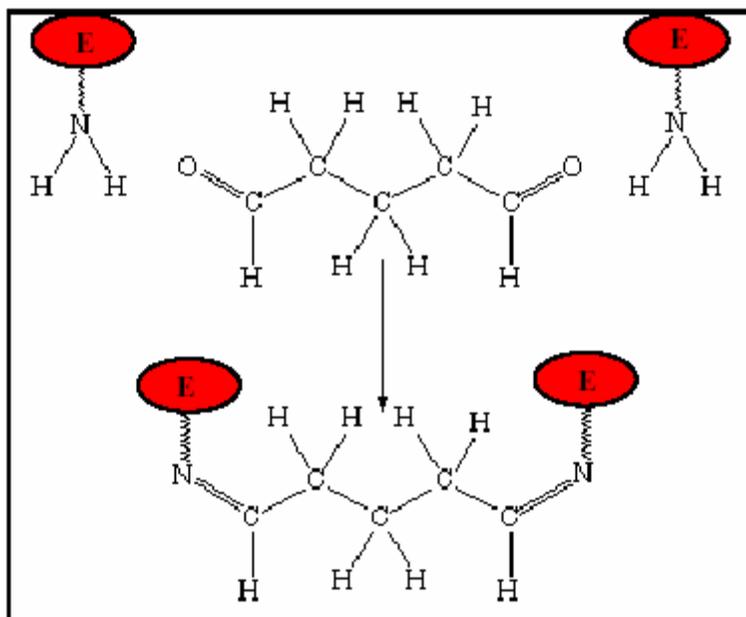
Os suportes que contém grupos funcionais amina podem ser ativados pelo glutaraldeído que se liga às enzimas pela reação entre os grupos funcionais aminas primárias e carbonilas.



**Figura 2.11-** Ligação covalente da enzima (com agrupamento amina) na superfície do eletrodo. (A) Complexação com cloreto cianúrico, (B) ligação covalente por silanização, (C) complexação com carbodiimina e (D) glutaraldeído.<sup>22</sup>

### 2.7.2.2- Ligações covalentes reticuladas

Reagentes bi ou multifuncionais, que podem originar uniões intermoleculares entre as moléculas de enzima, são usados para reagirem com os aminogrupos livres contidos na cadeia protéica, havendo a formação de uma rede polimérica devido a formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e ou um suporte com grupos funcionais. O agente mais aplicado para este fim tem sido o glutaraldeído, por possuir baixa toxicidade e baixo custo comparado aos demais reativos químicos. O resultado é um reticulado com ligações intermoleculares irreversíveis capazes de resistir a condições extremas de pH e temperatura e a solventes orgânicos (ver Figura 2.12). O reticulado possibilita à enzima resistir à desnaturação por estar mais estável estericamente. A maior desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis ao acoplamento químico com glutaraldeído, podendo perder sua atividade por desnaturação.<sup>31</sup>



**Figura 2.12-** Acoplamento químico de uma molécula de glutaraldeído a duas enzimas.<sup>22</sup>

Uma maneira de análise da atividade de uma enzima, após o processo de imobilização é através de sua cinética.

## 2.8- Cinética enzimática

Admite-se que, inicialmente, a enzima e o substrato reagem reversivelmente, formando um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato que, por sua vez, ou se decompõe ou reage com outra substância, regenerando a enzima e formando os produtos da reação.<sup>32-33</sup>

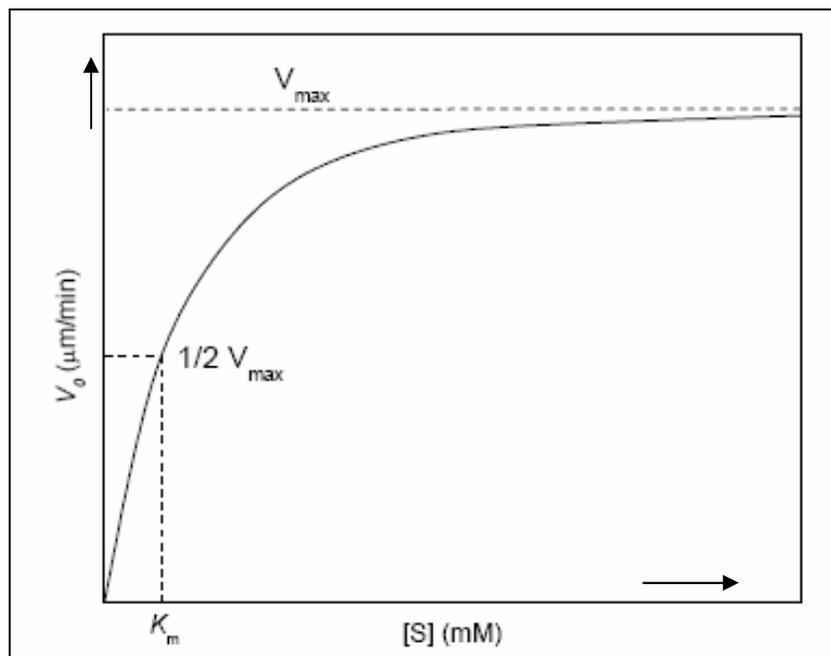
A teoria da cinética enzimática para sistemas com um único substrato foi desenvolvida em 1913 por Michaelis e Menten, cujas fotos estão ilustradas na Figura 2.13.



**Figura 2.13**– Fotografias de Leonor Michaelis e Maud Menten.<sup>34</sup>

O estudo da velocidade da reação é uma das maneiras de se compreender a bioquímica das reações catalisadas pelas enzimas. A velocidade da reação sofre forte influência da concentração do substrato. Entretanto, estudar os efeitos da concentração do substrato [S] é complicado devido ao fato deste variar durante o curso da reação, enquanto o substrato se transforma em produto. Uma abordagem simplificada para o estudo da cinética de uma reação enzimática é medir a velocidade inicial  $V_0$  quando [S] é muito maior que a concentração da enzima [E]. Assim sendo, para um tempo curto, as variações de [S] serão desprezíveis. A Figura 2.14 mostra o efeito de [S] sobre  $V_0$ . O aumento de  $V_0$  é aproximadamente linear para baixas concentrações de substrato. A medida que [S] cresce,  $V_0$  cresce a taxas cada vez menores,

até alcançar um valor de [S] em que não existe variação significativa no valor de  $V_0$ . Este valor de  $V_0$  é muito próximo da velocidade máxima,  $V_{\text{máx}}$ .



**Figura 2.14-** Efeito da concentração de substrato na cinética enzimática.<sup>35</sup>

O complexo ES formado, desempenha um papel fundamental para a compreensão do comportamento cinético da reação. Michaelis e Maud Menten postularam que a ação enzimática se dá em etapas, se iniciando pela rápida formação de um complexo reversível enzima-substrato:



A quebra do complexo ES liberando a enzima livre e o produto P, se dá em uma segunda etapa mais lenta, que é representada pela reação:



A velocidade da reação enzimática é limitada pela segunda reação, uma vez que esta ocorre mais lentamente. Sendo assim, a velocidade da reação deve ser proporcional a [ES]. A relação entre [S] e  $V_0$  possui a mesma forma geral para todas as enzimas.

Segundo Michaelis e Menten a forma matemática desta relação, foi descrita considerando a hipótese básica de que, no estado estacionário, a velocidade da reação é limitada pela quebra do complexo ES. Esta relação, denominada equação de Michaelis-Menten, é a equação da velocidade de uma reação enzimática com um único substrato, e é dada pela relação a seguir:

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{k_m + [S]} \quad (2.3)$$

onde  $k_m$  é denominada constante de Michaelis-Menten sendo expressa por:

$$k_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (2.4)$$

A velocidade inicial  $V_0$ , a velocidade máxima  $V_{máx}$ , e a concentração do substrato [S], estão relacionados pela constante de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis,  $K_m$ , é então definida como a concentração do substrato em que, a uma dada concentração de uma enzima, produz a metade de sua velocidade máxima. Esta constante  $k_m$  permite a avaliação da afinidade de uma enzima por um substrato.

$$V_0 = \frac{V_{máx}}{2} \quad (2.5)$$

Ao substituir a Equação 2.5 na equação de Michaelis-Menten e dividindo por  $V_{máx}$ , obtemos:

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{k_m + [S]} \quad (2.6)$$

Chega-se à conclusão que:

$$k_m = [S] \quad (2.7)$$

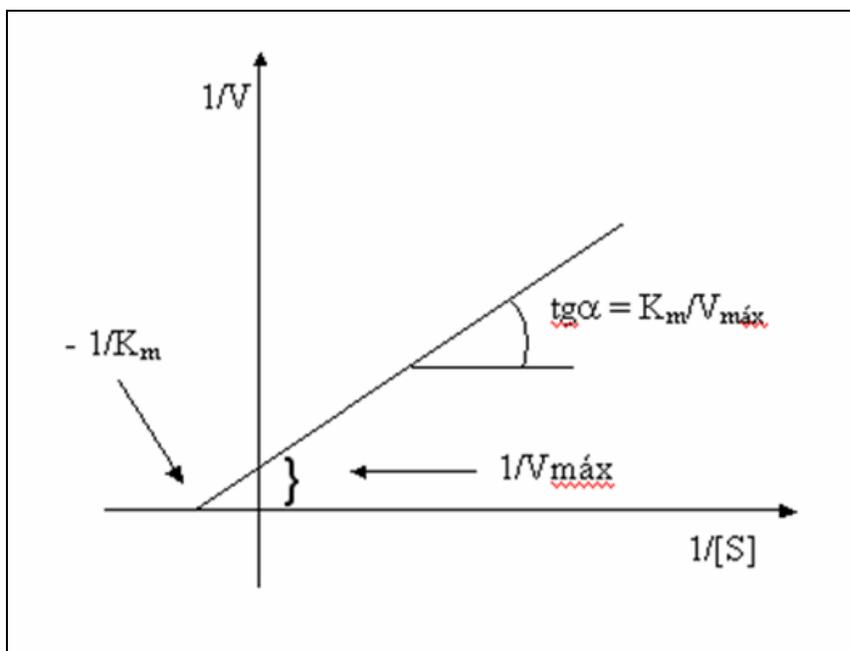
Deste modo,  $K_m$  pode ser definido como sendo a concentração de substrato quando  $V_0$  equivale a  $1/2 V_{máx}$ . Logo, a equação de Michaelis-Menten pode ser linearizada matematicamente, de modo a permitir a determinação experimental de  $k_m$  e  $V_{máx}$  através de métodos gráficos. Uma simples transformação é a inversão da equação, da seguinte forma:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m + [S]}{V_{máx} [S]} \quad (2.8)$$

A partir de transformações matemáticas simples, esta equação pode ser descrita da seguinte forma:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{máx}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}} \quad (2.9)$$

A equação de Lineweaver-Burk é obtida através da linearização da equação de Michaelis-Menten que permite obter experimentalmente os valores de  $k_m$  e  $V_{máx}$ , através de uma curva  $1/V_0$  versus  $1/[S]$ , como ilustrado na Figura 2.15.



**Figura 2.15-** Linearização da equação de Michaelis-Menten por Lineweaver-Burk.

Em biossensores amperométricos pode-se escrever a equação eletroquímica de Michaelis-Menten como a relação entre a concentração de substrato e a corrente emitida, obtendo-se assim o valor de concentração do hemometabólito a ser analisado.

A velocidade da reação enzimática pode ser reduzida pela desnaturação da enzima, que consiste, para as enzimas globulares, no desenovelamento da cadeia polipeptídica, causando sua perda de atividade. A temperatura, o grau de acidez, a concentração de sais e outros fatores ambientais podem afetar a estrutura espacial das proteínas, fazendo com que as moléculas se desenrolem e percam sua configuração original.

No projeto de biossensores, é importante encontrar um método adequado de imobilização para que se tenha alta atividade enzimática e melhor estabilidade, evitando o processo de desnaturação. Ao mesmo tempo, matrizes poliméricas com elevado grau de funcionalidade tem despertado a atenção de inúmeros pesquisadores.

De acordo com a literatura, os polímeros sintéticos constituem a classe mais importante de materiais utilizados no desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas. É fato conhecido, que os polímeros são ricos em grupos funcionais que podem ser convenientemente ativados para o processo de imobilização.

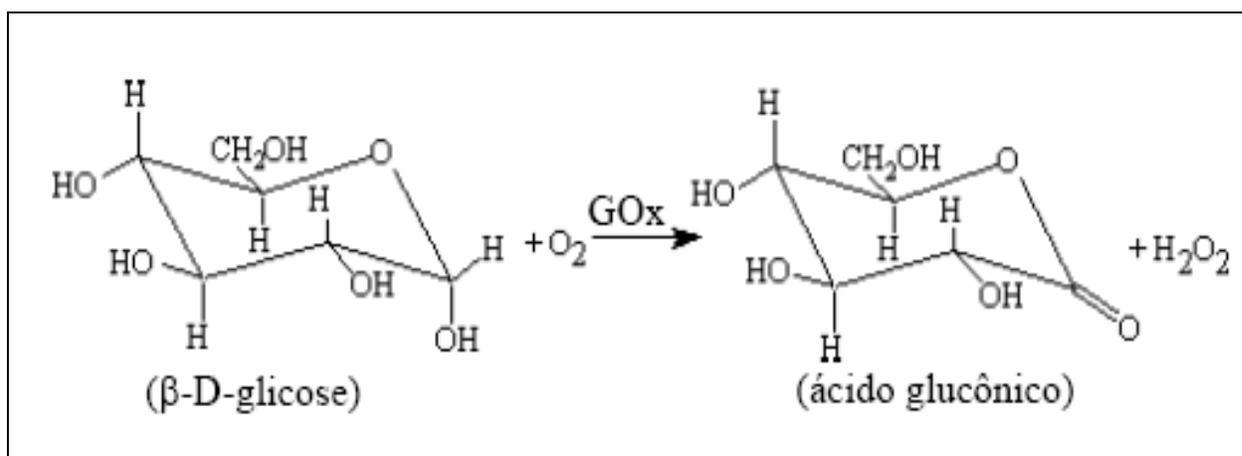
Neste trabalho, é de particular interesse a utilização de dendrímeros, uma nova classe de materiais poliméricos, no desenvolvimento de biossensores de hemometabólitos tais como glicose, colesterol e uréia. As propriedades biomiméticas e a elevada densidade de grupos funcionais na periferia fazem dessa macromolécula um atraente sistema para o projeto de biossensores.

## 2.9- Aplicações das enzimas em biossensores

### 2.9.1- A enzima glicose oxidase (GOx)

A glicose oxidase é uma enzima que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose com formação de d-gluconolactona. A enzima contém um grupo prostético, a flavina adenina dinucleótido (FAD), que confere à proteína a capacidade para catalisar reações de oxidação-redução.

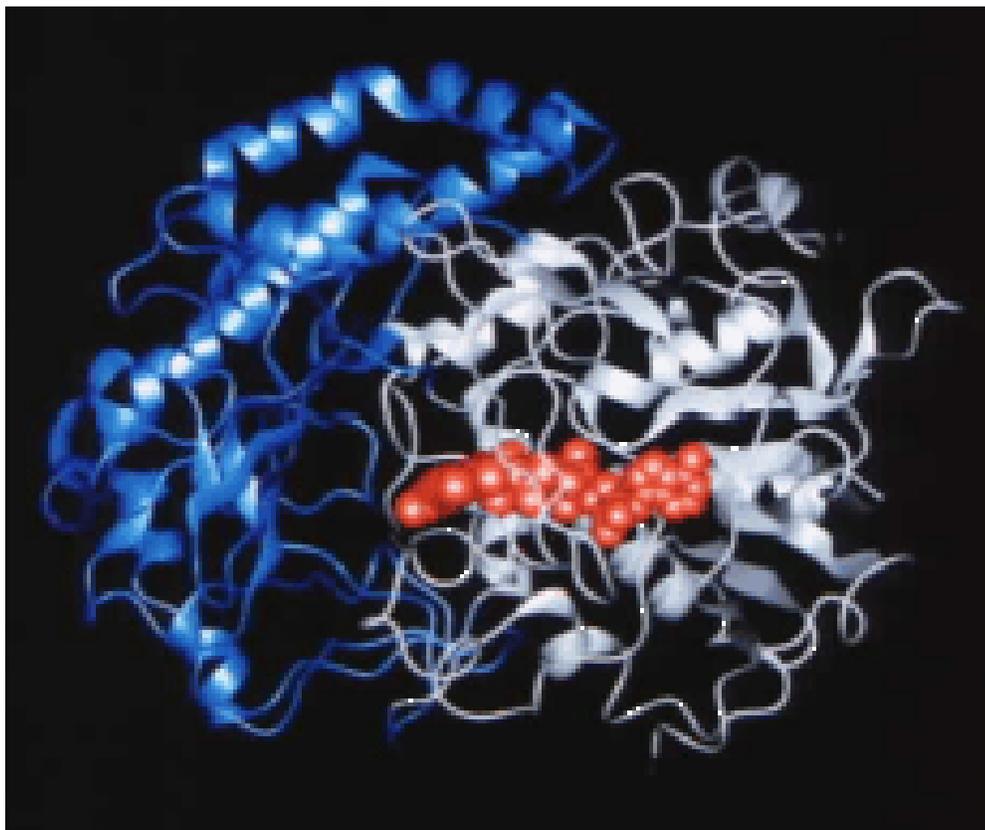
A reação dá-se em dois passos, no primeiro dos quais a coenzima oxidada sofre uma redução a  $FADH_2$ , que é acompanhada pela oxidação da  $\beta$ -D-glicose a d-gluconolactona. No segundo passo a flavina reoxida-se por ação de oxigênio, que, por sua vez, se converte em peróxido de hidrogênio (ver Figura 2.16).



**Figura 2.16-** Ilustração da reação catalisada pela enzima glicose oxidase.<sup>22</sup>

A atividade da glicose oxidase,<sup>36</sup> extraída do *Aspergillus niger* foi primeiramente relatada por Müller em 1922. A partir de então, esta enzima tem sido extraída e purificada desse fungo.<sup>37</sup>

A Figura 2.17 representa a simulação computacional da molécula GOx através de um modelo de fitas. Observa-se em vermelho o sítio ativo desta enzima, no qual a FAD está contida.



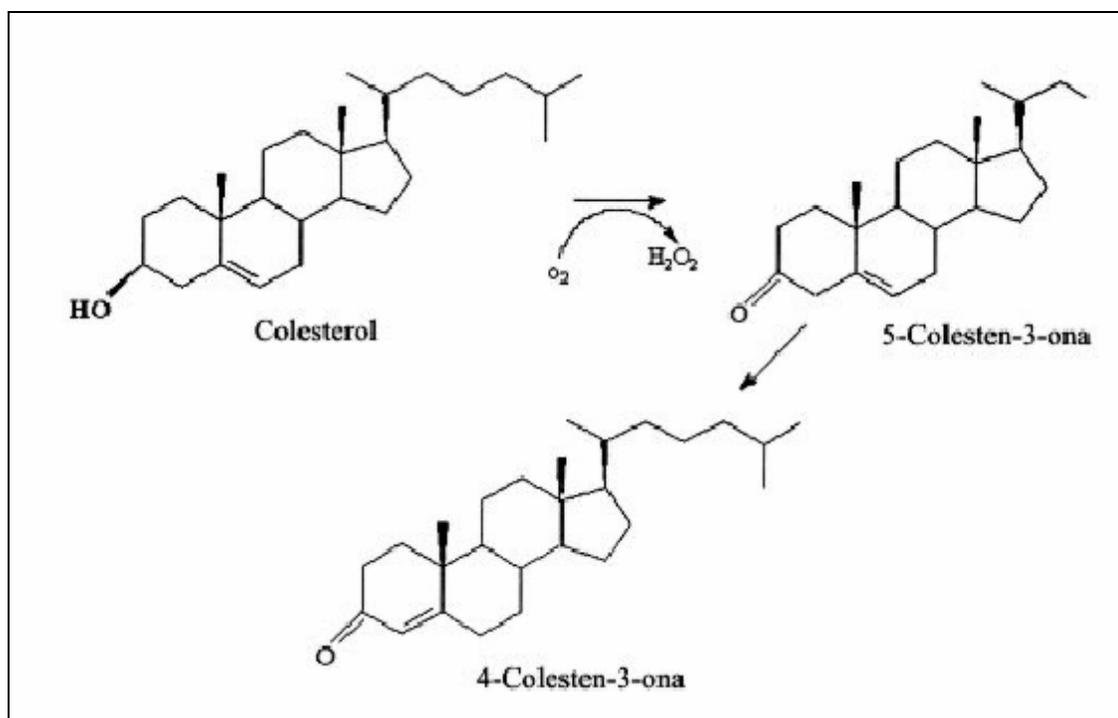
**Figura 2.17-** Ilustração da estrutura da enzima glicose oxidase, na forma de fitas. O FAD está representado pela região vermelha.<sup>38</sup>

Em virtude da sua elevada especificidade, a glicose oxidase, é utilizada como elemento biocatalítico para se medir os níveis de açúcar no sangue, seja através de testes colorimétricos ou sensoriais.<sup>25-39</sup>

### 2.2.2- A enzima colesterol oxidase (COx)

Turfitt, em 1994, foi o primeiro a isolar a enzima, a partir do micróbio *Nacordia erythropolis* e demonstrar seu efeito na oxidação do colesterol.<sup>40</sup> Desde então, a enzima foi encontrada e isolada a partir de um grande número de microorganismos, em especial a partir da *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nacordia erythropolis*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus sp.*, entre outros. Alguns microorganismos estocam a enzima em membranas intracelulares, enquanto outros a dispersam em seu meio de cultivo.

Cerca de 70% do colesterol existente no plasma sanguíneo se encontra na forma esterificada. Assim, o procedimento típico para determinação do colesterol total geralmente se inicia pela quebra dos ésteres de colesterol pela enzima colesterol estearase, produzindo colesterol livre e ácidos graxos. As moléculas de colesterol podem então sofrer a ação da enzima colesterol oxidase, produzindo 4-colesten-3-ona e peróxido de hidrogênio, como ilustrado na Figura 2.18.<sup>40</sup>



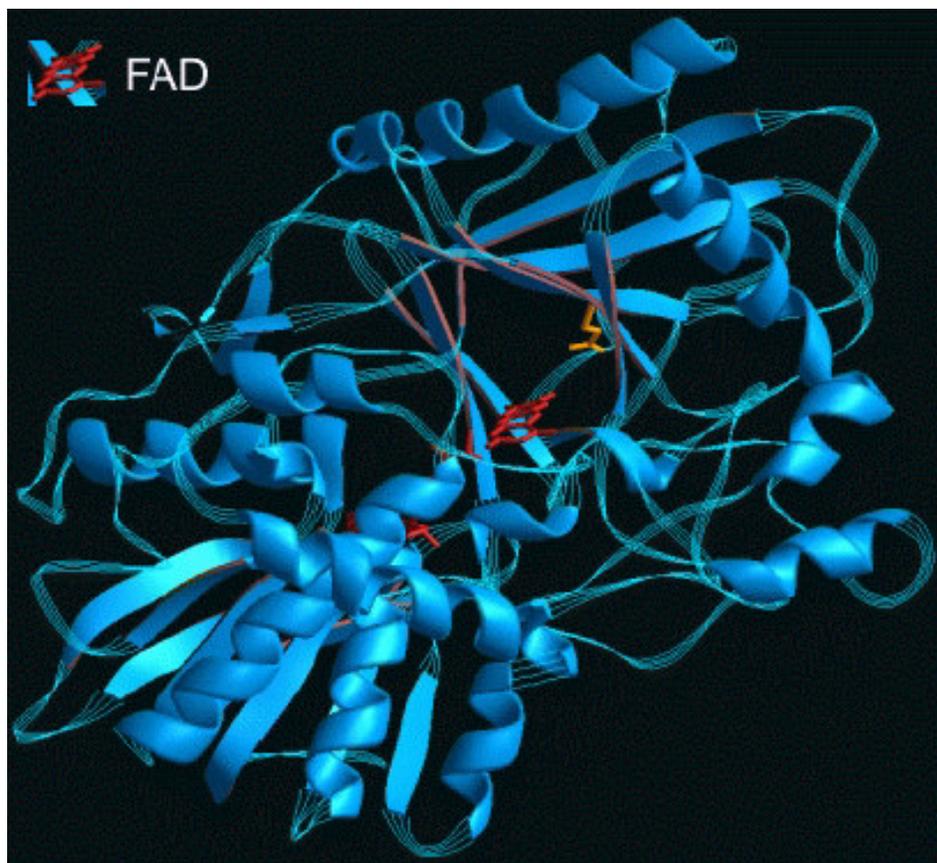
**Figura 2.18-** Ilustração da reação catalisada pela enzima colesterol oxidase.<sup>35</sup>

A colesterol oxidase (COx) pode ser sintetizada através de uma grande variedade de microorganismos, em ambientes completamente distintos. Algumas linhagens de microorganismos são capazes de promover a oxidação do colesterol a taxas superiores a 70%.

O custo da enzima colesterol oxidase se mantém relativamente alto devido, principalmente, à baixa produtividade dos microorganismos e pela necessidade de adição de colesterol ao meio de cultura para induzir o aumento da produção da enzima.

As propriedades físicas da COx variam de acordo com o microorganismo de origem. Em geral a atividade da COx é ótima à temperatura de 37 °C e pH neutro em solução aquosa. Dependendo da origem, a COx pode apresentar melhor estabilidade térmica e atividade ótima em intervalos de pH entre 4 e 10.

A COx é uma macromolécula de alto peso molecular, em torno de 60 kDa, com um pequeno centro ativo localizado nas proximidades do centro da estrutura. O centro ativo contém um cofator, que é um colaborador não protéico necessário para a atividade enzimática. Na COx o cofator é constituído por Flavina Adenina Dinucleótideo (FAD). A estrutura da COx é apresentada pela Figura 2.19.



**Figura 2.19-** Ilustração da estrutura da enzima colesterol oxidase, na forma de fitas.<sup>38</sup>

### 2.2.3- A enzima urease

A enzima foi primeiramente isolada na forma cristalina, mas isto foi compreendido melhor quando Summer em 1926 isolou urease de feijão e evidenciou que estes cristais consistem em proteínas.

A Uréia, principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, tem sua concentração sérica afetada pela dieta e pelo estado de hidratação, constituindo uma indicação grosseira do estado da função renal. A urease é um enzima que catalisa a hidrólise da uréia em dióxido de carbono e amônia. A reação é apresentada a seguir:

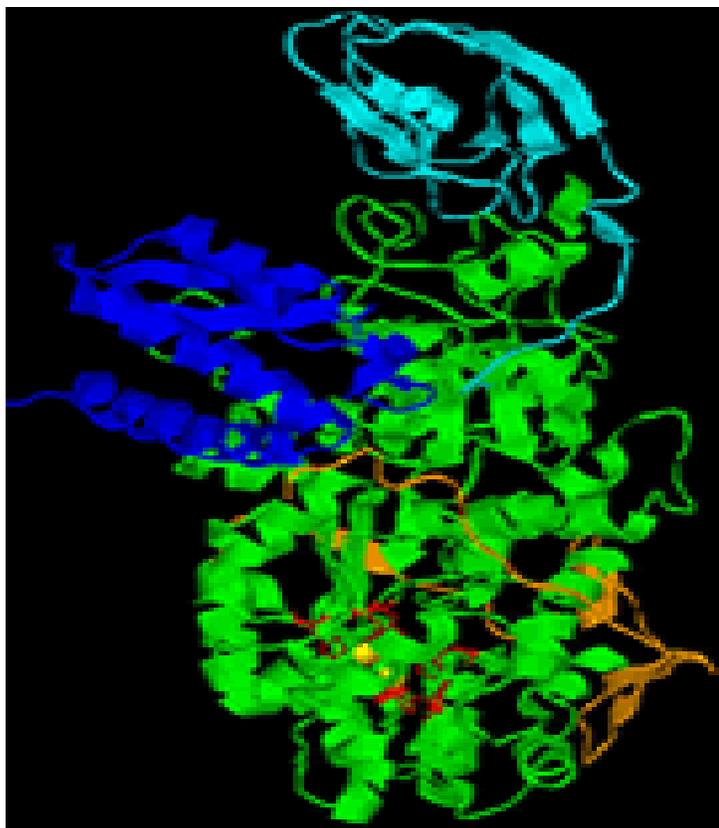


Os valores aumentados da uréia plasmática são classificados como:

- (i) Causa pré-renal, resultante de defeitos de excreção observado na descompensação cardíaca, choque hemorrágico, desidratação aguda, catabolismo protéico elevado (queimaduras, febre).
- (ii) Causa renal, como consequência de doença renal aguda ou crônica (glomerulonefrite, pielonefrite, necrose tubular) com diminuição da filtração glomerular podendo ser observado níveis plasmáticos de uréia de 300 mg/dL ou mais.
- (iii) Causa pós-renal, geralmente resultante de uma obstrução do trato urinário, pode ocorrer nas litíases renais, nos tumores por compressão da bexiga.

A diminuição da uréia sérica, ocorre apenas em poucas situações, como na insuficiência hepática aguda, na inanição, no último trimestre da gravidez.

Ureases (EC 3.5.1.5) catalisam a reação de hidrólise da uréia à duas moléculas de amônia e dióxido de carbono. As ureases vegetais são hexâmeros ou trímeros de uma subunidade de aproximadamente 90 kDa, com 2 átomos de níquel por subunidade. A Figura 2.20 ilustra a estrutura da enzima urease na forma de fitas.



**Figura 2.20-** Ilustração da estrutura da enzima urease na forma de fitas.<sup>38</sup>

É fato conhecido que as enzimas reduzem significativamente a barreira energética de uma reação, porém, sua utilização na forma pura muitas das vezes inviabiliza o processo dado seu elevado custo. Sendo assim, a opção pode ser a imobilização da enzima em suportes insolúveis, o que possibilita sua reutilização várias vezes. A reutilização de biocatalizadores reduz significativamente o custo do processo.

Em meio século de pesquisas e desenvolvimento de processos tecnológicos, várias técnicas foram desenvolvidas para a imobilização de enzimas. O objetivo de um processo de imobilização é reduzir o custo da enzima viabilizando o processo tecnológico e aumentar a estabilidade frente às flutuações de temperatura no processo.

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor, em 1962, diversos outros foram construídos utilizando diferentes enzimas e procedimentos de imobilização. Apresentam características importantes, tais como seletividade, baixo custo e facilidade na construção, potencial para miniaturização, resposta rápida, potencial de automação e construção de equipamentos simples e portáteis.<sup>1</sup>

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar a estabilidade, reduzir custos e aumentar, em alguns casos, a atividade enzimática. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização.<sup>2-9</sup>

## **2.10- Considerações parciais**

A elevada aplicabilidade da atividade enzimática acrescida à sua eficiência catalítica e especificidade, permitem sua aplicação em processos analíticos da medicina clínica.

Atualmente, o número de enzimas conhecidas e caracterizadas quimicamente se aproxima do valor de 2000. Porém o número de enzimas que são produzidas e aplicadas industrialmente em grandes quantidades, não ultrapassa mais de duas dezenas. Sendo assim, torna-se necessário um estudo avançado das enzimas e suas condições ótimas de atuação.

Em vista do exposto, conclui-se que a estrutura química íntegra das proteínas com atividade catalítica é determinante para a atuação dos biocatalizadores. Porém, fatores externos que alteram a conformação protéica, e, portanto, a velocidade das reações enzimáticas permitem a modulação das reações metabólicas dos seres vivos.

No processo de desenvolvimento de biossensores, a decisão pelo melhor método de imobilização está diretamente ligada à performance do biossensor. Quanto maior for a atividade enzimática após a imobilização, maior será a estabilidade e a sensibilidade do biossensor. A escolha do suporte para imobilização do biocatalizador constitui em uma tarefa importante para o desenvolvimento do dispositivo clínico.

O desenvolvimento de sistemas macromoleculares que possam funcionar como nanoplataformas para a imobilização de enzimas desempenha um papel importante no presente século. Os sistemas macromoleculares arborescentes têm atraído a atenção de importantes grupos de pesquisa mundiais. O próximo capítulo desta dissertação aborda algumas propriedades de tais sistemas.

## 2.11- Referências

- [1] BROCK, T. *Biology of Microorganisms*. **Pretice-Hall Inc. Industrial Microbiology**, cap.12, 1997.
- [2] STRYER, L.; BERG, M.J.; TYMOCZKO, L.J. *Bioquímica*. Guanabara Koogan, 2002.
- [3] LEHNINGER, L.A. *Bioquímica 1*. Edgar Blücher, 1976.
- [4] **Enzyme Nomenclature**. Disponível em < <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>> Acessado em 22 mar. 2008.
- [5] FERSHT, A. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2 ed. New York: W.H. Freeman e Company, 1985, p. 50-52.
- [6] **Cinética enzimática**. Disponível em < [http://pt.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica\\_enzim%C3%A1tica](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cin%C3%A9tica_enzim%C3%A1tica)> Acessado em 22 mar. 2008.
- [7] FISCHER, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzym. **Ber. Dt. Chem. Ges**, n. 27, p. 2985–2993, 1984.
- [8] KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n. 44, p. 98–104, 1958.
- [9] VASELLA, A.; DAVIES, G.J.; BOHM, M. Glycosidase mechanisms. **Curr Opin Chem Biol.**, n. 6, p. 619–629, 2002.
- [10] BOYER, R. *Concepts in Biochemistry*, 2 ed., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, 2002, p. 137–138.

- [11] FERREIRA, J. P. M. Segredos da Catalise enzimática. **Boletim de Biotecnologia**. Universidade Católica Portuguesa, Porto. p. 22-29.
- [12] **Classificação das Enzimas**. Disponível em < [http://www.geocities.com /bioquimicaplicada /enzimas9b.htm](http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/enzimas9b.htm)> Acessado em 04 abr. 2008.
- [13] DOMINGOS, J.B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V.G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, Set./Out. 2003.
- [14] NELSON, J.M.; GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. **J. Am. Chem. Soc.**, n. 38, p.1109-1115, 1916.
- [15] **Proteínas**. Disponível em <[www.maristabahia.com.br/prof/alvaro/prot/](http://www.maristabahia.com.br/prof/alvaro/prot/)> Acessado em 22 mar. 2008.
- [16] HOGGETT, J.G.; KELLET, G.L. Yeast hexokinase: substrate-induced association-dissociation reactions in the binding of glucose to hexokinase P-II, **Eur. J. Biochemical**, v. 66, p.65-77, 1976.
- [17] WILLIAMS, D.C.; JONES, J.G. Dissociation and catalysis in yeast hexokinase A, **Biochemical J.**, v. 155, p. 661-667, 1976.
- [18] THURLKILL, R.L.; GRIMSLEY, G.R.; SCHOLTZ, J.M., Hydrogen bonding markedly reduces the pK of buried carboxyl groups in proteins, **J Mol Biol**. v. 362, p. 594-604, 2006.
- [19] BIANCONI, M. L. **Efeito de pH na Atividade Enzimática**. Disponível em <<http://www.bioqmed.ufrj.br/enzimas/pH.htm>> Acessado em 22 mar. 2008.
- [20] ARROYO, M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicsciones. **Ars Pharm.**, n. 39, p. 23-39, 1998.
- [21] GERARD, M.; MALHOTRA, B.D. Application of polyaniline as enzyme based biosensor. **Cur. App. Phys.**, n. 5, p.174-77, 2005.
- [22] FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.
- [23] DAVE, B.C.; DUNN, B.; VALENTINE, J.S.; ZINK, J.I. Sol-gel encapsulation methods for biosensors. **Ana. Chem.**, n. 66, p. 1121-1127, 1994.
- [24] EFTEKHARI, A. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synt. met.**, n. 145, p. 211-216, 2004.

- [25] SUZUKI, H.; KUMAGAI, A. A disposable biosensor employing a glucose-sensitive biochemomechanical gel. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 18, 1289-1297, 2003.
- [26] GHOBADI et al. Bienzyme carbon paste electrodes for L-glutamate determination. **Cur. Sep.**, n. 14, 1996.
- [27] MASUDA et al. Fabrication of Pt microporous electrodes from anodic porous alumina and immobilization of GOD into their micropores. **J. Electroan. Chem.**, n.368, p. 333-336, 1994.
- [28] YANG, X.; HUA, L.; GONG, H.; TAN, S.N. Covalent immobilization of an enzyme (glucose oxidase) onto a carbon sol-gel silicate composite surface as a biosensing platform. **An. Chim.**, n. 478, p.67-75, 2003.
- [29] YING, L.; KANG, E.T.; NEOH, K.G. Covalent immobilization of glucose oxidase on microporous membranes prepared from poly (vinylidene fluoride) with grafted poly (acrylic acid) side chains. **J. Membr. Sci.**, n. 208, p. 361-374, 2002.
- [30] TROJANOWICZ et al. Biosensors base don oxidases immobilized in various conducting polymers. **Sen. Act.**, n. 28, p. 191-99, 1995.
- [31] ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Prog. Polym. Sci.**, n. 29, p. 699-766, 2004.
- [32] FURICO JUNIOR, A. **Enzima e suas aplicações: cinética enzimática**. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2001.
- [33] KIELING, D.D. **Enzimas: Aspectos gerais**. Universidade Federal de Santa Catarina - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2002.
- [34] CORNISH, A. Two Centuries of Catalysis. **Journal of Biosciences**, v. 23, p. 87-92, 1998.
- [35] MARTINS, M. **Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/ftalocianina**. 2006. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.
- [36] TAQUEDA, M. E.; CONVERTI, A.; VIOTOLO, M.; PESSOA JUNIOR, A. Purification of glucose Oxidase from *Aspergillus niger* by Liquid-Liquid Cationic Reversed Micelles Extraction. **Biotechnology Progress**, n. 21, p. 868-874, 2005.
- [37] MIRON, J.; GONZÁLES, M. P.; PASTRANA, L.; MURADO, M. A. Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture a dynamic model. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 31, p. 615-620, 2002.

[38] Disponível em <<http://www.biochem.szote.u-szeged.hu/astrojan/prot1t.htm>>. Acessado em 20 fev. 2008.

[39] TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**, n. 6, p. 24-27, 1969.

[40] MACLACHALAN, J. WOTHERSPOON, A. T. L.; ANSELL, R. O.; BROOKS, C. J. W. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. **Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology**. n.72, p.169-195, 2000.

## Capítulo 3- Plataformas nanoestruturadas

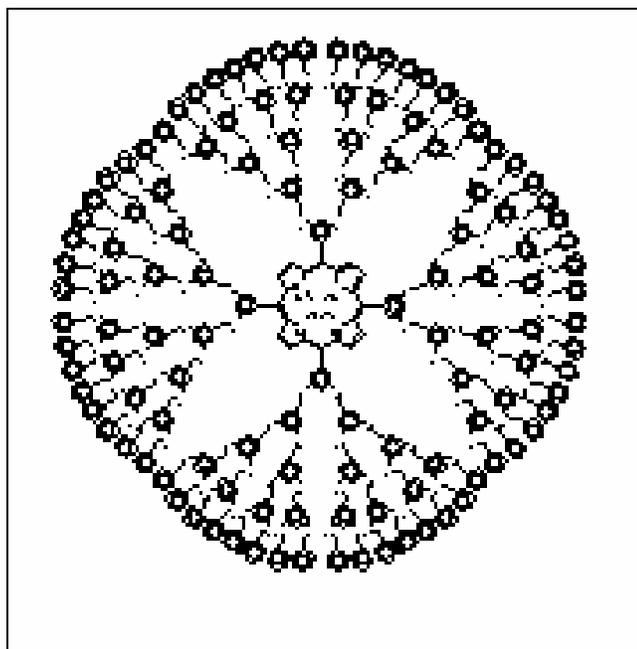
---

### 3.1– O desenvolvimento dos dendrímeros

Dendrímeros são macromoléculas monodispersas, altamente ramificadas, apresentando estruturas bem definidas e um peso molecular uniforme. Esta classe de compostos tem recebido grande atenção dos pesquisadores nestes últimos anos devido à particularidade de suas propriedades físicas e químicas.<sup>1-2</sup>

Os dendrímeros eram originalmente conhecidos como moléculas cascata, nas duas últimas décadas houve uma grande evolução na química dos dendrímeros, mas a grande evolução deu-se nos anos 90. Hoje já existe uma grande variedade de dendrímeros, tanto em números de núcleos iniciadores, ou seja, a molécula central ou o núcleo do dendrímero, como nos ramos e bem como as unidades finais.

O termo dendrímero, deriva do grego “dendron” (árvore) e “meros” (parte ou fração). Descreve uma arquitetura de uma nova classe de moléculas; estas fundamentalmente são formadas por um núcleo que é uma molécula à qual se liga os ramos. Estas moléculas são altamente ramificadas, mas são também altamente simétricas, em gerações muito altas, a partir da quarta geração especialmente, elas tendem a ter uma estrutura em forma de uma esfera, devido às interações entre as cadeias (Figura 3.1).



**Figura 3.1-** Ilustração estrutural de um dendrímero GnPZn, n=4 (quarta geração).<sup>3</sup>

Os dendrímeros são caracterizados por estruturas quase esféricas, tamanhos nanométricos, grande número de subgrupos funcionais reativos e espaços interiores protegidos. Esta combinação única de propriedades torna-os perfeitos para aplicações em diferentes áreas da química e medicina.

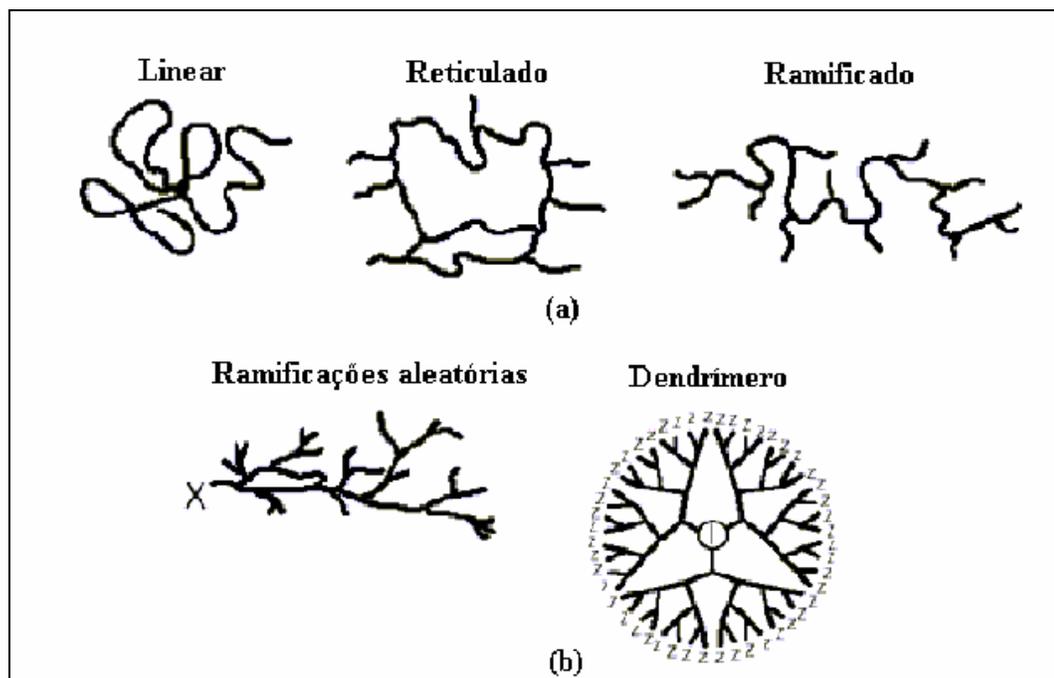
Essas macromoléculas tridimensionais possuem pontos de ramificação em cada unidade monomérica que são capazes de reproduzir estruturas com definidos números de gerações e grupos funcionais terminais. Elas apresentam, ainda, elevado controle do peso molecular e da forma, o que proporciona a síntese de micelas unimoleculares.

Os dendrímeros são fundamentados na aplicação de progressões matemáticas para a síntese orgânica e, como tais, possuem uma topologia molecular bem definida.

Conhecidos como polímeros altamente ramificados, os dendrímeros diferenciam-se dos polímeros normais devido às suas ramificações serem altamente regulares e a macromolécula ser bastante simétrica.

A Figura 3.2 ilustra uma comparação entre a estrutura de polímeros clássicos e a estrutura de um dendrímero. Pela figura percebe-se que os dendrímeros possuem uma estrutura bem definida com um alto grau de simetria e altamente organizada, apresentam um núcleo central e possuem muitos grupos funcionais periféricos. Além disso, são macromoléculas sintéticas,

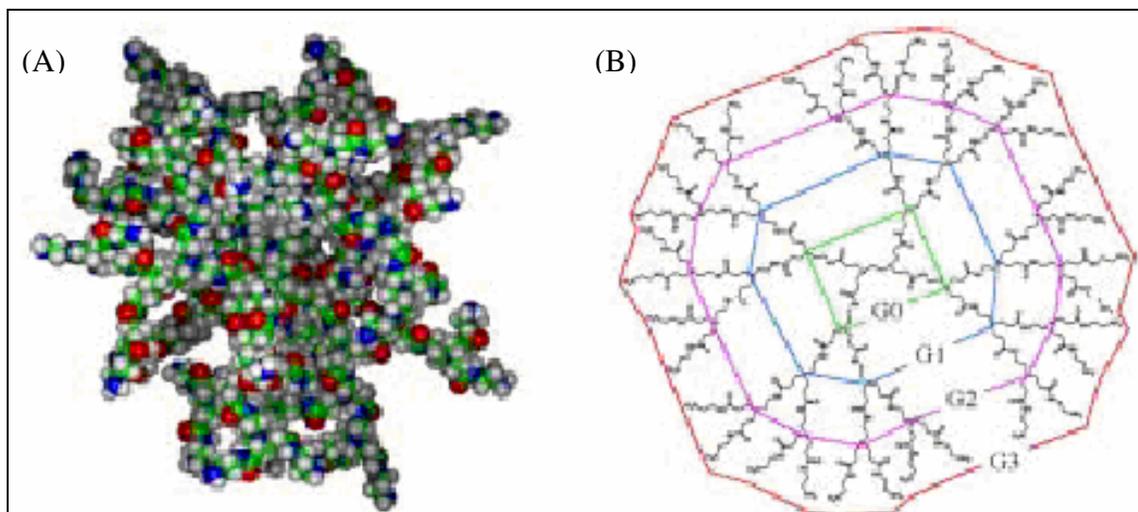
monodispersas, com elevado peso molecular, elevada área superficial e tamanho nanométrico, ao contrário dos polímeros lineares. Este tipo de molécula possui superfícies e interfaces altamente controladas e apresenta cavidades internas, o que permite, por exemplo, o encapsulamento de moléculas hospedeiras bioativas.<sup>4-5</sup>



**Figura 3.2**– (a) Estruturas poliméricas clássicas. (b) Estruturas dendríticas.<sup>6</sup>

O processo de polimerização clássico, o qual resulta em polímeros lineares, é usualmente randômico em natureza e produz moléculas com um elevado índice de polidispersão, enquanto o tamanho e a massa molecular dos dendrímeros podem ser especificamente controlados durante a síntese.

Estas moléculas crescem a partir de um núcleo (designado Geração 0) e cada conjunto de unidades monoméricas adicionadas são designadas por Geração (Figura 3.3). Esta adição torna cada geração mais ramificada que a anterior até se obter uma estrutura globular e densa.

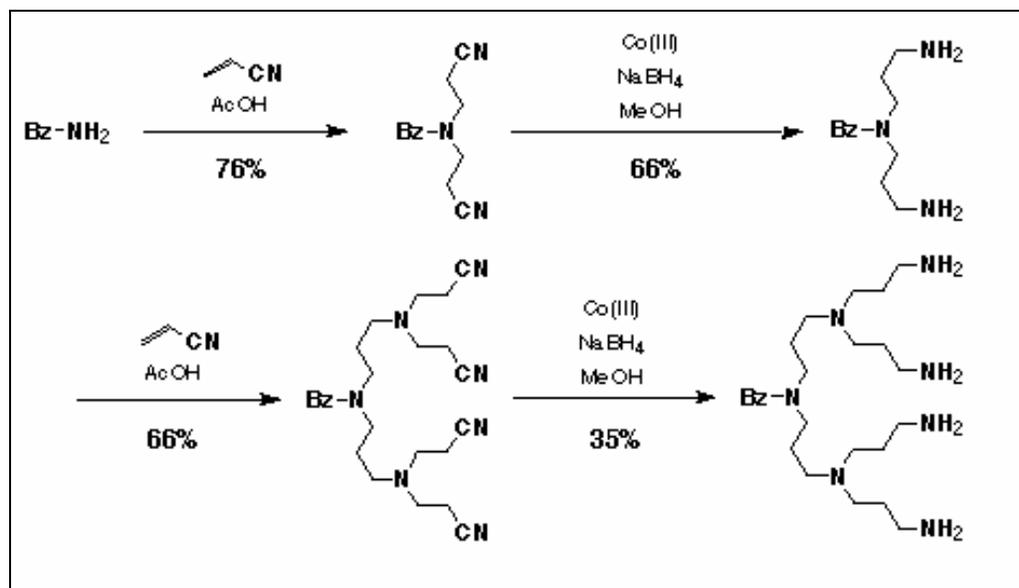


**Figura 3.3-** Esquemática do crescimento em gerações do dendrímero PAMAM.<sup>7</sup>

Com a introdução de novos domínios científicos, no entendimento da topologia molecular e orientação de grupos funcionais, é possível estabelecer esforços no sentido de atuar em dois extremos da síntese orgânica. O estudo da química supramolecular, e, em particular a química dendrímica, podendo constituir um método útil na resolução de novos problemas sintéticos.<sup>8-9</sup>

### 3.2- Histórico sobre a Síntese dos Primeiros Dendrímeros

A primeira tentativa de síntese de dendrímeros foi feita por Vögtle em 1978, que aplicou este conceito na síntese de amins com baixo peso molecular.<sup>10-11-12</sup> Na síntese é utilizada exaustivamente a adição tipo Michael, seguida de uma redução dos grupos nitrilos a amins primárias, como é apresentada na Figura 3.4.



**Figura 3.4-** Primeira tentativa de síntese de um dendrímero pela rota divergente.<sup>13</sup>

No entanto, esta síntese encontrou problemas na redução dos grupos nitrilos. Assim o processo só podia ser repetido duas vezes, por isso só dava aminas dissubstituídas, e o rendimento era muito baixo.

Tomalia sintetizou pela primeira vez dendrímeros<sup>14</sup>, acidentalmente, quando em seu laboratório com os colaboradores sintetizava, através de um processo padrão, polímeros de cadeias lineares chamados poliamidoaminas, em que um certo dia adicionou metanol aos reagentes iniciais, embora que pelo processo tradicional não seja requerido, com o objetivo de facilitar a agitação da mistura reacional. Mas Tomalia não estava à espera que o metanol alterasse as substâncias nesta reação quimicamente. O resto do processo de polimerização foi igual, introduzindo na mistura os dois monômeros: o acrilato de metila e o etileno diamina.

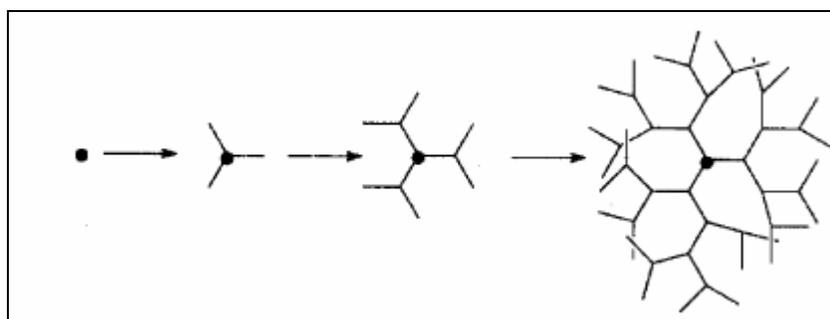
Normalmente os dois monômeros formam cadeias longas, ligando-se entre eles na razão de um para um, mas a molécula formada naquele dia, não era linear e consistia na ligação de dois grupos acrilato de metila a um de etileno diamina. Neste caso o metanol afetou a reação, aparentemente, facilitou a remoção dos hidrogênios dos átomos de azoto no etileno diamina e permitiu o acrilato de metila se ligar aos azotos.

Tomalia imaginou então um sistema molecular que crescia com resultado em grandes estruturas simétricas construídas por etapas. Ou seja, o dendrímero era construído por um núcleo

iniciador, e que se juntava a uma segunda molécula linear, produzindo assim os ramos do dendrímero.<sup>15</sup>

Esta básica aproximação teve resultado na criação de uma nova classe de arquitetura polimérica, os monômeros. Estes, por sua vez, estão ligados entre eles e os ramos ligados concentricamente a uma simples molécula (núcleo iniciador), criando assim, uma estrutura em três dimensões, que em gerações muito altas, devido às interações entre os ramos, podem ser esféricas.

A partir desta primeira síntese acidental, Tomalia ajustou as propriedades de síntese, usando duas operações repetidamente, utilizando como núcleo iniciador uma molécula de amônia. A esta molécula de amônia foi adicionado metanol suficiente para facilitar a substituição dos hidrogênios da amônia pelo acrilato de metila, e assim criar um dendrímero de geração zero. Em seguida adicionou-se o segundo monômero, que é respectivamente etileno diamina, que ataca livremente as três moléculas do monômero adicionado anteriormente, obtendo-se assim o dendrímero de 1ª geração. Depois os dois hidrogênios do azoto do etileno diamina são substituídos novamente pelo acrilato de metila, obtendo-se um dendrímero de 2ª geração. E assim sucessivamente até se obter o dendrímero pretendido, ou de geração pretendida, como mostra a Figura 3.5.



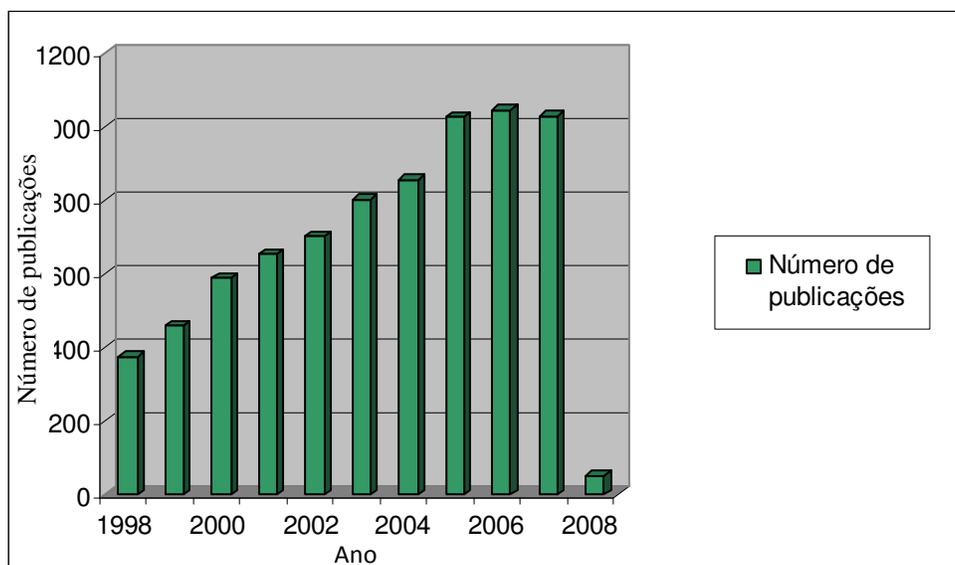
**Figura 3.5-** Representação esquemática do crescimento dendrimérico pela rota divergente.<sup>16</sup>

A partir da divulgação da síntese deste dendrímero, apareceram muitos outros investigadores a publicar trabalhos a cerca da síntese deste novo tipo de molécula.

A uniformidade molecular dos dendrímeros, a sua superfície multifuncional, bem como a presença de cavidades internas, fazem dessas macromoléculas sistemas interessantes para uma vasta área de aplicações.<sup>17-18</sup>

Macromoléculas com estrutura dendrítica são sistemas isomoleculares cuja estrutura tridimensional tem atraído a atenção de muitos grupos de pesquisa com relação ao projeto de biossensores para aplicações clínicas como pode ser visto pela Figura 3.6.

A estrutura mimetizante de proteínas globulares bem como sua elevada área superficial tornam os dendrímeros sistemas macromoleculares atraentes para o projeto de biossensores enzimáticos. Enzimas imobilizadas em superfícies dendriméricas possuem um alto grau de orientação em relação à matriz polimérica na qual o dendrímero será ligado, possibilitando a exposição de um maior número de sítios ativos na superfície do polímero conjugado.



**Figura 3.6-** Número de publicações na área de dendrímeros nos últimos dez anos. Fonte: Scielo.

### 3.3- Os dendrímeros e suas propriedades<sup>1-19</sup>

Devido à sua arquitetura molecular, os dendrímeros apresentam uma melhora significativa em suas propriedades físicas e químicas quando comparados aos polímeros lineares tradicionais.

Dentre as propriedades dos dendrímeros, podemos mencionar as que mais se evidenciam;

(i) Em solução, os polímeros de cadeias lineares são flexíveis enquanto que os dendrímeros formam esferas concêntricas.

(ii) Soluções de dendrímeros possuem uma viscosidade significativamente menor que os polímeros lineares e, esta, é uma das propriedades mais importantes dessas macromoléculas. A viscosidade aumenta com o aumento do número de monômeros, mas a partir de uma certa

geração (em geral, a partir da geração 4), a viscosidade volta a diminuir, de tal forma que os dendrímeros de geração mais alta apresentam mais grupos terminais, porém menor viscosidade que os dendrímeros de geração mais baixa. Este comportamento é diferente dos polímeros lineares. Afinal, para polímeros clássicos a viscosidade intrínseca aumenta continuamente com a massa molecular.

(iii) O número de grupos funcionais na superfície da macromolécula determina a geração do dendrímero.

(iv) A presença de muitas cadeias terminais é responsável por uma alta solubilidade, micibilidade e reatividade dos dendrímeros. A sua solubilidade é fortemente influenciada pela natureza dos grupos da superfície. Os dendrímeros terminais em grupos hidrofílicos são solúveis em solventes polares enquanto os dendrímeros terminais com grupos hidrofóbicos são solúveis em solventes apolares.

(v) A massa molar,  $M$ , dos dendrímeros pode ser descrita pela seguinte relação matemática:

$$M = M_c + n_c \left[ M_m \left( \frac{n_m^G - 1}{n_m - 1} \right) + M_t n_m^G \right] \quad (3.1)$$

sendo  $M_c$  a massa molar do núcleo,  $M_m$  é a massa molar do monômero ramificado,  $M_t$  é a massa molar do grupo terminal,  $n_c$  é a multiplicidade do núcleo,  $n_m$  é a multiplicidade da ramificação e  $G$  é o número de geração.

(vi) O aumento do número de grupos terminais é descrito por uma progressão geométrica:

$$Z = n_c \cdot n_m^G \quad (3.2)$$

Sendo  $n_c$  a multiplicidade do núcleo,  $n_m$  é a multiplicidade da ramificação e  $G$  é o número de geração.

(vii) O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros muito importantes para a determinação e explicação do comportamento físico desses sistemas macromoleculares. Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente apresentam uma menor área superficial, o que é indesejável para o projeto de biossensores. Já as macromoléculas

de peso molecular muito elevado são pouco solúveis e, por isso, geralmente não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.

(viii) A capacidade de encapsulamento de moléculas na macromolécula interior é uma das propriedades únicas que os dendrímeros apresentam devido a sua forma globular e a presença de cavidades internas.

### 3.4– A síntese de macromoléculas dendríticas

A síntese de macromoléculas com estrutura dendrítica envolve uma reação de policondensação controlada que utiliza uma estratégia sintética repetitiva.<sup>20-21</sup> Desta maneira é possível um controle do peso molecular e do tamanho da macromolécula, o que produz polímeros isomoleculares.

A preparação de dendrímeros pode ser efetuada de duas maneiras distintas, seguindo uma rota divergente ou convergente de síntese.<sup>1-18-20</sup> Ambas as maneiras fornecem estruturas altamente simétricas, hiper-ramificação, elevado grau de funcionalização terminal e monodispersão.<sup>21-22</sup>

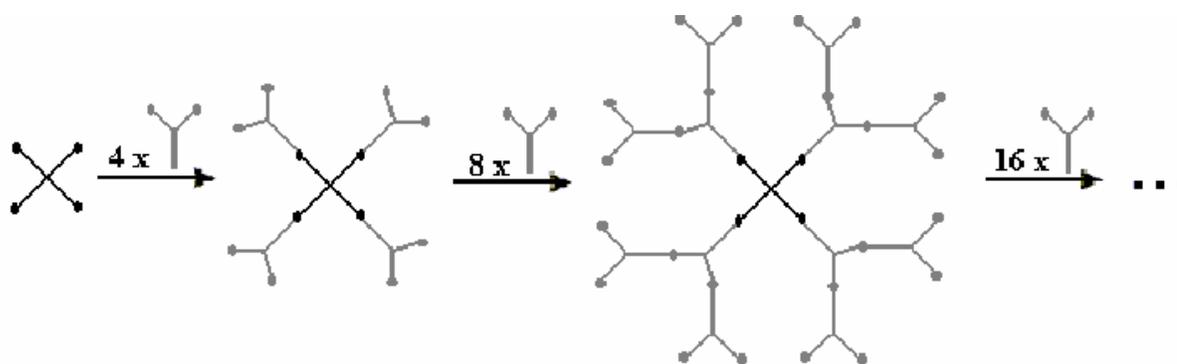
O método divergente envolve o crescimento a partir de um núcleo central, onde as ramificações são justapostas através de etapas sintéticas repetitivas. Este método é caracterizado por reações que ocorrem por um aumento do número de sítios reativos, como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora. O procedimento geral é ilustrado pela Figura 3.7.

O método de síntese divergente apresenta como principais inconvenientes as reações incompletas dos grupos terminais, que introduzem defeitos na macromolécula. Para impedir a formação de defeitos, normalmente se utilizam grandes quantidades de precursores, o que dificulta a purificação do produto final.<sup>23</sup>

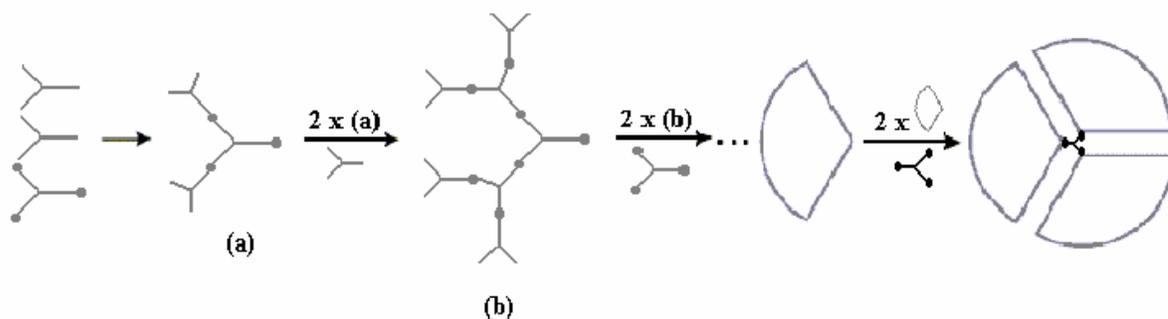
A síntese pelo método convergente principia pelo que gerará a superfície externa da macromolécula, ou seja, pelas ramificações. O princípio básico do método envolve a construção de pequenos fragmentos denominados dendrons que sofrem policondensação e constituem o núcleo central e que evoluem para a formação final do dendrímero. O método convergente é ilustrado a seguir pela Figura 3.8. O monômero de partida contém um grupo reativo de um lado da subunidade estrutural e um grupo terminal na outra extremidade formando, na geração final, a camada externa do dendrímero. Esse fragmento pode, então, reagir com grupos reativos da unidade de repetição, que também contêm sítios protegidos. Depois da conversão para um novo

grupo reativo a síntese pode ser continuada por reação com uma segunda unidade de repetição. A repetição do ciclo de reação leva à construção de grandes dendrons. A reação dos dendrons desprotegidos com grupos reativos de um núcleo terminal constitui o dendrímero final.<sup>19-24</sup>

Embora a formação de defeitos no dendrímero seja minimizada na rota sintética convergente e a purificação do produto final seja mais fácil relativamente à rota sintética divergente, o impedimento estérico, causado pelos grupos volumosos na periferia do dendrímero, impede a obtenção de sistemas de elevadas gerações.<sup>24</sup>



**Figura 3.7-** Representação esquemática de um dendrímero segundo o método divergente.<sup>1</sup>



**Figura 3.8-** Representação esquemática da síntese de um dendrímero pelo método convergente.<sup>1</sup>

### 3.5- Dendrímeros estudados neste trabalho: CHD, PGLD e PPID

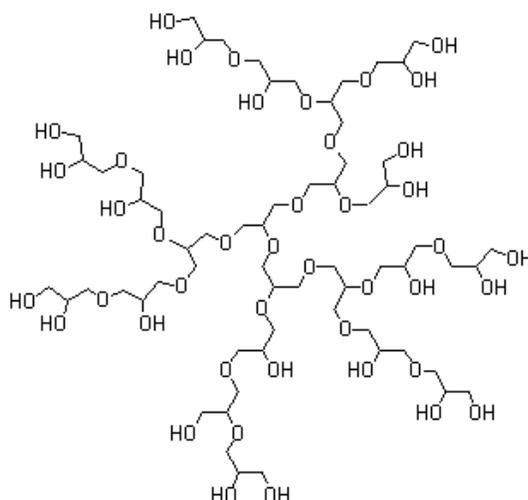
Os dendrímeros para que sejam considerados suportes ideais para utilização como biossensor, devem possuir características que não interfiram na atividade da enzima a ser imobilizada. A macromolécula dendrítica deve possuir alta funcionalidade, o que facilita o

procedimento de imobilização da enzima; baixo custo e possuir boas propriedades de biocompatibilidade. Estas características são atraentes devido ao fato que dendrímeros em escala nanométrica, frequentemente exibem propriedades físicas e químicas ideais para utilização como plataformas para a imobilização de biocatalizadores. Tais características podem influenciar significativamente na resposta do dispositivo sensor.

Neste trabalho, foram estudados três diferentes tipos de dendrímeros utilizados como nanoplatasformas para imobilização de enzimas a saber: PGLD, PPID e CHD.

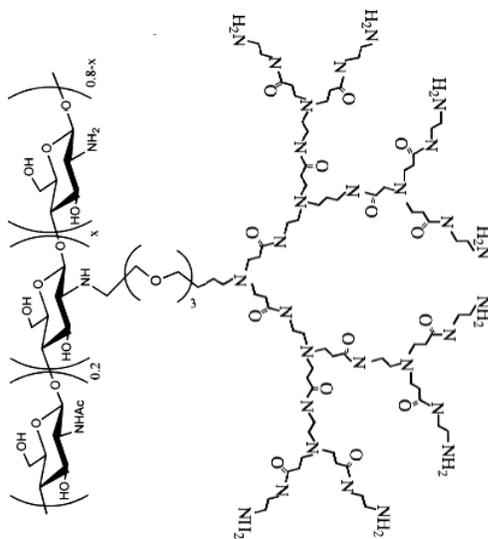
O grupo de biomateriais da Unifei tem se empenhado recentemente na síntese e caracterização de dendrímeros bioativos que possam ser utilizados em biossensores ou como sistemas de liberação controlada de fármacos. Neste sentido, dendrímeros de poliglicerol (PGLD), dendrímeros de quitosana (CHD) e poli(propileno imina) foram sintetizados, purificados e caracterizados por diversas técnicas físico-químicas.<sup>19-25</sup>

O dendrímero de PGLD foi estudado quanto às suas propriedades hemocompatíveis, sendo comprovado que este material possui baixa adsorção de fibrinogênio, e elevada adsorção de albumina e não ativa as plaquetas de sangue. Tais características incentivam a utilização deste material no desenvolvimento de biossensores, em especial os biossensores implantáveis. A Figura 3.9 ilustra a estrutura do dendrímero PGLD.



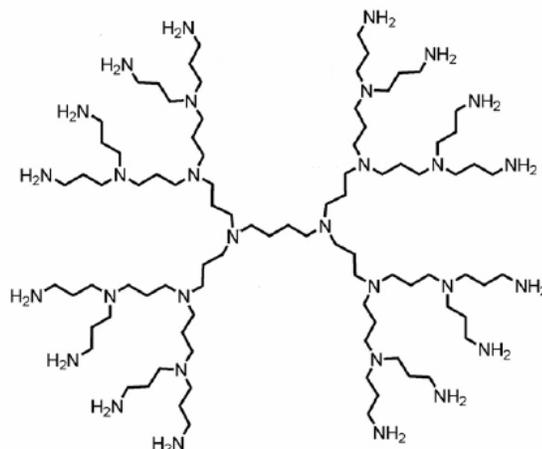
**Figura 3.9** – Estrutura do poliglicerol dendrítico de geração 4 (PGLD G4).

O dendrímero de quitosana (CHD) foi sintetizado com a finalidade de se obter um material para imobilizar as enzimas. No entanto, deve-se precaver de que a atividade destas enzimas não sofram um decaimento em função da imobilização. Neste sentido, o dendrímero de quitosana demonstra ser um material atrativo para aplicações em biossensores. A Figura 3.10 ilustra a estrutura do dendrímero CHD.



**Figura 3.10-** Estrutura do dendrímero de quitosana (CHD).

O dendrímero poli(propileno imina) (PPID) por possuir elevada funcionalidade dos grupos terminais apresentando também uma alta densidade de grupos aminas ( $-\text{NH}_2$ ), surge como um material promissor para aplicações médicas. Os grupos funcionais deste dendrímero podem ser modificados em uma segunda etapa sintética e usados como sítio para imobilização de compostos bioativos. A Figura 4.8 ilustra a estrutura do dendrímero PPID.



**Figura 3.11-** Representação das arquiteturas do dendrímero PPID.

### 3.6- Considerações parciais

Os dendrímeros como materiais do século XX têm se tornado um importante campo interdisciplinar na atual ciência dos polímeros. A síntese de dendrímeros permite gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos e, devido a isso, essas macromoléculas são conhecidas como proteínas artificiais. Por isso, as propriedades biológicas dos dendrímeros são de extrema importância para suas aplicações biomédicas.

Muitas aplicações potenciais de dendrímeros são baseadas em sua uniformidade molecular, superfície multifuncional e presença de cavidades internas. Essas propriedades específicas tornam os dendrímeros apropriados para uma variedade de aplicações de alta tecnologia, incluindo aplicações biomédicas e industriais.

Os dendrímeros estudados neste trabalho fazem parte dessa classe de materiais versáteis e, por isso, apresentam um futuro promissor na área de aplicações biomédicas. Devido à presença de grupos funcionais periféricos, estes dendrímeros podem ser aplicados como agentes imobilizadores de enzimas para fabricação de biossensores. Entretanto, tais sistemas são isolantes e a utilização de sistemas mediadores de elétrons é de fundamental importância para sua utilização como dispositivos biossensores.

O capítulo seguinte abordará sistemas mediadores de elétrons que auxiliam no processo de transição de elétrons entre o eletrodo e a nanoplateforma dendrítica na qual a enzima foi imobilizada.

### 3.7- Referências

- [1] KLAJANERT, B.; BRYCZEWSKA, N. Dendrimers: properties and applications. **Acta Biochimica Polonica**, n. 48 (1), p. 199-208, 2001.
- [2] INOUE, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. **Progress in Polymer Science**, n. 25 p. 453-571, 2000.
- [3] MATOS, M. S.; GEHLEN, M. H.; SCHRYVER, F. C.; FRÉCHET, J.M.J. **Efeito do tamanho do núcleo dendrítico sobre a estrutura e propriedades hidrodinâmicas de dendrímeros de poliariéter**. Disponível em <<http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0258/index.html>> Acessado em 22 mar. 2008.
- [4] BOSMAN, A.W.; JANSSEN, H.M.; MEIJER, E.W. About dendrimers: structure, physical properties, and applications. **Chemical Reviews**. n. 99 (7), p. 1665-1688, 1999.
- [5] DE QUEIROZ, A.A.A.; ABRAHAM, G.A.; ROMÁN, J.S. Polyglycerol dendrimers: a new approach to design fibrinolytic coatings. **III Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. n. 1, p. 184-184, 2004.
- [6] VIEIRA, N.C.S. Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), 2006. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.
- [7] TOMALIA, D. A.; DURST, H. D. Topics in Current Chemistry. **Sci.** p. 165-193, 1993.
- [8] LEHN, J.M. Supramolecular chemistry. **Science**. v. 260, p.1762-1763, 1993.
- [9] MATTHEWS, O.A.; SHIPWAY, A.N.; STODDART, J.F. Prog.Polym. **Sci.**, n. 23, p. 156, 1998.
- [10] BUHLEIER, E.; WEHNER, W.; VOGTLE, F. Synthesis of Molecular Cavity Topologies. **Synthesis**, p. 155-158, 1978.
- [11] VÖGTLE, F.; GESTERMANN, S.; HESSE, R.; SCHWIERZ, H.; WINDISCH, B. Functional dendrimers. **Progress in Polymer Science**. n. 25 (7), p. 987-1041, 2000.
- [12] Entrevista ao Donald A. Tomalia, **Scientific American**, 1995.
- [13] HOFFMANN, R. **Nuevas moléculas que parecen árboles o una explosión de fuegos artificiales**. Disponível em <<http://www:hosting.udlap.mx/.../az32/dendrimerhoffman.html>> Acessado em 22 mar. 2008.
- [14] TOMALIA ET AL. A new class of polymers; Starburts-dendritic macromolecules. **Polymer Journal**, n. 17 (1), p. 117-132.

- [15] PATRI, A.K.; MAJOROS, I.J.; BAKER, J.R. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. **Current Opinion in Chemical Biology**. n. 6, p. 466-471, 2002.
- [16] MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; PILÓ-VELOSO, Dorila. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 4, Jul./Ago. 1998.
- [17] SVENSON, S.; TOMALIA, D. A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 57, p. 2106-2129, 2005.
- [18] TOMALIA, D.A. Dendrimer molecules. **Scientific American**. N.272 (5), p. 62-66, 1995.
- [19] GIAROLA, V. M. **Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis**. 2007, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.
- [20] AULENTA, F.; HAYES W.; RANNARD S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. **European Polymer journal**, n. 39, p. 1741-1771, 2003.
- [21] TOMALIA, D. A. E FRECHET, J. M. J. Discovery of dendrimers and dendritic polymers: a brief historical perspective. **Journal Pol. Sc.**, n. 40 A, p. 2719-28, 2001.
- [22] FRECHET, J. M. J.; HAWKER, C. J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture. A new convergent approach to dendritic macromolecules. **Journal of the American Chemical Society**, n. 112, p. 7638-7647, 1990.
- [23] TOMALIA, D.A.; MARDEL, K.; HENDERSON, S.A.; HOLAN, G.; ESFAND. R; Dendrimers-an enabling synthetic science to controlled organic nanostructures. In: GODDARD, W.A. et al. **Handbook of nanoscience, engineering and technology**. Boca Raton (EUA) , p.1–34, 2003.
- [24] MONTANARI, M.L.C.; MONTANARI, C.A.; PILÓ-VELOSO, D. Sistemas transportadores de drogas. **Química Nova**. n. 21 (4), p. 470-476, 1998.
- [25] FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.

## Capítulo 4- Mediadores de elétrons

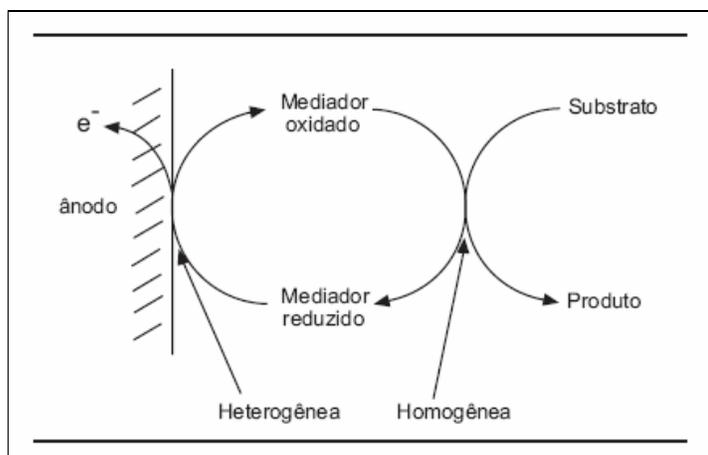
### 4.1- O mecanismo de ação das enzimas e o processo de mediação de elétrons

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores à dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são catalisadas por enzimas.

No mecanismo de catálise enzimática há o uso de substratos, que são compostos que vão reagir quimicamente. Sendo a enzima o catalisador que fará com que a reação se dê mais facilmente; e por fim o produto é o composto que se irá formar na reação.

Como catalisadores celulares, as enzimas são extremamente versáteis, acelerando a velocidade de uma reação, sem no entanto participar dela como reagente ou produto. As enzimas atuam ainda como reguladoras de um conjunto complexo de reações. Sendo portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular. São catalisadores biológicos extremamente eficientes e aceleram em média  $10^9$  a  $10^{12}$  vezes a velocidade da reação, transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação. Atuam em concentrações muito baixas e em condições suaves de temperatura e pH. Possuem todas as características das proteínas. Podem ter sua atividade regulada e estão quase sempre dentro da célula, e compartimentalizadas.

As enzimas oxidorredutases como as desidrogenases e as oxidases são biocatalizadores que catalisam reações de transferência de elétrons, ou seja, reações de oxidação tal como ilustrado na Figura 4.1.



**Figura 4.1-** Mecanismo de funcionamento das enzimas.<sup>1</sup>

#### 4.2- Sistemas utilizados como mediadores de elétrons

Durante décadas uma das principais preocupações na construção de biossensores amperométricos centralizou-se na velocidade de transferência de elétrons do sítio ativo da enzima para a superfície do eletrodo.<sup>2-3</sup> Isto põe-se claramente em evidência, quando observa-se todas as transformações através das quais os biossensores tem passado, a procura de uma maior seletividade e eficiência na transferência de elétrons. Os biossensores da primeira geração, baseados na eletroatividade do substrato ou produto da reação enzimática, apresentavam problemas de interferências devido à necessidade de potenciais muito altos.<sup>4</sup> Na tentativa de diminuir estes potenciais, surgiram os biossensores de segunda geração, onde o emprego de mediadores de elétrons, tinham como função o transporte (shuttling) de elétrons entre a enzima e o eletrodo.<sup>4</sup>

Um mediador de elétrons é uma substância de baixa massa molecular com propriedades redox que, numa primeira etapa, interage com o substrato ou produto de uma determinada reação e, então se difunde até a superfície do eletrodo de trabalho, onde sofre uma transferência de elétrons rápida sob um potencial substancialmente menor àquele necessário para a eletrooxidação ou redução de um analito.<sup>5-6</sup>

Em um biossensor, o mediador de elétrons é imobilizado na matriz polimérica, juntamente com a enzima, e tem a função de promover a redução catalítica do peróxido de hidrogênio gerado a partir da reação bioquímica. Os elétrons produzidos pela redução do peróxido de hidrogênio, através do mediador, são elevados à superfície do eletrodo. Alguns dos mediadores de elétrons comumente utilizados de acordo com a literatura são o polipirrol e a polianilina.<sup>7-8-9</sup>

Recentemente, Schreyer e Mikkelsen,<sup>10</sup> divulgaram a síntese de uma cisteína oxidase artificial, a qual apresentou atividade para a oxidação dos tióis, cisteína e glutatona. Esta enzima artificial consiste de um anel  $\beta$ -Ciclodextrina ( $\beta$ -CD, formado por sete moléculas de glicose) no qual foi ligado covalentemente um grupo derivado ferroceno,<sup>11</sup> habitualmente usado como mediador de elétrons na construção de biossensores enzimáticos de segunda geração.<sup>12</sup>

No sentido de diminuir-se os potenciais na determinação eletroquímica direta de GSH (glutatona), eletrodos de carbono quimicamente modificados com mediadores de elétrons têm sido avaliados, no intuito de minimizar possíveis interferentes principalmente em amostras biológicas.<sup>13</sup> Neste sentido, eletrodos de carbono quimicamente modificados com ftalocianina de cobalto<sup>14-15</sup> foram empregados na eletrooxidação de GSH. GSH e cisteína foram

eletrocataliticamente oxidadas em eletrodos de grafite modificados com tetraciano-*p*-quinodimetanotetrahidro-fulvaleno e 1,1-dimetilferroceno<sup>16</sup>. Derivados de rutênio (III)<sup>17-18</sup> também foram empregados em algumas determinações voltamétricas como mediadores de elétrons na detecção de tióis incluindo a glutatona. Outros sistemas mediadores de elétrons frequentemente utilizados são o ferricianeto de potássio e ferricianeto de sódio.

### 4.3- Polímeros condutores como mediadores de elétrons

A utilização de polímeros condutores como mediadores de elétrons, têm atraído a atenção de vários pesquisadores. Os polímeros intrinsecamente condutores (ICP - “intrinsically conducting polymers”) podem combinar as propriedades mecânicas e a processabilidade dos polímeros convencionais com um comportamento elétrico, ótico e/ou mecânico semelhantes ao de metais e semicondutores inorgânicos. Esta característica é responsável pelo enquadramento destes materiais na categoria dos referidos metais sintéticos ou metais orgânicos.<sup>19- 20-21-22</sup>

Até meados dos anos 1970 os polímeros se destacavam na área de materiais pelas suas boas capacidades de isolamento elétrico e de versáteis propriedades mecânicas. O primeiro polímero condutor foi obtido em 1977 através da exposição de poliacetileno sob a forma isolante, na presença de agentes dopantes, oxidantes ou redutores, tornando-o um ICP.<sup>23</sup>

Entretanto, após a descoberta da alta condutividade do poliacetileno dopado em 1977 os polímeros começam a adquirir o status de materiais com propriedades eletrônicas.<sup>23</sup> Torna-se possível alterar, reversivelmente, a condutividade elétrica desses materiais variando-a desde um valor muito baixo (isolante), até valores típicos dos metais.

Nos anos que se seguiram até os dias de hoje, dezenas de outros polímeros foram sintetizados, apresentando comportamento isolante-condutor similar ao do poliacetileno.<sup>24</sup> Dentre esses polímeros, os que têm sido mais amplamente estudados são as polianilinas, os polipirróis, os politiofenos, os poli(*p*-fenilenos) e os poli(*p*-fenilenivinilenos).<sup>24-25</sup>

Um exemplo da rápida evolução desta área foi o desenvolvimento, no começo da década de 1980, de uma bateria usando eletrodos poliméricos, que serviu futuramente de base para o desenvolvimento de baterias recarregáveis.<sup>25</sup> Atualmente, diodos, transistores, sensores de gases, sensores químicos e biológicos, dosímetros, aplicações em eletrônica biomolecular, músculos artificiais, diodos emissores de luz, displays luminosos, células fotovoltaicas são outros exemplos de aplicações dos polímeros eletrônicos.<sup>26-27</sup>

Nesse contexto, o estudo e a caracterização de filmes e sistemas orgânicos à base de polianilina (PANI) para aplicações em dispositivos eletrônicos têm despertado grande interesse tecnológico.<sup>28-29</sup> Isto ocorre pelo fato desse polímero apresentar, além da possibilidade de controle da sua condutividade elétrica por meio da exposição a soluções ácidas ou básicas, baixos custos de produção, solubilidade em diversos solventes orgânicos, facilidades de processamento e de manufatura na forma de filmes finos e, finalmente, estabilidades térmica, química e elétrica.<sup>30</sup> Em outras palavras, propriedades físico-químicas e características mecânicas e elétricas promissoras para o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos inovadores.

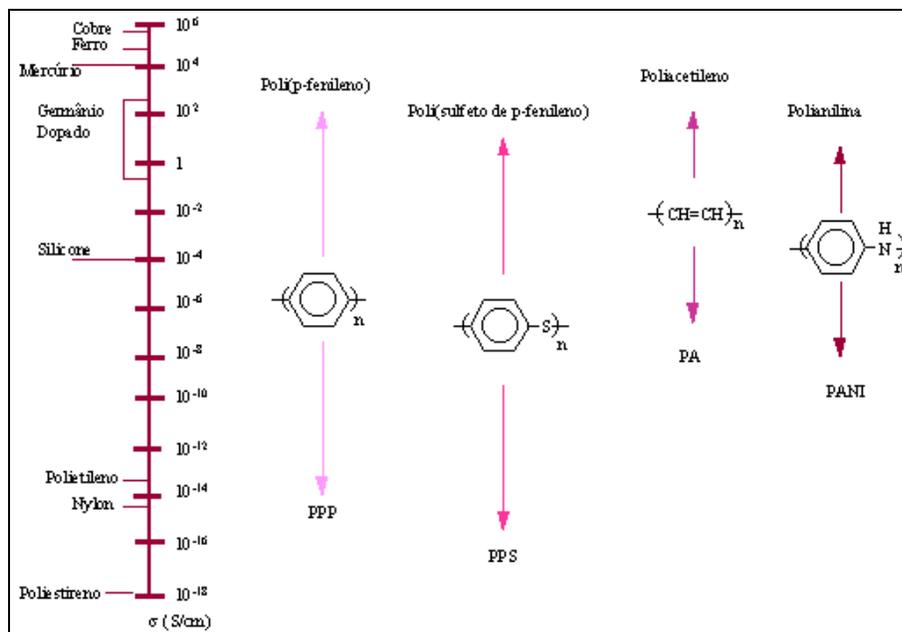
Um critério importante na seleção de polímeros potencialmente condutores é a facilidade com que o sistema pode ser oxidado ou reduzido. Isto leva a escolha de polímeros com instaurações conjugadas, que possuam baixo potencial de oxidação. Os elétrons de caráter  $\pi$  podem ser facilmente removidos ou adicionados para formar um íon polimérico, sem a destruição das ligações necessárias para a estabilidade da macromolécula.

Polímeros que possuem ligações duplas e simples alternadas ao longo da cadeia principal, apresentam elétrons  $\pi$ , que se deslocam ao longo da mesma, sendo conhecidos como polímeros conjugados.<sup>22</sup> Os elétrons  $\pi$  podem ser facilmente removidos ou adicionados para formar um íon polimérico, sem que ocorra a destruição das ligações necessárias para a estabilidade da macromolécula.<sup>31</sup> Estes materiais podem ser facilmente oxidados ou reduzidos através do emprego de agentes de transferência de cargas (dopantes), resultando na obtenção de polímeros condutores. Desta forma, um critério importante na seleção de polímeros potencialmente condutores é a facilidade com que o sistema pode ser oxidado ou reduzido.<sup>32</sup>

Os dopantes promovem a oxidação por meio de agentes aceptores de elétrons ou a redução pelo emprego de doadores de elétrons e, desta forma, convertem um polímero isolante em condutor. A oxidação ou redução da cadeia resulta na formação de um complexo de transferência de carga (CTC), que orienta os contra-íons ao longo da cadeia polimérica.<sup>32</sup> Dentre os vários métodos para criar estados excitados, a dopagem química tem sido amplamente utilizada para os polímeros conjugados.<sup>22</sup>

A condução da corrente elétrica, isto é, o transporte de elétrons ao longo do esqueleto polimérico decorrente da excitação eletrônica do sistema  $\pi$  conjugado, confere uma maior rigidez à cadeia, baixa solubilidade e elevadas temperaturas de fusão.<sup>32</sup>

A Figura 4.2 ilustra a condutividade, expressa em termos de ordem de grandeza, de alguns polímeros dopados em comparação com materiais convencionais.<sup>33</sup>

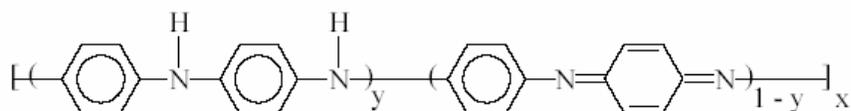


**Figura 4.2-** Estudo comparativo entre os valores de condutividade elétrica,  $\sigma$  (S/cm), de materiais poliméricos dopados com os de materiais convencionais.<sup>33</sup>

O poliacetileno ainda constitui o polímero que tem alcançado os mais elevados valores de condutividade, igualando-se aos do cobre ( $10^5$  S/cm). No entanto, pela instabilidade térmica e ambiental, além da má processabilidade do mesmo, decorrente da sua insolubilidade e infusibilidade, outros polímeros condutores têm sido extensivamente investigados com o objetivo de superar tais dificuldades.<sup>34</sup> Por este motivo, a polianilina e polímeros derivados da anilina têm recebido grande atenção nos últimos anos pela sua estabilidade química às condições ambientais, fácil obtenção e baixo custo de produção.<sup>32</sup> Além disso, a polianilina atingiu recentemente condutividade da ordem de  $10^4$  S/cm para um polímero de alta massa molar orientado uniaxialmente.

#### 4.3.1- As Polianilinas

As polianilinas representam uma classe de polímeros, cuja composição química na forma de base (não dopada) é dada por uma fórmula geral como segue na Figura 4.3.



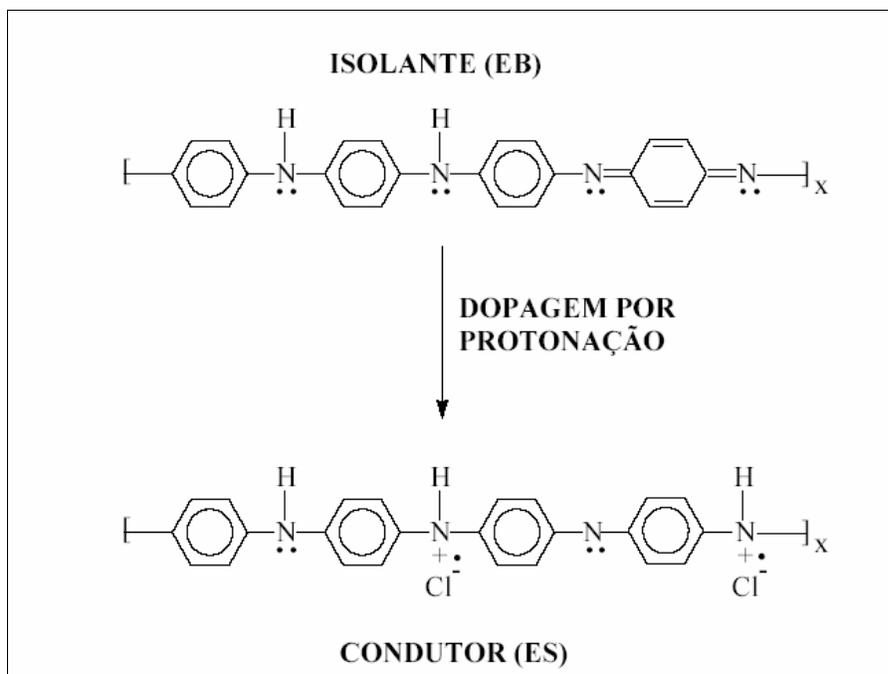
**Figura 4.3-** Fórmula geral da polianilina (PANI).<sup>35</sup>

composta por  $y$  e  $(1-y)$  unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas, respectivamente. O valor de  $y$  pode variar continuamente entre um para o polímero completamente reduzido (contendo somente nitrogênios amina) e zero, no caso do polímero completamente oxidado (contendo somente nitrogênios imina).<sup>35</sup> Os diferentes graus de oxidação da polianilina são designados pelos termos leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina quando  $y$  for igual a 1; 0,75; 0,5; 0,25; e 0, respectivamente.

A polianilina forma uma nova classe de polímeros condutores porque pode ser dopada por protonação, isto é, sem que ocorra alteração no número de elétrons (oxidação ou redução) associado à cadeia polimérica.<sup>35</sup> Logo o nitrogênio desta espécie pode estar total ou parcialmente protonado para se obter o polímero na forma de sal, (forma dopada). A dopagem química da polianilina na forma esmeraldina é feita por protonação em solução ácida aquosa, promovendo um aumento da condutividade de cerca de 10 ordens e grandeza ( $\sigma = 1-5$  S/cm) em relação a polianilina não dopada. O estado de oxidação esmeraldina e a forma na qual após dopagem, a PANI alcança os maiores valores de condutividade. O grau de protonação da base depende do grau de oxidação que o polímero foi sintetizado, e do pH da solução dopante.

A PANI pode ser obtida via síntese química com o uso de agentes oxidantes como  $K_2Cr_2O_7$ ,  $H_2O_2$ ,  $Cr_2O_4$  ou  $KClO_3$ , em meio ácido (HCl,  $H_2SO_4$ , DBSA-ácido dodecilbenzeno sulfônico). Na eletrodeposição as moléculas de anilina são oxidadas a filme de PANI no anodo por uma corrente elétrica em meio ácido. Os elétrons são removidos da cadeia polimérica durante a oxidação e contra-íons, provenientes da dissolução ácida, na solução são inseridos para balancear a carga elétrica da cadeia. Os métodos eletroquímicos oferecem materiais com melhores propriedades de condução em forma de filmes finos, devido a dopagem do polímero ser unicamente eletroquímica, sendo que, a quantidade de carga usada na reação determina seu grau de dopagem. A Figura 4.4 ilustra a dopagem da polianilina por protonação.

Os demais polímeros condutores<sup>36</sup> possuem, em geral, íons de carbono, porém o sal de esmeraldina difere destes apresentando-se como um polímero, no qual a carga positiva reside primordialmente no nitrogênio.



**Figura 4.4-** Representação da formação da banda de condução polarônica em polianilina.

EB = base esmeraldina; ES = sal de hidrócloro de esmeraldina.<sup>36</sup>

O tipo de dopante utilizado (inorgânico, orgânico ou poliácido) influencia decisivamente nas estruturas e propriedades das polianilinas (solubilidade, cristalinidade, resistência mecânica).

A polianilina pode sofrer um efeito de autodopagem quando a forma esmeraldina reage com ácido sulfúrico concentrado. Neste caso, um átomo de hidrogênio do anel benzênico é substituído pelo grupo  $\text{SO}_3\text{H}$ , resultando em uma polianilina sulfonada dopada ( $\sigma = 0,1 \text{ S/cm}$ ).<sup>37</sup> O próton dopante não consegue se difundir para longe da cadeia polimérica, devido ao contra-íon ao qual está quimicamente ligado e a PANI se mantém dopada mesmo para meios neutros ou levemente básicos, o que não ocorre para PANI convencionalmente dopada.

Outro fenômeno importante do dopante se refere a dopagem secundária,<sup>38-39</sup> no qual a combinação de um ácido orgânico funcionalizado e um solvente apropriado promove uma mudança conformacional das cadeias poliméricas de enoveladas para estendidas, efeito este

acompanhado por um aumento adicional da condutividade da PANI, atingindo aproximadamente 200 S/cm.

#### 4.3.2- Estrutura de transporte na interface polímero-metal<sup>40-41</sup>

As heterojunções do tipo polímero-metal (HPM) obtiveram, nas últimas duas décadas, um avanço significativo da optoeletrônica uma vez que propiciou o projeto de dispositivos eletrocromáticos, transistores de efeito de campo (FETs), supercapacitores, entre outros. As principais características físico-químicas de tais materiais são a facilidade de processamento e o baixo custo.

A probabilidade de se obter HPMs com superfícies nanoprojeadas é atraente uma vez que torna possível a obtenção de materiais cujas características elétricas possam ser moduladas topologicamente.

Estas heterojunções são particularmente interessantes para o projeto de nanodispositivos envolvendo a aquisição de interfaces do tipo polímero conjugado-metal. Tais sistemas são particularmente interessantes para o projeto de biossensores amperométricos de vasta utilidade em análises clínicas.

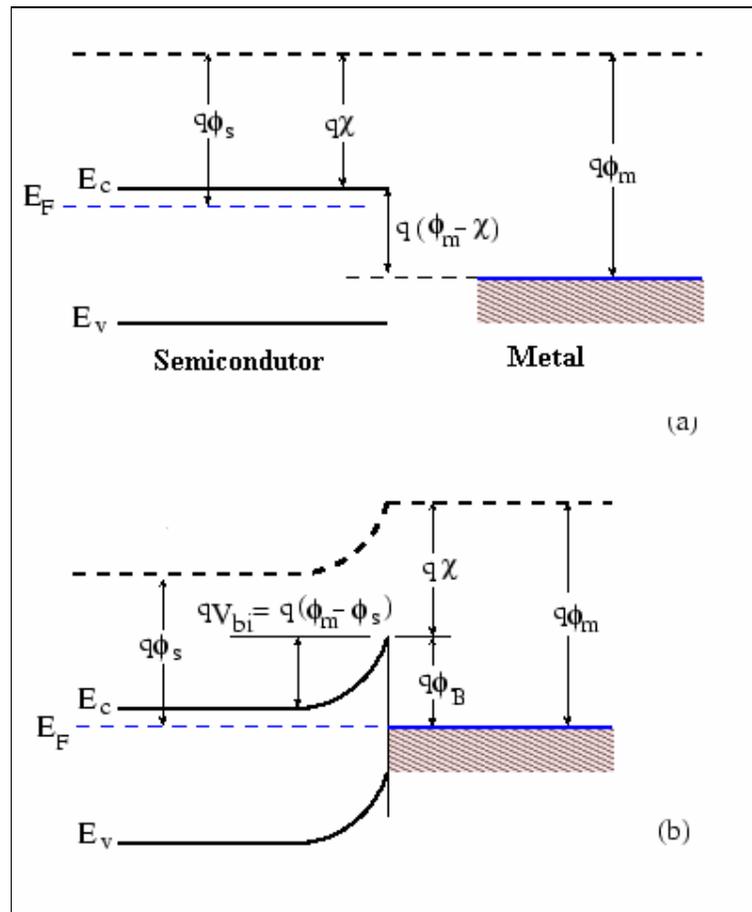
Quando se tem uma heterojunção do tipo semicondutor-metal geralmente é suposto como teoria padrão a emissão termiônica através da junção (modelo de Schottky). A corrente aumenta exponencialmente ao se aplicar uma polarização direta; em contraste, uma corrente muito pequena flui quando se aplica uma tensão reversa. Nesse caso, tem-se o comportamento retificante de um diodo (diodo Schottky). Como o metal não possui lacunas, não há armazenamento de cargas e nem tempo de recuperação reverso sendo muito utilizado em computadores digitais de alta velocidade e diodos de retificação de sinais de alta frequência.

O comportamento tipo diodo Schottky, não próprio dos materiais poliméricos, deve-se à interface semicondutor polianilina-metal (PANI-M). É fato bem conhecido que os níveis de energia de Fermi ( $E_F$ ) são diferentes na interface metal-polímero (ver Figura 4.5). Uma vez que os elétrons são os únicos portadores de carga, o equilíbrio somente é atingido quando os níveis de  $E_F$  no semicondutor e no metal se alinham através de um fluxo de cargas do semicondutor (tipo-n) para o metal. Uma camada de dipolos é então formada, conduzindo a um abaixamento da banda de condução e a formação de uma barreira de potencial que se opõe a um fluxo eletrônico adicional. Este comportamento confere à heterojunção PANI-M um caráter retificador.

No interior dos semicondutores do tipo-n a carga dos elétrons móveis é compensada pelos doadores fixos ionizados, positivos, enquanto que nos do tipo-p tem-se buracos móveis

e aceitadores fixos ionizados, negativos, mantendo-se, portanto, um equilíbrio entre os transportadores de carga. No caso dos semicondutores do tipo-n os transportadores majoritários são os elétrons, enquanto que nos do tipo-p os transportadores majoritários são os buracos.

O diagrama de bandas de energia de um metal e de um semicondutor tipo-n, eletricamente isolados é apresentado na Figura 4.5 (a). A partir da figura, podemos identificar a função trabalho  $q\phi_m$  do metal, que corresponde à diferença de energia entre o nível do vácuo e o nível de Fermi, a função trabalho  $q\phi_s$  do semicondutor, e a afinidade eletrônica do semicondutor  $q\chi$ , definida como a distância entre o nível do vácuo e o fundo da banda de condução  $E_c$  do semicondutor.



**Figura 4.5-** Representação esquemática da Energia de Fermi para um sistema metal-semicondutor.<sup>42</sup>

Após o contato, o diagrama de bandas passa ser ilustrado pela Figura 4.5 (b), considerando-se que, no equilíbrio, os níveis de Fermi de ambos os materiais devem se alinhar, promovendo um encurvamento no diagrama de banda de condução próximo à interface, enquanto que, distante da junção, as propriedades de cada um dos materiais são mantidas. O diagrama de banda do metal se mantém inalterado, tanto na interface como distante da junção. A fim de alinhar os níveis de Fermi, do metal e do semiconductor, elétrons devem ser transferidos do semiconductor para o metal, deixando doadores ionizados no semiconductor.

Para uma melhor compreensão da Figura 4.5 (b), pode-se observar que a função trabalho do metal é maior do que a função trabalho do semiconductor, e o nível de Fermi do semiconductor, antes do contato, são mais alto do que o do metal. A diferença de potencial

$$V_{bi} = (\phi_m - \phi_s)$$

é denominada potencial de contato e corresponde à diferença entre a função trabalho do metal e do semiconductor, representando o valor do encurvamento total da banda de condução no equilíbrio. A altura da barreira de potencial

$$q\phi_B = q(\phi_m - \chi)$$

entre o metal e o semiconductor, comumente chamada de barreira Schottky, é apresentada no caso ideal, pela diferença entre a função trabalho do metal e a afinidade eletrônica  $q\chi$  do semiconductor.

O espaçamento entre os estados energéticos criados pela proximidade dos átomos no sólido depende do número de estados presentes; quanto maior o número de estados, mais próximo estão os níveis eletrônicos permitidos. Portanto, no caso dos sólidos, os níveis energéticos estão tão próximos que é mais conveniente ignorar a existência de níveis discretos e pensar em termos de uma banda contínua dos níveis de energias permitidos.

Este trabalho utilizou nanotubos de polianilina PANI que ao passar por um processo de dopagem apresentam características de um semiconductor, obedecendo ao comportamento ilustrado pela Figura 4.5. Os nanotubos de PANI foram utilizados no processo de mediação de elétrons na interface dendrímero bioconjugado/eletrodo. Estes nanotubos foram sintetizados pelo grupo de biomateriais da Unifei e utilizados em dispositivos biossensores. Os resultados

obtidos foram significativamente promissores quanto às características elétricas na transdução do sinal.

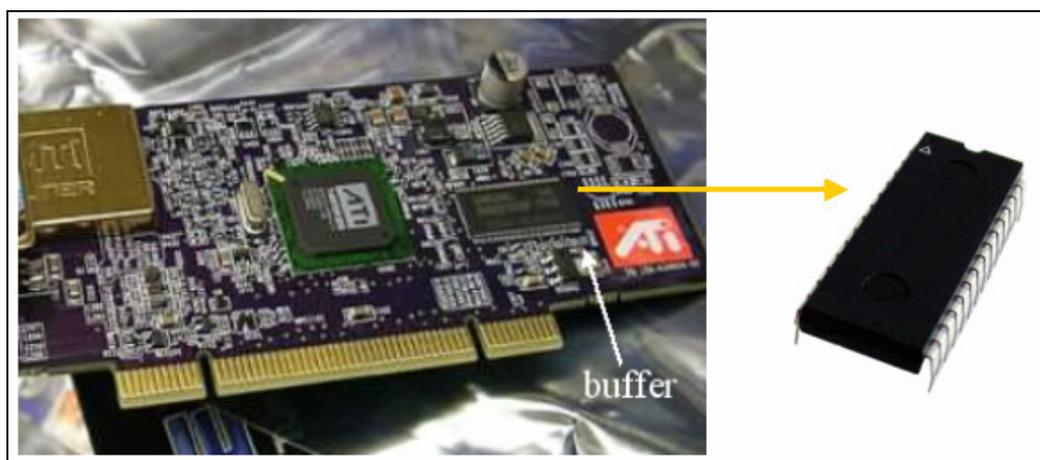
#### 4.4- Considerações parciais

Após muitos anos de investigações teóricas e experimentais, alguns mecanismos relacionados ao mecanismo de mediação de elétrons ainda não são muito bem entendidos e uma condição ideal para se produzir novos e melhores materiais da classe dos polímeros condutores ainda não foi obtida.

O mediador de elétrons ideal deve possuir como características físico-químicas, alta estabilidade, boa condutividade elétrica e boa propriedade de adesão à superfície do eletrodo. Neste sentido, os polímeros conjugados parecem ser uma escolha interessante para desempenharem o papel de mediadores de cargas em biossensores.

Um ponto importante a se discutir no processo de análises clínicas refere-se ao processo de aquisição e tratamento dos sinais elétricos gerados no dispositivo biossensor.

Os dispositivos biossensores comerciais são monoenzimáticos, ou seja, o sistema analisa apenas um único metabólito. Tais dispositivos trabalham geralmente com armazenamento dos dados em uma memória que funciona como buffer. Na ciência da computação, buffer é uma região de memória temporária utilizada para escrita e leitura de dados. Os dados podem ser originados de dispositivos externos ou internos ao sistema. Os buffers podem ser implementados em software (mais usado) ou hardware. A Figura 4.6 ilustra a estrutura física de um buffer.



**Figura 4.6-** Representação física de um buffer.<sup>43</sup>

Os dados recebidos são interpretados em uma curva de calibração previamente estabelecida. Neste caso, o tratamento dos sinais não envolve uma tarefa complexa.

O presente trabalho envolve a obtenção de biossensores multienzimáticos, ou seja, sistemas que permitem a análise de vários metabólitos, a saber: glicose, uréia e colesterol. Neste sentido, o tratamento dos dados por uma rede neural é uma parte importante e que não pode ser ignorada.

No próximo capítulo serão abordados alguns conceitos fundamentais sobre as redes neurais e sua utilização em dispositivos biossensores.

#### 4.5- Referências

- [1] CARRIJO, R.M.C.; ROMERO, J.R. Oxidações catalíticas e eletrocatalíticas de substratos orgânicos. O cério como oxidante. **Química Nova**, v. 23, n. 3, 2000.
- [2] SCHMIDT, H.L.; GUTBERLET, F.; SCHUHMANN, W.; Sens. Actuators B. p. 13-14, 366 p., 1993.
- [3] OKAWA, Y.; NAGANO, M.; HIROTA, S.; KOBAYASHI, H.; OHNO, T.; WATANABE, M. Bios. Bioelect. v. 14, 229 p., 1999.
- [4] GORTON, L.; LINDGREN, A.; LARSSON, T.; MUNTEANU, F.D.; RUZGAS, T.; GAZARYAN, I.; **Anal. Chim. Acta**, v. 91, 400 p., 1999.
- [5] BERCHMANS, S.; VIJAYAVALLI, R. Surface Modification of Glassy Carbon by Riboflavin. **Langmuir**. n.11, p. 286-290, 1995.
- [6] ROVER, L.Jr; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím. Nova**, v.24, n.1.
- [7] BRAHIM, S.; NARINESINGH, D.; GUISEPPI-ELIE, A. Amperometric determination of cholesterol in serum using a biosensor of cholesterol oxidase contained within a polypyrrole-hydrogel membrane. **Analytica Chimica Acta**. n. 448, p. 27-36, 2001.
- [8] SINGH, S.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films. **Analytica Chimica**. n. 502, p. 229-234, 2004.
- [9] WANG, H.; MU, S. Bielectrochemical characteristics of cholesterol oxidase immobilized in a polyaniline film. **Sensors and Actuators B**. n. 56, p. 22-30, 1999.
- [10] SCHREYER, S.K.; MIKKELSEN, S.R.; Bioconjugate Chem. v. 10, 464 p., 1999.
- [11] WANG, J.; J. PHARM. **Biomed. Anal.**, v. 19, 47 p., 1999.

- [12] SOTOMAYOR, M.D.P.T.; KUBOTA, L.T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. **Química Nova**, v. 25, n 1, p. 123-128, 2002.
- [13] WRING, S. A.; HART, J. P.; BIRCH, B. J. Development of an improved carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine as a re-usable sensor for glutathione. **Analyst**, v. 114, p. 1563-1570, 1989.
- [14] WRING, S. A.; HART, J. P.; BIRCH, B. J. Determination of glutathione in human-plasma using high-performance liquid-chromatography with electrochemical detection with a carbon-epoxy resin composite electrode chemically modified with cobalt phthalocyanine. **Analyst**, v. 114, p. 1571-1573, 1989.
- [15] KINOSHITA, H.; MIYA, T.; KAMIHIRA, S. Amperometric determination of glutathione in yeast extract using a membrane-covered phthalocyanine embedded carbon-paste electrode. **Bunseki Kagaku**, v. 48, p. 117-120, 1999.
- [16] KULYS, J.; DRUNGGILENS, A. Chemically modified electrodes for the determination of sulfhydryl compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 243, p. 287-292, 1991.
- [17] COX, J. A.; GRAY, T. J. Flow-injection amperometry of cysteine and glutathione at an electrode modified with a ruthenium-containing inorganic film. **Electroanalysis**, v. 2, p. 107-111, 1990.
- [18] NALINI, B.; NARAYANAN, S. S. Electrocatalytic oxidation of sulfhydryl compounds at ruthenium(III) diphenyldithiocarbamate modified carbon paste electrode. **Electroanalysis**, v. 10, p. 779-783, 1998.
- [19] SCHMIDT, H.L.; GUTBERLET, F.; SCHUHMANN, W. New principles of amperometric enzyme electrodes and of reagentless oxidoreductase biosensors. **Sensors and Actuators B-chemical**. v. 13, p.366-371, 1993.
- [20] OKAWA, Y.; NAGANO, M.; HIROTA, S.; KOBAYASHI, H.; OHNO, T.; WATANABE, M. Tethered mediator biosensor. mediated electron transfer between redox enzyme and electrode via ferrocene anchored to electrode surface with long poly(oxyethylene) chain. **Biosensors Bioelectronics**. v.14, p. 229-235, 1999.
- [21] FERSHT, A. Structure and mechanism. 2 ed.; New York: Freeman, 1985.
- [22] KANG, E.T.; NEOH, K.G. X-ray photoelectron spectroscopic characterization of protonation of polyaniline films by polymeric acids. **Polymer**, n. 35, p. 3193-3199, 1994.
- [23] CHIANG, C. K.; FINCHER, C. R.; PARK, Y. W.; HEEGER, A. J.; SHIRAKAWA, H.; LOUIS, E. J.; GRAU, S. C.; MACDIARMID, A. G. **Phys. Rev. Let.** p. 1098; 1977.
- [24] SHIRAKAWA, H. **Synt. Met.** p. 3, 2002.

- [25] POPE, M.; SWENBERG, C. E. Electronic process in organic crystals and polymers. **Clarendon press**, 2 ed., Oxford, 1999.
- [26] AKCELRUD, L. **Prog. Pol. Sci.** p.875, 2003.
- [27] SILVA, E.A.B.; BORIN, J.F.; NICOLUCCI, P.; GRAEFF, C.F.O.; GHILARDI NETTO, T.; BIANCHI, R. F. Low dose ionizing radiation detection using conjugated polymers. **Applied Physics Letters**. v.86, 2005.
- [28] XIE, D.; JIANG, Y.; PAN, W.; LI, D.; WU, Z.; LI, Y. Fabrication and characterization of polyaniline-based gas sensor by ultra-thin film technology. **Sensors and Actuators B-chemical**. v.81, p. 158-164, 2002.
- [29] RIUL Jr., A.; SOTO, A. M. G.; MELLO, S. V.; BONE, S.; TAYLOR, D. M.; MATTOSO, L. H. C. **Synth. Met.** p.109, 2003.
- [30] MACDIARMID, A. G.; CHIANG, J. C.; RICHTER, A. F.; SOMASIRI, N. L D.; EPSTEIN, A. J. *Conducting Polymers*, L. Alcacer, Reidel, Dordrecht, p.105, 1985.
- [31] BOTTER, W.; SILVEIRA, E. N.; ARAUJO, O. A.; DEZOTTI, M. 6<sup>th</sup> International Macromolecular Colloquium, vol. 1, p. 111-113, 1994.
- [32] KUHN, H. H.; KIMBRELL, W. C.; FOWLER, J. E.; BARRY, C. N. Properties and applications of conductive textiles. **Synth. Met.** p. 55-57 - 3707-3712, 1993.
- [33] FROMMER, J. E.; CHANCE, R. R. *Electrically Conductive Polymers*. Em: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, MARK, H. F.; BIKALES, N. M.; OVERBERG, C. G.; MENGES, G.; JOHN WILEY SONS, New York, vol. 5, p. 462-507, 1986.
- [34] BRANDRUP, J.; IMMERGUT, E. H. *Polymer Handbook*. New York: Wiley-Interscience publication, John Wiley & Sons, 2 ed., p. 341-355, 1975.
- [35] HUANG, W. S.; HUMPHREY, B. D.; MACDIARMID, A. G.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, v. 82, p. 2385, 1986.
- [36] MATTOSO, L. H. C.; MACDIARMID, A. G.; *Polyanilines, oxidation states*. In *The polymeric materials encyclopedia*; **Salamone**, J. C.; 1996.
- [37] YUE, J.; EPSTEIN, A. J. J. *Synthesis of self-doped conducting polyaniline*. **Am. Chem. Soc.**, v. 112, p. 2800-28001, 1990.
- [38] MACDIARMID, A. G.; EPSTEIN, A. J.; *Anais do 2º Congresso Brasileiro de Polímeros*, p. 544, 1993.
- [39] HO, K.S. *Effect of fenolic based polymeric secondary dopants on polyniline*. **Synthetic Metals**, v. 126, p. 151-158, 2002.

- [40] DA SILVA, L.M. Eletroquímica do Estado Sólido: fundamentos sobre materiais semicondutores. **Apostila**. Unicamp. 2005.
- [41] GERISCHER, H. The impact of semiconductors on the concepts of electrochemistry. **Electrochimica Acta**. v.35, p. 1677-1699, 1990.
- [42] FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.
- [43] Disponível em <<http://www.digit-life.com/archive.shtml?2005/0114>> Acessado em 26 mar. 2008.

## **,Capítulo 5- Redes neurais artificiais**

---

### **5.1- Inteligência Artificial**

Desde os primeiros momentos da história da computação, os cientistas têm sonhado com a idéia de criar um cérebro eletrônico. Entre todas as pesquisas tecnológicas modernas, esta busca por sistemas computacionais artificialmente inteligentes tem sido uma das mais ambiciosas. Mas os cientistas também foram cativados desde cedo pelo potencial que tal tecnologia poderia ter para a medicina, com computadores inteligentes capazes de armazenar e processar vastos repositórios de conhecimentos na realização de diagnósticos clínicos.<sup>1-2</sup>

A Inteligência Artificial (IA) não é recente. Sua história se inicia nos idos dos anos 40, onde havia pesquisas em torno de sequências de estratégia e análise do funcionamento do cérebro com objetivos de formalização de seu comportamento. Estes dois ramos de pesquisa eram dissociados entre si, sem nenhuma preocupação com a construção de uma Inteligência Artificial. Buscava-se, apenas, novas alternativas de utilização do computador, ainda em projeto.<sup>3</sup>

Com o passar dos anos, foram sendo distinguidas duas linhas de pesquisa: uma biológica, calcada em torno do funcionamento do cérebro e dos neurônios; e outra, fruto do estudo da cognição, do raciocínio.<sup>3</sup>

Muitos sistemas foram desenvolvidos com o objetivo de auxiliar os médicos no diagnóstico de doenças, tipicamente com a intenção de serem utilizados durante um encontro clínico com o paciente. O sistema Dxplain, desenvolvido na Universidade Harvard pelo Dr. Octo Barnett,<sup>1</sup> é um bom exemplo de sistemas de apoio à decisão clínica. Este sistema é usado para diagnóstico em medicina interna, a partir de um conjunto de achados clínicos, incluindo sinais, sintomas e dados laboratoriais, produz uma lista de diagnósticos possíveis por ordem decrescente de importância e sugere investigações posteriores. O sistema contém uma base de probabilidades aproximadas para cerca de 4,5 mil manifestações associadas a 2 mil doenças diferentes.<sup>2</sup>

Outro método utilizado é o HELP, que é uma espécie de sistema de informação hospitalar baseado no conhecimento, e foi desenvolvido em 1980 na Universidade de Utah. Ele não apenas apóia as aplicações de rotina de um sistema de informação hospitalar (SIH), incluindo o gerenciamento das admissões e altas, e das prescrições médicas, mas também inclui uma função de apoio à decisão, o qual foi incorporado às funções rotineiras do SIH. O sistema de apoio à

decisão fornece alertas e lembretes aos clínicos, interpretação de dados e diagnóstico de doenças, sugestão de manejo de pacientes e protocolos clínicos. A ativação do apoio à decisão é feita a partir de cada aplicativo, mas também pode ser disparada automaticamente à medida que um conjunto de dados clínicos está sendo digitado no registro computadorizado do paciente.<sup>2</sup>

A partir da década de 90 consolidam-se as redes neurais como parte integrante do estudo da Inteligência Artificial propriamente dita. Reconhece-se, também, que os paradigmas biológico e psicológico são complementares e necessários para sistemas mais evoluídos. Desta forma, começam nesta década a serem construídos os chamados Sistemas Híbridos. Estes sistemas permitem a construção de grandes sistemas que abrangem uma forma mais completa de representação do comportamento humano através da própria Inteligência Artificial.<sup>2</sup>

As redes neurais artificiais têm suas raízes nas áreas da neurociência, matemática, estatística, física, ciência da computação e engenharia. Suas aplicações podem ser encontradas em campos tão diversos quanto modelagem, análise de séries temporais, reconhecimento de padrões, processamento de sinais e controle;<sup>4</sup> além disso, tem sido recentemente introduzida no campo da ciência dos materiais.<sup>5-6</sup> As redes neurais, em geral, são modelos estatísticos flexíveis utilizados para a resolução de problemas não-lineares de alta complexidade.<sup>7</sup>

## **5.2 – Paralelo entre Redes Neurais Artificiais e Redes Neurais Naturais<sup>4</sup>**

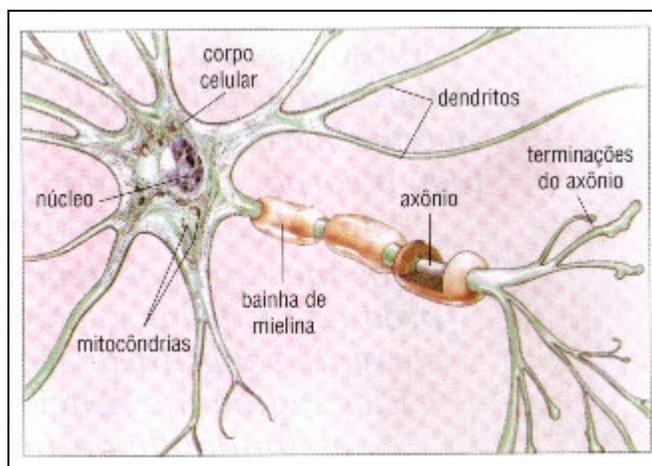
Ao longo do processo evolucionário, o homem desenvolveu seu cérebro, sua inteligência, sua capacidade de raciocínio, a linguagem e outras habilidades bem mais poderosas e complexas do que qualquer outra espécie. Isso quer dizer que o homem atingiu certo nível de conhecimento o que é fundamental para a sua sobrevivência, assim como para qualquer animal.

O cérebro humano é considerado o mais admirável processador baseado em carbono existente, sendo composto por aproximadamente 10 bilhões de neurônios. Todas as funções e movimentos do organismo estão relacionados ao funcionamento destas pequenas células. Os neurônios estão conectados uns aos outros através de sinapses, e juntos formam uma grande rede, chamada Rede Neural. As sinapses transmitem estímulos através de diferentes concentrações de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), e o resultado disto pode se alargar por todo o corpo humano. Esta grande rede proporciona uma fabulosa capacidade de processamento e armazenamento de informação.<sup>8-9</sup>

O sistema nervoso é formado por um conjunto extremamente complexo de neurônios. Nos neurônios a comunicação é realizada através de impulsos, quando um impulso é recebido, o neurônio o processa, e passado um limite de ação, dispara um segundo impulso que produz uma substância neurotransmissora o qual flui do corpo celular para o axônio (que por sua vez pode ou não estar conectado a um dendrito de outra célula). O neurônio que transmite o pulso pode controlar a frequência de pulsos aumentando ou diminuindo a polaridade na membrana pós-sináptica. Eles têm um papel essencial na determinação do funcionamento, comportamento e do raciocínio do ser humano. Ao contrário das redes neurais artificiais, redes neurais naturais não transmitem sinais negativos, sua ativação é medida pela frequência com que emite pulsos, frequência esta de pulsos contínuos e positivos. As redes naturais não são uniformes como as redes artificiais, e apresentam uniformidade apenas em alguns pontos do organismo. Seus pulsos não são síncronos ou assíncronos, devido ao fato de não serem contínuos, o que a difere de redes artificiais.

As RNAs (Redes Neurais Artificiais) são técnicas computacionais apresentadas por um modelo matemático inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes e que adquirem o conhecimento através da experiência. Uma grande RNA pode possuir centenas ou milhares de unidades de processamento; já um cérebro pode possuir bilhões de neurônios.

O sistema nervoso é formado por um conjunto extremamente complexo de células, os neurônios. Eles têm um papel essencial na determinação do funcionamento e comportamento do corpo humano e do raciocínio. Os neurônios são formados pelos dendritos, que são um conjunto de terminais de entrada, pelo corpo central, e pelos axônios que são longos terminais de saída (ver Figura 5.1).



**Figura 5.1** - Delineamento da estrutura dos constituintes de um neurônio biológico.<sup>10</sup>

Os modelos neurais procuram aproximar o processamento dos computadores ao cérebro. As redes neurais possuem um grau de interconexão similar a estrutura do cérebro e um computador convencional moderno a informação é transferida em tempos específicos dentro de um relacionamento com um sinal para sincronização.

A Tabela 5.1 traça um comparativo entre o cérebro humano e o computador.

**Tabela 5.1-** Quadro comparativo entre cérebro e o computador.<sup>8</sup>

Parâmetro	Cérebro	Computador
Material	Orgânico	Metal e plástico
Velocidade	Milisegundos	Nanosegundos
Tipo de Processamento	Paralelo	Sequencial
Controle de Processos	Distribuído	Centralizado
Número de elementos processados	$10^{11}$ a $10^{14}$	$10^5$ a $10^6$
Ligações entre elementos processados	10.000	<10

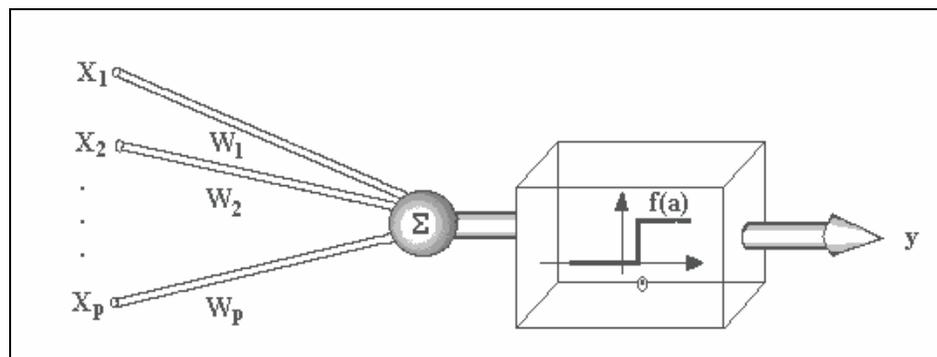
O mesmo paralelo pode ser traçado comparando o computador com as redes neurais (ver Tabela 5.2). Para tanto, a comparação não se dará com um computador específico encontrado no mercado, mas sim com o paradigma predominante nos computadores atuais.

**Tabela 5.2-** Comparativo entre computadores e neurocomputadores.<sup>8</sup>

Computadores	Neurocomputadores
Executa programas	Aprende
Executa operações lógicas	Executam operações não-lógicas, transformações, comparações
Depende do modelo ou do programador	Descobre as relações ou regras dos dados e exemplos
Testa uma hipótese por vez	Testa todas as possibilidades em paralelo (conjunto)

### 5.3- Histórico das Redes Neurais artificiais<sup>4-8-9</sup>

As primeiras menções sobre a neuro computação datam de 1943, em artigos de McCulloch e Pitts, em que sugeriam a construção de uma máquina baseada no cérebro humano. A Figura 5.2 ilustra o neurônio projetado por McCulloch e Pitts.

**Figura 5.2–** Ilustração esquemática do neurônio projetado por McCulloch e Pitts.<sup>8</sup>

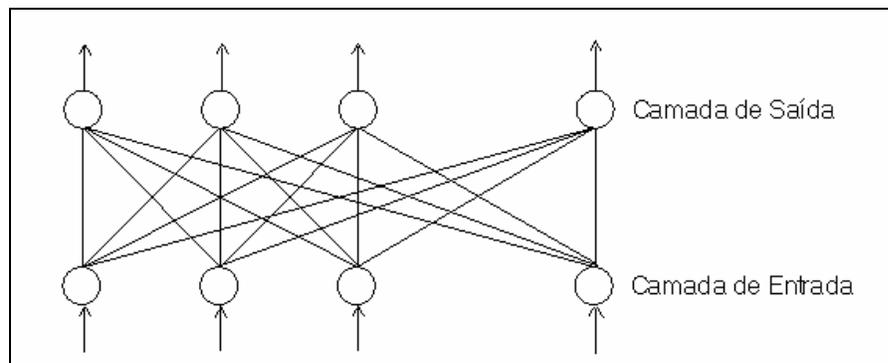
Muitos outros artigos e livros surgiram desde então, porém, por um longo período de tempo, pouco resultado foi obtido. Até que em 1949, Donald Hebb escreveu um livro intitulado "The Organization of Behavior" (A Organização do Comportamento) que perseguia a idéia de que o condicionamento psicológico clássico está presente em qualquer parte dos animais pelo

fato de que esta é uma propriedade de neurônios individuais. Suas idéias não eram completamente novas, mas Hebb foi o primeiro a propor uma lei de aprendizagem específica para as sinapses dos neurônios. Este primeiro e corajoso passo serviu de inspiração para que muitos outros pesquisadores perseguissem a mesma idéia. E embora muito tenha sido estudado e publicado nos anos que seguiram (1940-1950), estes serviram mais como base para desenvolvimento posterior que para o próprio desenvolvimento.

Também proveniente deste período de tempo foi a construção do primeiro neuro computador, denominado Snark, por Mavin Minsky, em 1951. O Snark operava com sucesso a partir de um ponto de partida técnico, ajustando seus pesos automaticamente, entretanto, ele nunca executou qualquer função de processamento de informação interessante, mas serviu de inspiração para as idéias de estruturas que o sucederam.

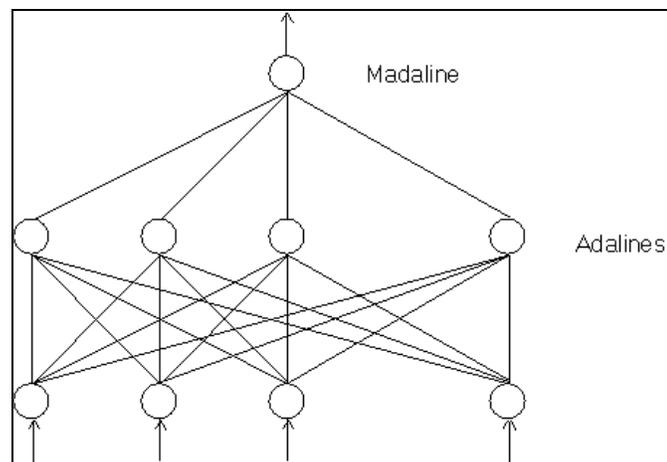
Em 1956 no "Darthmouth College" nasceram os dois paradigmas da Inteligência Artificial, a simbólica e o conexionista. A Inteligência Artificial Simbólica tenta simular o comportamento inteligente humano desconsiderando os mecanismos responsáveis por tal. Já a Inteligência Artificial Conexionista acredita que construindo um sistema que simule a estrutura do cérebro, este sistema apresentará inteligência, ou seja, será capaz de aprender, assimilar, errar e aprender com seus erros.

O primeiro neuro computador a obter sucesso (Mark I Perceptron) surgiu em 1957 e 1958, criado por Frank Rosenblatt, Charles Wightman e outros. Devido à profundidade de seus estudos, suas contribuições técnicas e de sua maneira moderna de pensar, muitos o vêem como o fundador da neuro computação na forma em que a temos hoje. Seu interesse inicial para a criação do Perceptron era o reconhecimento de padrões. A Figura 5.3 ilustra a rede de perceptrons proposta por Rosemblatt.



**Figura 5.3** - Rede de perceptrons proposta por Rosenblatt.<sup>8</sup>

Após Rosenblatt, Bernard Widrow, com a ajuda de alguns estudantes, desenvolveram um novo tipo de elemento de processamento de redes neurais chamado de Adaline (ver Figura 5.4), equipado com uma poderosa lei de aprendizado, que diferente do Perceptron ainda permanece em uso. Widrow também fundou a primeira companhia de hardware de neurocomputadores e componentes.



**Figura 5.4**– Ilustração representativa das redes Adaline e Madaline.<sup>5</sup>

Infelizmente, os anos seguintes foram marcados por um entusiasmo exagerado de muitos pesquisadores, que passaram a publicar vários artigos e livros que faziam uma previsão pouco confiável para a época, sobre máquinas tão poderosas quanto o cérebro humano que surgiriam em um curto espaço de tempo. Isto tirou quase toda a credibilidade dos estudos desta área.

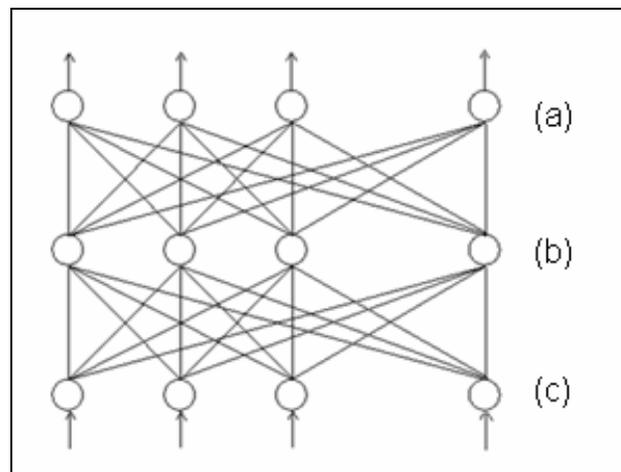
Um período de pesquisa silenciosa seguiu-se durante 1967 a 1982, quando poucas pesquisas foram publicadas devido aos fatos ocorridos anteriormente. Entretanto, aqueles que pesquisavam nesta época, e todos os que se seguiram no decorrer de treze anos conseguiram novamente estabelecer um campo concreto para o renascimento da área.

Nos anos 80, muitos dos pesquisadores foram bastante corajosos e passaram a publicar diversas propostas para a exploração de desenvolvimento de redes neurais bem como suas aplicações. Porém talvez o fato mais importante deste período tenha ocorrido quando Ira Skurnick, um administrador de programas da DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency) decidiu ouvir os argumentos da neuro computação e seus projetistas, e divergindo dos caminhos tradicionais dos conhecimentos convencionais, fundou em 1983 pesquisas em neuro computação. Este ato não só abriu as portas para a neuro computação, como também deu à DARPA o status de uma das líderes mundiais. Outra potência que emergiu neste período foi John Hopfield, renomado físico de reputação mundial, se interessou pela neuro computação, e escreveu artigos que percorreram o mundo todo persuadindo centenas de cientistas, matemáticos, e tecnólogos altamente qualificados a se unirem esta nova área emergente.

Apesar de um terço dos pesquisadores da área terem aderido à mesma pela influência de Hopfield, foi em 1986 que este campo de pesquisa expandiu-se com a publicação do livro *Parallel Distributed Processing (Processamento Distribuído Paralelo)* editado por David Rumelhart e James McClelland.

Em 1987 ocorreu em San Francisco a primeira conferência de redes neurais em tempos modernos, a IEEE International Conference on Neural Networks, e também foi formada a International Neural Networks Society (INNS). A partir destes acontecimentos decorreu a fundação do INNS journal em 1989, seguido do Neural Computation e do IEEE Transactions on Neural Networks em 1990.

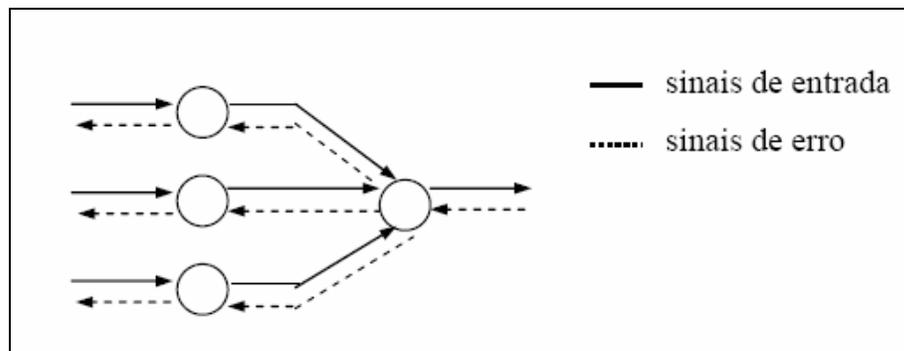
Rumelhart, Hinton e Williams introduziram o método Backpropagation. A estrutura deste método pode ser observada na Figura 5.5.



**Figura 5.5-** Estrutura do método Backpropagation; (a) camada de saída; (b) camada escondida; (c) camada de entrada.<sup>8</sup>

O algoritmo de retropropagação do erro (error backpropagation ou simplesmente backpropagation) é um algoritmo utilizado em perceptrons de múltiplas camadas e utiliza funções de transferência diferenciáveis e não-lineares em um treinamento supervisionado. A aprendizagem por backpropagation consiste, basicamente, em dois passos: um passo para frente, que é a propagação, e um passo para trás, a retropropagação. No passo para frente, um vetor é apresentado aos nós de entrada da rede e seu efeito se propaga através desta, da esquerda para a direita e de camada em camada. Um conjunto de saídas é produzido como resposta da rede.

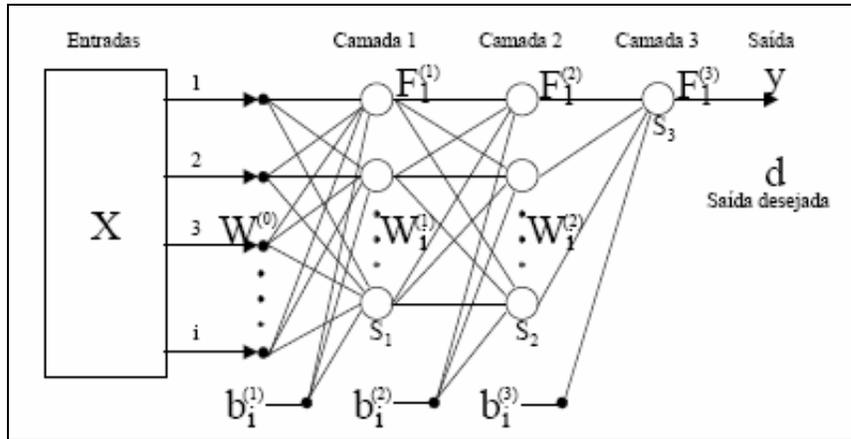
Durante este processo, os pesos sinápticos da rede são todos fixos. A resposta da rede é subtraída da resposta desejada e, então, determina-se o sinal de erro. Este sinal de erro é propagado para trás através da rede, contra a direção das conexões sinápticas. Os pesos são então ajustados de modo a se minimizar o sinal de erro. Na figura 5.6 tem-se a representação dos sinais de entrada, também conhecidos como sinais funcionais e de erro em um perceptron de múltiplas camadas.



**Figura 5.6-** Sinais funcionais e de erro de uma rede neural.

#### 5.4- Arquitetura da rede

Em relação ao funcionamento das RNAs, um modelo de neurônio artificial binário com limiar unitário foi portanto proposto inicialmente, no qual as entradas do neurônio são ponderadas pelos seus pesos com as saídas da célula anterior ou com os sinais de entrada da rede e que possui estado de ativação definido unicamente por uma função degrau. Mais tarde implementou-se um modelo de RNA que consiste de um conjunto de células conectadas e com uma regra de propagação. Cada neurônio recebe suas entradas com os pesos associados, vindas de outros neurônios ou de estímulo externo. A função de ativação é usualmente uma somatória agindo nas entradas da rede. Os valores bias de oposição são adicionados à somatória das entradas com pesos. O estado de ativação do neurônio é determinado pela função de saída ou de transferência e geralmente é uma função sigmodal. A saída do neurônio chega, pelas sinapses, até a próxima célula. Portanto, uma RNA completa é formada por um conjunto de neurônios dispostos em uma ou mais camadas, conectados por ligações de pesos variados. A rede Feedforward tem a propagação do sinal para frente, entre células de camadas adjacentes, até a última camada (saída) (SNNS User Manual, 1995). Na fase de treinamento da rede, há a determinação e a correção dos pesos e dos bias, para que a mesma responda de forma desejada. Uma rede neural completa é mostrada na Figura 5.6.



**Figura 5.6-** Representação de uma rede neural com três camadas.

A Figura 5.6 mostra uma rede neural de três camadas, onde: X =vetor de dados de entrada;  $W_i^{(m)}$  é a matriz de valores de peso associados a cada entrada i e a cada camada m;  $F_i^{(m)}$  é a função de transferência sigmoidal de cada unidade, associada à camada m.

$$F(h-b) = \frac{1}{1 + e^{(-h-b)/2}} \quad (5.1)$$

sendo:  $b_i^{(m)}$  = unidades bias; d = saída desejada da rede para cada entrada; y = saída fornecida pela rede neural para cada entrada.

A entrada para um dado neurônio i, com seus pesos correspondentes de uma certa camada m, é definida como:

$$h_i^{(m)} = \left[ w_i^{(m)} \right] x^{(m)} = \sum_{k=1}^M \left( w_{ik}^{(m)} \cdot x^{(m)} \right) \quad (5.2)$$

A saída do neurônio i na camada m é definida como:

$$y_i^{(m)} = F_i(h_i - b_i) \quad (5.3)$$

sendo  $y^{(m)} = X^{(m+1)}$  ou seja, a entrada da próxima camada é a saída da camada anterior. Existe um vetor de saídas y para cada vetor de entradas X. Os pesos w e bias b são atualizados para cada célula, até obter-se o critério de parada do treinamento (erro aceitável alcançado). A RNA

empregada utilizou o método de treinamento Backpropagation que realiza a busca por um erro aceitável.

Este erro é dado por:

$$E_p = \frac{(d - y)^2}{2} \quad (5.4)$$

O valor de  $E_p$  é calculado para as células de saída da rede. O objetivo deste algoritmo de treinamento é minimizar o erro de saída para cada vetor de entrada, ou seja, minimizar a distância quadrática entre as saídas desejadas e calculadas. A estrutura de processamento paralelo de informação permite a inclusão de conhecimento hábil no processo, a detecção e a classificação de sinais. A característica da RNA é, então, considerar o conhecimento adquirido durante o treinamento e responder a novos dados de entrada da maneira mais apropriada, concluindo assim, uma generalização do problema. A arquitetura da rede neural é definida pelos pesos correspondentes e esquema de conexões. Já o processo de aprendizagem envolve a mudança nos valores dos pesos, sendo o aspecto mais explorado em redes neurais artificiais.

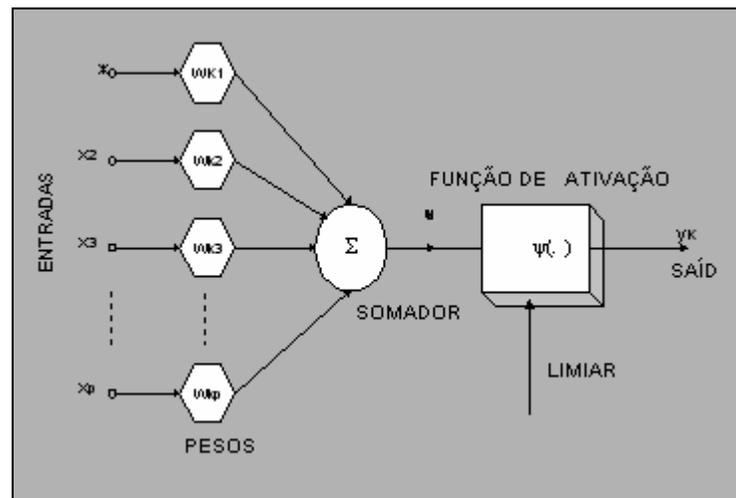
### **5.5- Funcionamento das redes neurais artificiais**

As redes neurais artificiais são criadas a partir de algoritmos projetados para uma determinada finalidade. É impossível criar um algoritmo desses sem ter conhecimento de modelos matemáticos que simulem o processo de aprendizado do cérebro humano.

Uma rede neural se assemelha ao cérebro em dois pontos; o conhecimento é obtido através de etapas de aprendizagem e pesos sinápticos são usados para armazenar o conhecimento. Uma sinapse é o nome dado à conexão existente entre neurônios. Nas conexões são atribuídos valores, que são chamados de pesos sinápticos. Isso deixa claro que as redes neurais artificiais têm em sua constituição uma série de neurônios artificiais que serão conectados entre si, formando uma rede de elementos de processamento.

A partir de uma rede neural formada, uma série de valores podem ser aplicados sobre um neurônio, sendo que este está conectado a outros pela rede. Estes valores (ou entradas) são multiplicados no neurônio pelo valor do peso de sua sinapse. Então, esses valores são somados. Se esta soma ultrapassar um valor limite estabelecido, um sinal é propagado pela saída (axônio)

deste neurônio. Em seguida, essa mesma etapa se realiza com os demais neurônios da rede. Isso quer dizer que os neurônios vão enfrentar algum tipo de ativação, dependendo das entradas e dos pesos sinápticos (ver Figura 5.7).



**Figura 5.7-** Representação da arquitetura de uma Rede Neural Artificial.<sup>17</sup>

Existem várias formas de se desenvolver uma rede neural. Ela deve ser montada de acordo com os problemas a serem resolvidos. Em sua arquitetura é determinado o número de camadas usadas (as camadas são formadas por neurônios) e a quantidade de neurônios em cada camada, o tipo de sinapse utilizado.

O processo de aprendizagem das redes neurais é realizado quando ocorrem várias modificações significantes nas sinapses dos neurônios. Essas mudanças ocorrem de acordo com a ativação dos neurônios. Se determinadas conexões são mais usadas, estas são reforçadas enquanto que as demais são enfraquecidas. É por isso que quando uma rede neural artificial é implantada para uma determinada aplicação, é necessário um tempo para que esta seja treinada.

Existem, basicamente, três tipos de aprendizado nas redes neurais artificiais;<sup>4</sup>

(i) Supervisionado; neste tipo, a rede neural recebe um conjunto de entradas padronizado e seus correspondentes padrões de saída, onde ocorrem ajustes nos pesos sinápticos até que o erro entre os padrões de saída gerados pela rede tenha um valor desejado;

(ii) Não-supervisionado; neste tipo, a rede neural trabalha os dados de forma a determinar algumas propriedades do conjunto de dados. A partir destas propriedades é que o aprendizado é constituído;

(iii) Híbrido; neste tipo ocorre uma junção dos tipos supervisionado e não-supervisionado. Assim, uma camada pode trabalhar com um tipo enquanto outra camada trabalha com o outro tipo.

O algoritmo utilizado neste trabalho como já mencionado, foi o Backpropagation, sendo o aprendizado supervisionado, ou seja, a entrada e saída desejadas para a rede são fornecidas por um supervisor externo. O objetivo é, através de um mecanismo de correção de erros, ajustar os parâmetros (pesos) da rede, de forma a encontrar uma ligação entre os pares de entrada e saída fornecidos. O treinamento ocorre em duas fases, onde cada fase percorre a rede em um sentido. Estas duas fases são chamadas de forward e backward. A fase forward é utilizada para definir a saída da rede para um dado padrão de entrada. A fase backward utiliza a saída desejada e a saída fornecida pela rede para atualizar os pesos de suas conexões a cada iteração.

### **5.6- Dificuldades encontradas**

A modelagem de uma rede neural depende da análise consistente de um sistema muitas vezes complexo, implicando em dificuldades para definir qual arquitetura melhor responde às necessidades do problema proposto e na escolha de quais dados são verdadeiramente relevantes para o processamento. Além da entrada, também devemos definir de forma ideal os parâmetros de aprendizagem, os pesos sinápticos e os níveis de bias, os quais são de severa importância para o processo de aprendizado.

Outra dificuldade encontrada seria a extração de regras justificativas da decisão tomada pela rede, as quais representariam o conhecimento adquirido durante o treinamento.

Contudo, pesquisadores vêm tentando minimizar as dificuldades da implementação das redes neurais através de algoritmos extratores de regras e o uso de sistemas híbridos, combinando, por exemplo, uma rede neural com algoritmos genéticos, para que se possa otimizar a definição das taxas de aprendizado, pesos sinápticos e níveis de bias, ou então utilizando algoritmos que façam extração de regras lógicas.

### 5.7- Considerações parciais

Apesar da neurocomputação ter iniciado com a computação programada nas décadas de 40 e 50, deve-se salientar que a implementação de uma rede neural naquela época era inviável, pois a fase de aprendizado, a fase mais difícil e demorada no desenvolvimento de uma rede, dependia (e ainda depende) de complicados algoritmos e de um número grande de iterações, algo que um ENIAC, (Eletronic Numerical Interpreter and Calculator) primeiro computador digital eletrônico de grande escala projetado por John W. Mauchly e J. Presper Eckert em 1946, não teria condições de fazê-lo. Hoje, com a tecnologia dos chips VLSI (Very Large Scale Integration) a implementação das redes neurais tem sido facilitada. Os chips VLSI são chips muito confiáveis, rápidos, baratos, compactos, consomem pouca energia e dissipam menos calor que os antigos chips.

Todas as informações aqui expostas nos levam a crer que o campo de redes neurais artificiais é acima de tudo extremamente vasto e promissor. Por ser um assunto que surgiu a muito tempo atrás, ganhou muita credibilidade, e devido às novas descobertas relacionadas a ela a cada instante, tornou-se bastante atrativo para profissionais de domínios distintos, tornando-se um assunto interdisciplinar. Os conhecimentos obtidos até hoje atraem o interesse de profissionais tais como psicólogos, neurofisiologistas, engenheiros, cientistas cognitivos, e cientistas da computação, que buscam cada um em sua área, novos caminhos através da computação neural.

Atualmente, redes neurais têm sido utilizadas em biossensores para o emprego de diferentes enzimas (seletivas para determinados compostos) e diferentes processos de imobilização, assim como o tratamento dos dados experimentais através de métodos quimiométricos (redes neurais), desponta como uma grande perspectiva para a determinação simultânea e "*in situ*" de todas as espécies presentes em amostras de interesse.<sup>18</sup>

O método de treinamento utilizado neste trabalho foi do tipo backpropagation e funciona pelo ajuste de valores de pesos que estão associados às conexões das sucessivas camadas de uma rede MLP (Multi-Layer Perceptrons). O algoritmo fornece uma forma de definir o erro dos nodos das camadas intermediárias para a mudança nos pesos em uma rede feedforward (propagação dos sinais para frente). Esta rede é treinada através do fornecimento de padrões de entrada e de saída

desejada. A maioria dos métodos de aprendizado para RNAs do tipo Perceptron de múltiplas camadas utilizam variações deste algoritmo.<sup>19-20-21</sup>

O algoritmo Backpropagation é supervisionado, ou seja, a entrada e saída desejadas para a rede são fornecidas por um supervisor externo. O objetivo é, através de um mecanismo de correção de erros, ajustar os parâmetros (pesos) da rede, de forma a encontrar uma ligação entre os pares de entrada e saída fornecidos. O treinamento ocorre em duas fases, onde cada fase percorre a rede em um sentido. Estas duas fases são chamadas de forward e backward. A fase forward é utilizada para definir a saída da rede para um dado padrão de entrada. A fase backward utiliza a saída desejada e a saída fornecida pela rede para atualizar os pesos de suas conexões a cada iteração.<sup>19-20-21</sup>

## 5.8– Referências

- [1] SABBATINI, R.M.E. **Informática Médica**. Disponível em <<http://www.sabbatini.com/renato/papers/checkup-18.htm>> Acessado em 24 mar.2008.
- [2] COIERA, E.W. **Inteligência Artificial na Medicina** Disponível em <<http://dfm.ffclrp.usp.br/infobio/ceib/texto4.php>> Acessado em 24 mar.2008.
- [3] GONGORA, A.D. **O Que é Inteligência Artificial**. Disponível em <<http://www.pr.gov.br/batebyte/edicoes/2002/bb119/estagiario.htm>> Acessado em 24 mar.2008.
- [4] HAYKIN S. **Redes Neurais: Princípios e Práticas** ed. BOOKMAN, p. 900; 2000.
- [5] ZHANG, Z., FRIEDRICH, K., “Artificial Neural Networks Applied to Polymer Composites: A Review”, **Composites Science and technology**, v. 63, p. 2029-44, 2003.
- [6] GOH, A.T.C., “Back-propagation Neural Networks for Modeling Complex Systems”, **Artificial Intelligence in Engineering**, v. 9, p. 143-51, 1995.
- [7] BAHR, H.B., HORROCKS, D.H., “Dynamic Weight Estimation Using an Artificial Neural Network”, **Artificial Intelligence in Engineering**, v. 12, p. 135-9, 1998.
- [8] **Uma introdução às Redes Neurais**. Disponível em <<http://www.din.uem.br/ia/neurais/>> Acessado em 24 mar.2008.
- [9] **Neural Networks**. Disponível em <<http://www.zsolutions.com/Neural.htm>> Acessado em 24 mar.2008.

- [10] HERNANDEZ, E.D.M. **Redes Neurais**. Disponível em < <http://www.lps.usp.br/neo/Navega.htm>> Acessado em 24 mar.2008.
- [11] YANG, H.J., ROE, B.P., ZHU, J., Studies of Stability and Robustness for Artificial Neural Networks and Boosted Decision Trees. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 74, n. 2, p. 342-9, 2007.
- [12] RUMELHART, D. E.; MCCLELLAND, J. L. Parallel Distributed Processing, The MIT Press. v. 1, 1986.
- [13] HERTZ, J.; KROGH, A.; PALMER, R.G. Introduction to the Theory of Neural Computation, Adison-Wesley Pub. Co, 1991.
- [14] BRYSON, A.E.; Ho, Y. Applied Optimal Control, Blaisdell, 1969.
- [15] WERBOS, P. Beyond Regrsson: New Tools for Prediction and Analysis in the Behavioral Sciences, PhD thesis, Harvard University, 1974.
- [16] PARKER, D. Learning Logic: Casting the Cortex of the Human Brain in Silicon. Technical Report, Center for Computational Research in Economics and Management Science, MIT, 1985.
- [17] MELO, J. D. **Aspectos da Implementação de Redes Neurais**. Disponível em <[http://www.dimap.ufrn.br/~ivan/reconfiguraveis/Jorge/hard\\_NN.ppt#256,1](http://www.dimap.ufrn.br/~ivan/reconfiguraveis/Jorge/hard_NN.ppt#256,1)> Acessado em 22 mar. 2008.
- [18] ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, São Paulo, jan./fev. 2001.
- [19] KOSKO, B. **Neural networks and fuzzy systems**. Editora Pretince-Hall international Editions. 1992, 450 p.
- [20] BRAGA, A.P.; CARVALHO, A.C.L.F.; LUDERMIR, T. B. **Redes Neurais Artificiais: Teoria e aplicações**. Editora LTC, 262 p.
- [21] REZENDE, S. O. **Sistemas Inteligentes: Fundamentos e aplicações**. Editora Manole, 525p., 2003.

## Capítulo 6- Objetivos da dissertação

---

De origem petroquímica, os polímeros sintéticos afetaram não somente as engenharias, mas, principalmente, a medicina, a biotecnologia e a área farmacêutica. Esses materiais orgânicos tornaram possível a obtenção de plataformas para a imobilização de enzimas; tornando possível o desenvolvimento de dispositivos que permitem atualmente a monitoração de vários processos biológicos indispensáveis para a manutenção da qualidade de vida do paciente.

No final do século XX, surgiram os polímeros altamente ramificados denominados de dendrímeros. Tais sistemas macromoleculares causaram uma verdadeira revolução na medicina clínica e farmacêutica, uma vez que mimetizam vários processos biológicos vitais para o ser humano.

Os dendrímeros são considerados atualmente como um dos blocos fundamentais da química nanoscópica. Tais compostos isomoleculares possuem um elevado nível de organização estrutural e marcam o início de uma nova era na ciência macromolecular: a era da química nanoscópica. A elevada densidade de grupos funcionais na superfície dos dendrímeros torna estes compostos muito interessantes para o projeto de dispositivos biossensores. Neste sentido, a aplicação dos dendrímeros do tipo PGLD, CHD e PPID com propriedades biocompatíveis, parece ser uma alternativa promissora para a obtenção de biossensores implantáveis. Entretanto, resta verificar a que ponto tais materiais afetam as propriedades cinéticas das enzimas, os biocatalisadores fundamentais para o desenvolvimento de dispositivos biossensores.

A pesquisa desenvolvida neste trabalho é multidisciplinar e envolve a biofísica de nanointerfaces. O objetivo geral é o estudo do desenvolvimento de interfaces multi-biofuncionais baseadas nas enzimas GOx, COx e Urease para a monitoração dos hemometabólitos glicose, uréia e colesterol.

Os objetivos específicos deste trabalho envolveram a avaliação da performance dos biossensores obtidos procurando-se avaliar as seguintes variáveis com a finalidade de comparar as atividades das formas solúvel e imobilizada das enzimas GOx, COx e Urease:

- (a) Estudar a atividade catalítica das formas solúvel e imobilizada das enzimas GOx, COx e Urease frente a diferentes concentrações de seus respectivos substratos.

- (b) Comparar o desempenho catalítico dos dispositivos biossensores de glicose, uréia e colesterol em função do dendrímero utilizado.
- (c) Investigar a estabilidade dos dispositivos biossensores desenvolvidos.
- (d) Analisar com base na cinética de Michaelis-Menten o dendrímero mais adequado para a obtenção de dispositivos biossensores dos hemometabólitos glicose, uréia e colesterol.
- (e) Propor a utilização de uma rede neural artificial para aquisição e tratamento de dados de um biossensor multienzimático.

## Capítulo 7– Procedimento experimental

---

O procedimento experimental foi dividido basicamente em três etapas. A primeira refere-se ao processo de imobilização das enzimas GOx, COx e urease nos dendrímeros PGLD, CHD e PPID, previamente sintetizados, purificados e caracterizados por outros mestrandos do grupo de biomateriais da Unifei.<sup>1-2</sup>

Na segunda etapa do trabalho é descrita a obtenção dos biossensores através da técnica de *template*, utilizando-se a deposição eletroquímica de nanotubos de polianilina na presença dos bioconjugados dendríticos. A terceira etapa do trabalho refere-se à caracterização eletroquímica dos biossensores obtidos, bem como, o estudo de sua performance.

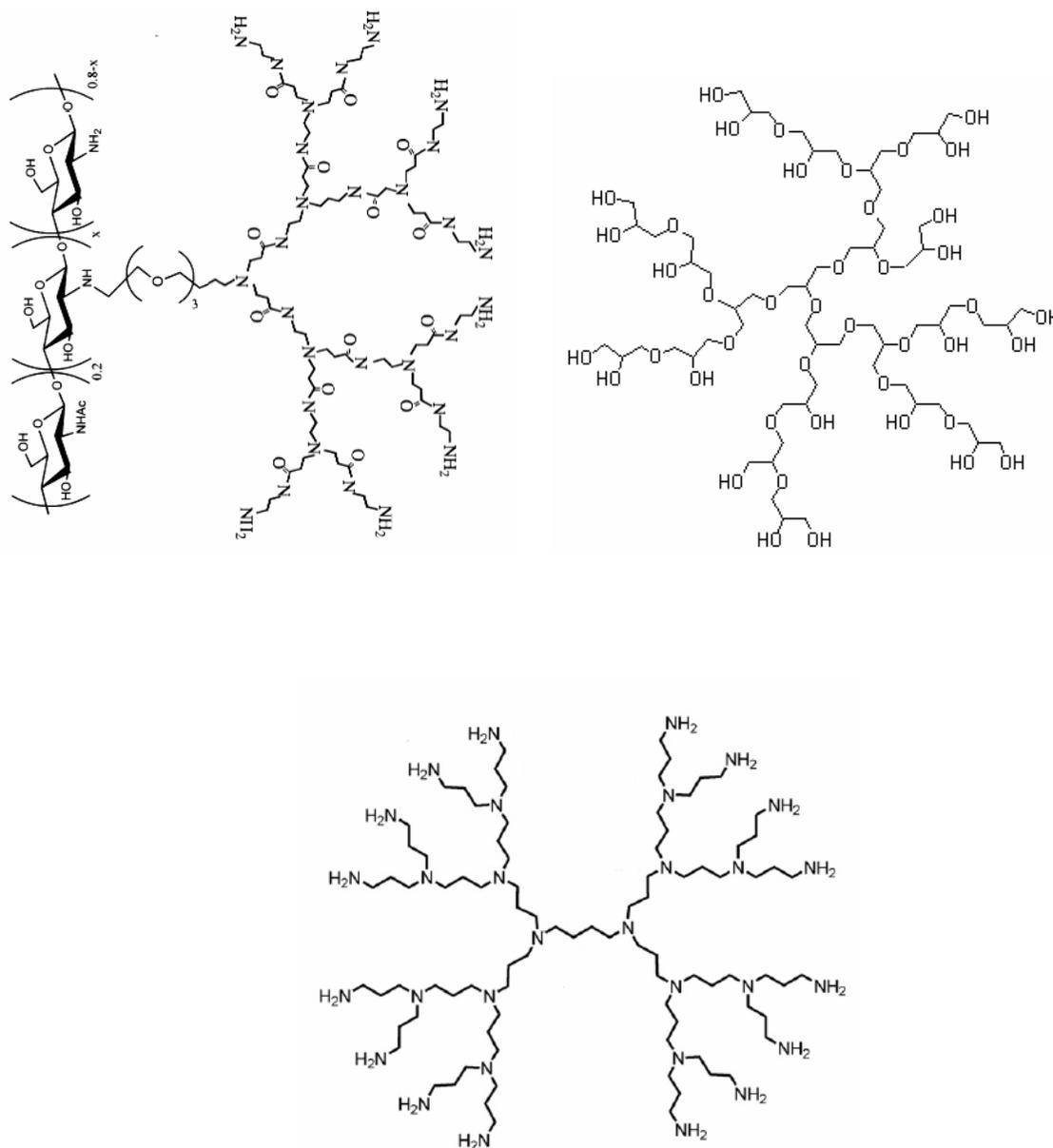
### 7.1- Reagentes

A anilina foi bi-destilada antes de sua utilização. As enzimas GOx (*Aspergillus niger*, Tipo X-s, pó liofilizado com atividade 100.000-250.000 U/g de sólido), COx (*Streptomyces* sp, pó liofilizado com atividade  $\geq 20$  U/mg sólido), urease (*Canavalia ensiformis*-Jack bean, Tipo IX, pó liofilizado com atividade 50.000-100.000 U/g sólido) e os respectivos substratos (glicose, colesterol e uréia) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Brasil). Todos os reagentes bioquímicos foram utilizados sem tratamento prévio. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando-se água bi-destilada e desionizada (Milli-Q).

### 7.2- Síntese dos dendrímeros PGLD, CHD e PPID e preparo dos bioconjugados

Os dendrímeros PGLD, CHD e PPID foram os mesmos sintetizados, purificados e caracterizados anteriormente pelo grupo de biomateriais da Unifei.<sup>3-4-5-6</sup>

Todos os dendrímeros (Figura 7.1) estudados neste trabalho podem em princípio, serem utilizados como suporte para imobilização das enzimas. Isso se deve ao grande percentual de grupos funcionais nas extremidades da macromolécula. A atenção no processo de imobilização se volta para a atividade enzimática, que pode ser afetada, causando a perda total ou parcial da atividade, que pode ser atribuída a inúmeros fatores, como propriedades da própria enzima, do suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais.



**Figura 7.1-** Esquema das arquiteturas dendríticas; CHD, PGLD e PPID, respectivamente.

O processo de imobilização das enzimas GOx, COx e urease seguiu uma adaptação das técnicas já padronizadas pelo grupo de pesquisa em biomateriais da Unifei para o preparo de suportes para utilização em biotecnologia.<sup>7</sup>

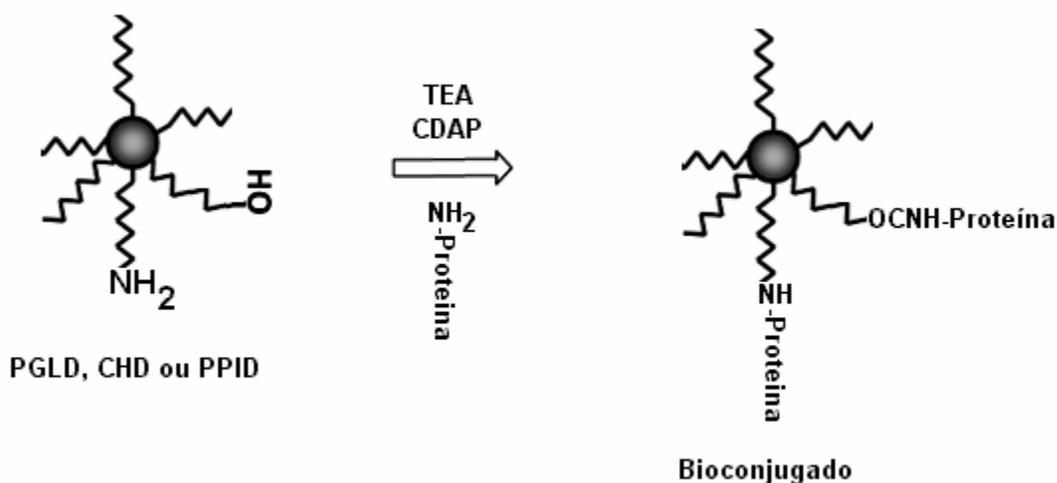
O procedimento para imobilização das enzimas GOx, COx e urease foram iniciados utilizando-se 200 mg dos respectivos dendrímeros, os quais foram inicialmente misturados com 25 mL de água desionizada em béquer de 50 mL e a solução foi mantida sob agitação magnética

por 2 horas a 4 °C. Em seguida os dendrímeros foram ativados pela adição de 0,5 mL de tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (CDAP, Sigma-Aldrich) e 0,5 mL de trietil amina (TEA, Sigma Aldrich). O sistema foi mantido sob agitação constante por 2 minutos e em seguida dialisado empregando membrana de celofane por três dias contra solução aquosa de NaCl 0,2 mol/L e dois dias contra água destilada e desionizada. Após a diálise, a amostra do bioconjugado foi liofilizada, e em seguida, a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro UV/VIS (Varian, Cary 50) a 280 nm permitiu o cálculo da quantidade de enzima imobilizada nos respectivos dendrímeros. A Figura 7.2 ilustra o processo de imobilização das proteínas GOx, COx e urease nos dendrímeros PGLD, CHD e PPID.

A eficiência de imobilização das enzimas nos dendrímeros foi expressa em termos de índice de imobilização (IM) definido por:

$$IM = \left( \frac{PT_o - PT_s}{PT_o} \right) \times 100$$

sendo  $PT_o$  e  $PT_s$  as quantidades de proteína adicionada (antes da imobilização) e remanescente no sobrenadante, respectivamente. Neste trabalho o IM para as enzimas GOx, COX e urease foi de 60%.



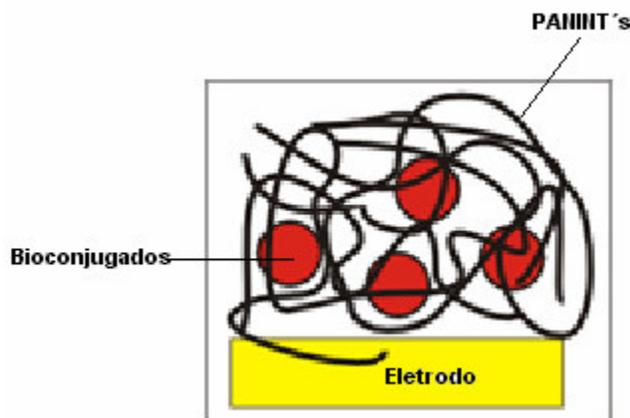
**Figura 7.2-** Ilustração do processo de imobilização das enzimas GOx, CHD e urease nos dendrímeros.

### 7.3- Preparo dos eletrodos enzimáticos

O método de preparo dos biossensores enzimáticos baseou-se no método bastante explorado nas últimas décadas denominado de síntese *template*, a qual consiste em uma reação do tipo hospedeiro/convidado. Neste caso, a síntese do convidado é realizada no interior de cavidades ou poros denominados de estruturas hospedeiras, criadas pela corrosão eletroquímica de um filme de alumínio.

Para o preparo dos eletrodos enzimáticos foram utilizados filmes de alumínio de área  $0,75 \times 2,05 \text{ cm}^2 \times 30 \text{ }\mu\text{m}$  (Alcoa, 99,9%). Inicialmente os filmes foram lavados com solução de lauril sulfato de sódio a 1% (m:v) em banho de ultra-som e em seguida lavados com água destilada. Os filmes foram finalmente lavados com álcool etílico e seco sob vácuo, à temperatura ambiente (25°C) por 24 horas antes de sua utilização.

A solução para a polimerização eletroquímica, consistiu de anilina bidestilada (0,1M, Sigma-Aldrich), o dendrímero bioconjugado com os biocatalizadores e ácido p-tolueno sulfônico (1M, Sigma/Aldrich) em solução tampão fosfato de sódio salino (NaPBS) (0.1M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $0.05 \text{ mol.L}^{-1}$  NaCl, pH 7.4) como eletrólito. O crescimento dos nanotubos foi obtido em um ciclo potencial de -100mV e 30 mC versus um eletrodo saturado de calomelano, de forma a se obter PANINT's no seu estado reduzido. Após o processo de deposição eletroquímica, os eletrodos foram lavados com solução PBS pH 7,4 e armazenado em NaPBS por 24 h para remover qualquer excesso de monômero residual ou bioconjugados que não tenham sido imobilizados completamente. A microestrutura dos eletrodos enzimáticos obtidos foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um microscópio MEV modelo JEOL XL 30 foi utilizado no presente trabalho. As amostras foram previamente recobertas com Au para o respectivo contato. A Figura 7.3 ilustra a imobilização dos bioconjugados (vermelho) nos nanotubos de polianilina.



**Figura 7.3-** Ilustração do biossensor preparado neste trabalho através da técnica de imobilização física dos bioconjugados nos nanotubos de polianilina.

A bioatividade dos eletrodos foram medidas amperometricamente pela corrente produzida no eletrodo enzimático devido à formação de peróxido de hidrogênio gerado pela catálise enzimática da GOx e COx ou formação de íons  $\text{NH}_4^+$  (urease). Neste caso, a corrente elétrica produzida demonstrou ser proporcional à concentração dos substratos. Um volume de 10  $\mu\text{L}$  da solução do substrato considerado foi depositado sobre o eletrodo trabalho (eletrodos enzimáticos baseados nos dendrímeros bioconjugados). Um eletrodo saturado de calomelano (SCE, Ag/AgCl) foi utilizado como eletrodo de referência. Para eliminar os efeitos de potencial e oscilações de pH e temperatura na condutividade dos PANINT'S considerou-se a corrente resposta do biossensor como a diferença entre a corrente de fundo e a corrente contendo a solução do analito a se dosar. O fluxo de corrente medido no biossensor resultante da atividade enzimática foi medido com o auxílio de um eletrômetro programável (Keithley modelo 237), de acordo com a Figura 7.4.



**Figura 7.4**– Unidade fonte medidora Keithley modelo 237 utilizado na caracterização do dispositivo biossensor.

As curvas das correntes em função da tensão (curva  $I \times V$ ) foram obtidas através de uma fonte tensão/corrente Keitlhey, modelo 237 (K237). O Keitlhey K237 é uma unidade fonte-medidora de alta precisão, fundamental à realização de medidas de tensão de 10V a 1100 V, e medidas de corrente de 10 fA a 100 mA, escalas estas fundamentais às medidas de baixos sinais e quaisquer outras que exijam precisão. Para o controle automatizado de aquisição de dados, este instrumento possui interface IEEE-488 padrão, o que permite a programação via computador.

Quando programado como fonte de tensão, o amperímetro conecta-se em série com a fonte de tensão e a saída. Quando programado como fonte de corrente, o voltímetro conecta-se em paralelo entre fonte de corrente e saída.

Como proteção ao circuito externo, o modelo K237 possui um limite de concordância programável, o qual nunca é excedida pela unidade fonte-medidora. Ajustando-se uma corrente de concordância apropriada pode-se prevenir dissipação excessiva de energia do dispositivo. Ajustando-se uma tensão de concordância apropriada pode-se proteger o dispositivo de uma sobretensão.

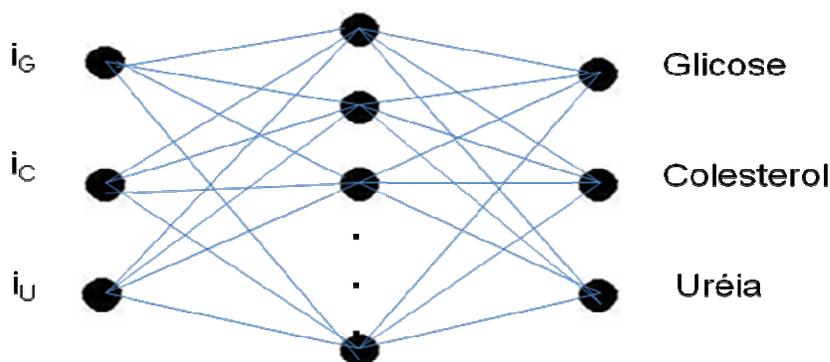
A escala de concordância selecionada é também a escala máxima medida. Em todo caso, quando a função AUTORANGE está habilitada, a unidade fonte-medidora sempre irá para a menor, mais sensível, escala possível para que a medição seja feita.

O controle e a aquisição de dados foram feitos utilizando-se um sistema automatizado baseado na plataforma HP VEE 4.0, software com linguagem orientada a objeto e que controla os instrumentos de medição através de interfaces de comunicação GPIB 488.

O HP4284A oferece medidas em todas as frequências com resolução de seis dígitos e níveis de sinal de teste de 5mV a  $2V_{rms}$  e  $50\mu A$  a  $20mA_{rms}$ ; possui interface IEEE-488 padrão, o que permite programação via microcomputador.

A aquisição de dados e o controle dos equipamentos durante os experimentos foram realizados utilizando-se de programas elaborados na plataforma Labview 6.1, um software que utiliza linguagem orientada a objeto para realização dos procedimentos de controle em ambientes de pesquisa, permitindo elaborar tais sistemas sem a utilização de controladores específicos, pois é capaz de simulá-los através de rotinas de software.

Para obtenção da rede neural foi utilizado como ferramenta o Nets 3.0, sendo trabalhado em linguagem C:. A topologia da RNA utilizada foi um perceptron multicamada com uma camada de entrada contendo três neurônios, uma camada escondida com dez neurônios e três neurônios na camada de saída. Os sinais de entrada da rede são as correntes geradas no biossensor presente nos conjuntos determinados, como pode ser observado na Figura 7.5. Foram ensaiados vários números de neurônios na camada escondida, buscando a otimização dos resultados. Também, várias taxas de aprendizagem foram utilizadas. A cada simulação, os pesos sinápticos iniciais foram escolhidos aleatoriamente, utilizando-se um gerador de números randômicos no intervalo ] -1 , 1 [ , seguindo uma distribuição uniforme de média 0 (zero). A função de ativação utilizada foi a função sigmóide tangente hiperbólica.



**Figura 7.5- Ilustração da configuração da rede neural artificial utilizada neste trabalho.**

#### 7.4- Referências

- [1] GIAROLA, V. M. **Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis**. 2007, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.
- [2] DE QUEIROZ, A.A.A.; ABRAHAM, G.A.; CAMILLO, M.A.P.; HIGA, O.Z.; SILVA, G.S.; FERNÁNDEZ, M.M.; ROMÁN, J.S. Physicochemical and antimicrobial properties of boron-complexed polyglycerol–chitosan dendrimers, **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 17, n. 6, p. 689–707, 2006.
- [3] DE QUEIROZ A.A.A.; FERNANDES, E.G.R.; ABRAHAM, G.A.; ROMAN, J.S.; Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. **Journal of Materials Science**. Materials in Medicine, Estados Unidos, v. 17, p. 105-111, 2006.
- [4] DE QUEIROZ A.A.A.; ABRAHAM, G.A.; CAMILO, M. A. P.; HIGA, O.Z.; SILVA, G.S. ; FERNÁNDEZ, M.D.M.; ROMAN, J. S. Physicochemical and antimicrobial properties of boron-complexed polyglycerol-chitosan dendrimers. **Journal of Biomaterials Science**. Polymer Edition, Netherlands, v. 17, n. 6, p. 689-707, 2006.
- [5] VIEIRA, N.C.S. Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), 2006. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.

- [6] FERNANDES, E.G.R. **Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose**. 2005. 175 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Itajubá. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A.A. de Queiroz.
- [7] DE QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VITOLLO, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. **J Appl Polym Sci**; v.84, p.767-77, 2002.

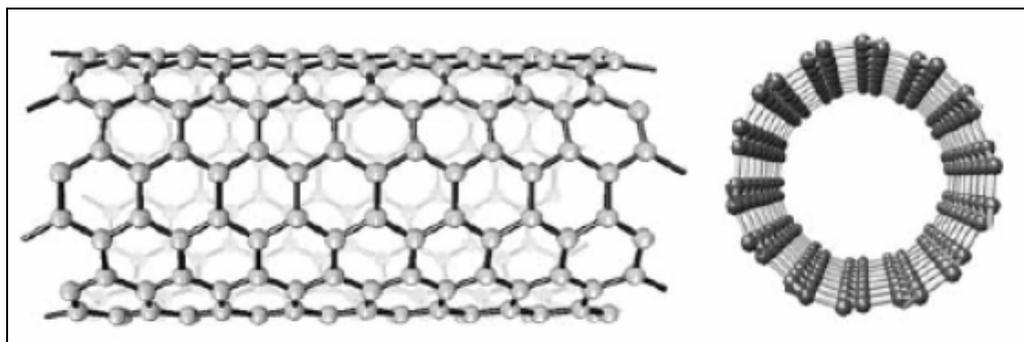
## Capítulo 8- Resultados e discussões

---

### 8.1- Caracterização dos nanotubos de PANI

A nanotecnologia desperta atualmente um grande interesse da comunidade científica, e ao longo das últimas décadas, muito esforços foram feitos no sentido de se atingir um controle efetivo a nível atômico e molecular na produção de nanomateriais. Um dos frutos mais significativos relativo ao interesse pela nanotecnologia está a obtenção dos nanotubos de carbono (NTC), observados pela primeira vez por Sumio Iijima em 1991 durante os estudos da superfície dos eletrodos de grafite utilizados para a síntese de fulerenos.<sup>1-2</sup>

Imediatamente após o descobrimento de NTC's na forma de paredes múltiplas, nanotubos de carbono de paredes simples foram encontrados.<sup>3-4</sup> A Figura 8.1 mostra uma ilustração da configuração atômica de uma seção de um nanotubo de carbono.



**Figura 8.1**– Vista lateral e frontal da configuração atômica de uma seção de um nanotubo de carbono. A estrutura cristalina deste tubo particular é denotada como (7, 7).<sup>5</sup>

Os NTC's possuem propriedades especiais devido à sua dimensionalidade, estrutura e topologia. A constituição básica do retículo do nanotubo é as ligações covalentes C-C, como nas camadas do grafite. Portanto, nos nanotubos o carbono também se encontraria com uma hibridização de orbitais atômicas do tipo  $sp^2$ .<sup>6</sup>

O desenvolvimento de biossensores e dispositivos similares baseados em nanotubos de carbono ainda encontra-se em sua fase inicial a nível tecnológico em vários países. De fato, ainda não existe uma técnica reprodutiva que garanta a produção de nanotubos de caráter exclusivamente metálico ou semicondutor. Ao mesmo tempo a dopagem de nanotubos ainda está

longe de ser entendida, sendo que somente recentemente, após mais de uma década após a primeira observação experimental dos nanotubos, começam a aparecer estudos de dopagem de nanotubos de parede simples (SWNT) de forma a conferir as propriedades elétricas de interesse para utilização destes nanomateriais em diversos setores de interesse da indústria eletro-eletrônica e biomédica. Entretanto, o processo de dopagem ainda está longe de estar dominado. A primeira etapa de um processo de desenvolvimento de dispositivos à base de nanotubos passa obrigatoriamente pelo domínio das técnicas de crescimento.

Uma classe de nanotubos, que vem despertando um significativo interesse da comunidade científica é a de nanotubos de polímeros condutores. Neste trabalho, nanotubos de PANI foram utilizados como mediadores de elétrons no processo de obtenção de biossensores de glicose, colesterol e uréia.

Os nanotubos de polianilina e seus derivados formam uma classe de polímeros condutores em relação ao processo de dopagem. Este material pode ser dopado por protonação, isto é, sem que ocorra alteração do número de elétrons (oxidação/redução) associados à cadeia polimérica. A polianilina pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, dos quais a forma esmeraldina, 50% oxidada, é a mais estável.<sup>7</sup>

O produto da oxidação da anilina foi primeiramente preparado em 1862, porém suas propriedades foram reconhecidas somente cerca de 100 anos depois (década de 80 do século 20), despertando um interesse particular devido ao baixo custo de produção, facilidade de síntese e alto rendimento. As sínteses da polianilina e do polipirrol podem ser realizadas de maneiras semelhantes sob a ação de um agente oxidante. No caso da polianilina, é essencial manter um meio com  $\text{pH} \approx 1,0$ .

A forma base esmeraldina (isolante) do polímero pode reagir com soluções de ácidos (HCl) resultando na forma sal esmeraldina (condutora). A reação de protonação ocorre principalmente nos nitrogênios imínicos da polianilina ( $-\text{N}=\text{}$ ). Esse estado contém duas unidades repetitivas, a amina-fenileno e a imina-quinona. Além da elevada condutividade elétrica, que chega à ordem de  $10^2 \text{ Scm}^{-1}$ , outra propriedade interessante da polianilina é exibir diferentes colorações quando se variam as condições de pH ou o potencial elétrico (ver Tabela 8.1).

**Tabela 8.1**– Os três estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina.<sup>8</sup>

Estado de oxidação	Estrutura	Cor*	Característica
Leucoesmeraldina		amarela 310	isolante completamente reduzida
Sal de esmeraldina		verde 320, 420, 800	condutora parcialmente oxidada
Base esmeraldina		azul 320, 620	isolante parc. oxidada
Pernigranilina		púrpura 320, 530	isolante compl. oxidada

\* Os valores numéricos referem-se ao comprimento de onda (em nanômetros) onde a absorção é máxima.

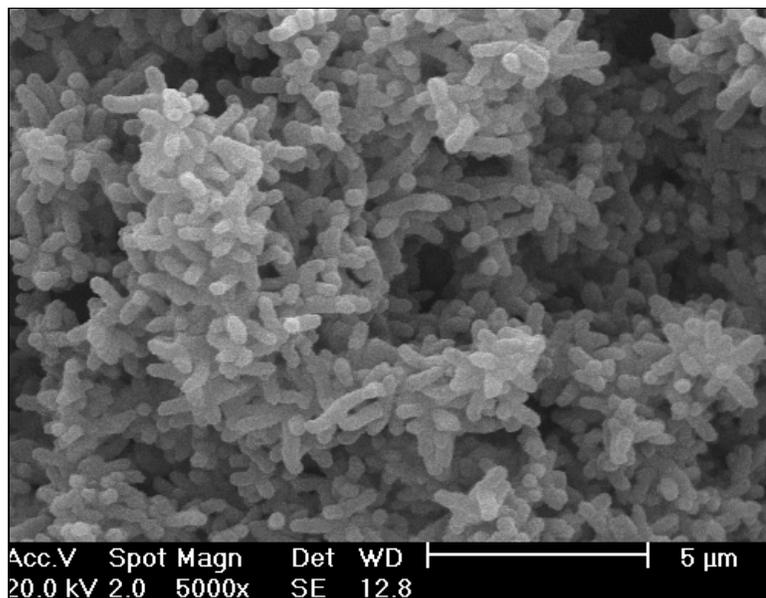
Os nanotubos de polianilina podem ser sintetizados por três métodos de polimerização: química, eletroquímica e fotoeletroquímica.<sup>9</sup> Dentre esses métodos, a síntese química é a mais utilizada e industrialmente é a mais vantajosa por possibilitar a produção de grandes quantidades de material. Algumas rotas de síntese são muito simples e podem ser adaptadas para escala piloto ou industrial (poli(*p*-fenil vinileno), polipirrol e polianilina).<sup>9-10</sup>

Neste trabalho, os biossensores de hemometabólitos foram obtidos após deposição de eletroquímica de PANINT's sobre um filme fino de alumínio de acordo com metodologia desenvolvida pelo grupo de biomateriais da Unifei.<sup>11</sup> Como consequência da nucleação de monômeros de anilina nos poros de alumínio formados durante o processo de oxidação eletroquímica, nanotubos de polianilina formando uma rede interconectada foram obtidos sobre a matriz metálica.

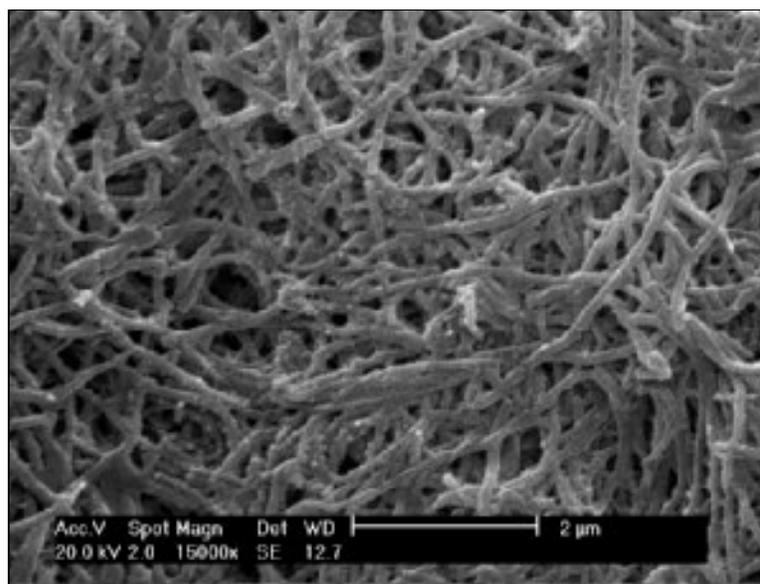
A Figura 8.2 ilustra a micrografia MEV de nanotubos de PANI depositados no eletrodo de alumínio (Al). A eletrodeposição de PANINT's foi efetuada na presença dos dendrímeros bioconjugados com as respectivas proteínas GOx, COx, Urease com a finalidade específica de obter-se o dispositivo biossensor.

Verificou-se que os PANINT's obtidos neste trabalho, apresentam diâmetros de aproximadamente 90 nm. A análise das fibras de PANINT's indicou comprimentos de 1000 nm e elevada área superficial. Verificou-se que a presença dos dendrímeros bioconjugados induz a

formação de aglomerados de redes interconectadas. Entretanto, estudos de microscopia de transmissão devem ser efetuados a fim de se caracterizar de modo mais adequado a estrutura dos nanotubos de PANI obtidos neste trabalho.



(A)



(B)

**Figura 8.2-** Micrografia MEV de PANINT's contendo os dendrímeros bioconjugados depositados eletroquimicamente em eletrodos de Al. Ampliações: 5000× (A) e 15.000 x (B).

## 8.2- Caracterização dos Dendrímeros

O peso molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros de maior importância para a determinação e explicação do comportamento físico destes sistemas macromoleculares.

Dendrímeros de peso molecular muito baixo geralmente apresentam uma menor área superficial, indesejável para o projeto de biossensores, enquanto que os de peso molecular muito elevado são muito pouco solúveis e, geralmente, não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.<sup>12-13</sup>

A cromatografia de permeação em gel (GPC), uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular, é uma técnica de separação introduzida por Moore em 1964 para a determinação da distribuição de pesos moleculares de um polímero.<sup>14</sup> A técnica GPC utiliza colunas empacotadas com géis de poliestireno ou polietileno glicóis reticulados de diferentes porosidades constituindo a fase estacionária. O polímero dissolvido em um solvente conveniente é separado de acordo com seu volume hidrodinâmico, ou seja, moléculas pequenas tendem a permanecer na fase estacionária enquanto que moléculas grandes são excluídas preferencialmente da fase estacionária. Os detectores utilizados podem ser do tipo refratométricos, UV ou IR, dependendo da natureza do polímero.

A eficiência do processo de separação é função do volume de retenção (ou eluição) ( $V_R$ ) e da massa molar do material. O volume de retenção por sua vez é função do volume intersticial  $V_0$  e o volume do poro acessível no gel, ou seja:

$$V_R = V_0 + K_D V_i \quad (8.1)$$

sendo  $V_i$  o volume interno total do poro e  $K_D$  o coeficiente de partição entre  $V_i$  e a porção acessível para um dado soluto. Quando  $K_D = 0$  (moléculas grandes)  $V_R = V_0$ , ocorrendo uma eluição rápida da coluna. Para moléculas pequenas que penetram no volume do poro,  $K_D = 1$  e a eluição da coluna é mais lenta.

Uma vez que o peso molecular de um polímero determinado por GPC não representa o seu valor absoluto, ou seja, é um valor obtido com base em uma curva de calibração de polímeros de conhecidos pesos moleculares, pode-se escrever:

$$\log[\eta]_s M_s = \log[\eta]_u M_u \quad (8.2)$$

sendo  $[\eta]$  e  $M$  a viscosidade intrínseca e a massa molar do polímero, respectivamente. Os índices  $s$  e  $u$  representam o padrão e a amostra em análise, respectivamente.

Desde que os volumes hidrodinâmicos da amostra e do padrão não são necessariamente iguais, tem-se que  $[\eta]_s = K_s M_s^{v_s}$  e  $[\eta]_u = K_u M_u^{v_u}$ . A massa molar da amostra  $u$  pode ser determinada a partir de:<sup>15</sup>

$$\log M_u = \frac{1}{1+v_u} \cdot \log \left[ \frac{k_s}{k_u} \right] + \frac{1+v_s}{1+v_u} \log M_s \quad (8.3)$$

Frequentemente as curvas de calibração são construídas a partir de poliestireno (PS) ou poli(etileno glicol) (PEG) sendo conhecidos o peso molécula absoluto do polímero. O peso molecular absoluto de um polímero pode ser determinado a partir de técnicas como o espalhamento de luz e a osmometria.

Os dendrímeros estudados neste trabalho mostram uma distribuição de peso molecular monomodal e um baixo índice de dispersão no peso molecular, obtendo o poliglicerol dendrítico o menor valor ( $M_n/M_w = 1,05$ ), isto pode ser verificado na Tabela 8.2.

As estruturas dendríticas do PPID, CHD e PGLD foram confirmadas por ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ ) e cromatografia de permeação em gel (GPC) em trabalhos recentes do grupo.<sup>16-17-18</sup> Os resultados obtidos quanto ao grau de ramificação, peso molecular e índice de polidispersão (PI) são apresentados na Tabela 8.2.

**Tabela 8.2-** Características físico-químicas características do PPID, CHD e PGLD sintetizados neste trabalho.

Dendrímero	DB <sup>(a)</sup>	$M_n \times 10^{-3}$ <sup>(b)</sup>	$M_w \times 10^{-3}$ <sup>(b)</sup>	PI <sup>b</sup> ( $M_n/M_w$ )
PPID	0.95	1.805	2.831	1.56
CHD	0.89	17.752	21.679	1.22

PGLD	0.82	16.724	17.564	1,05
------	------	--------	--------	------

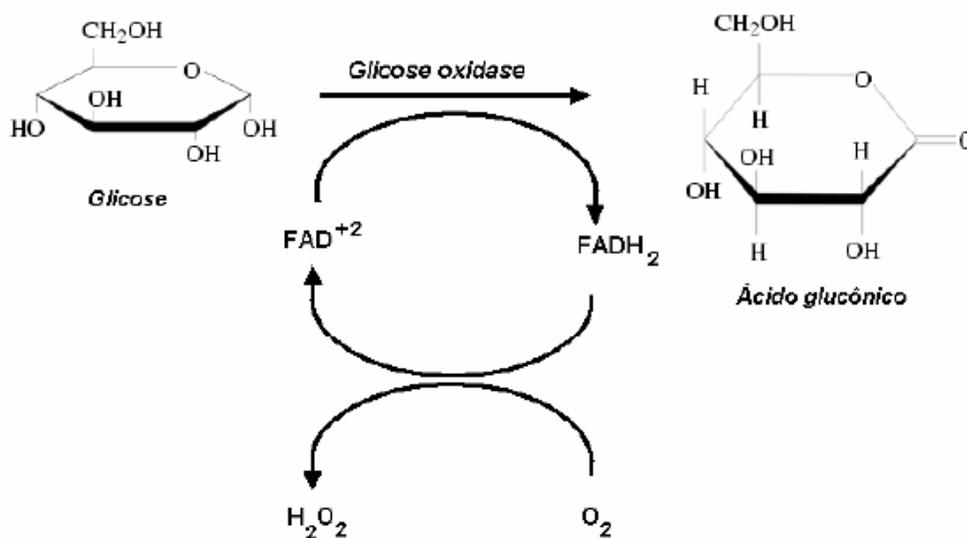
<sup>(a)</sup>DB=Degree of branching calculado por análise NMR. <sup>(b)</sup>Calculado por análise GPC.

A baixa dispersão no peso molecular ( $M_n/M_w$ ) observada e o baixo grau de ramificação, caracterizam as estruturas dendríticas PPID, CHD e PGLD.

### 8.3– Biossensores de glicose

A razão primária para integrar GOx a superfícies de dendrímeros, é sinergizar as capacidades de reconhecimento moleculares da enzima para executar funções de biossensoramento e ao mesmo tempo projetar dispositivos que operem a um baixo potencial e curto tempo de resposta. As moléculas de glicose podem sofrer a ação da enzima colesterol oxidase, produzindo ácido glucônico como ilustrado na Figura 8.3.

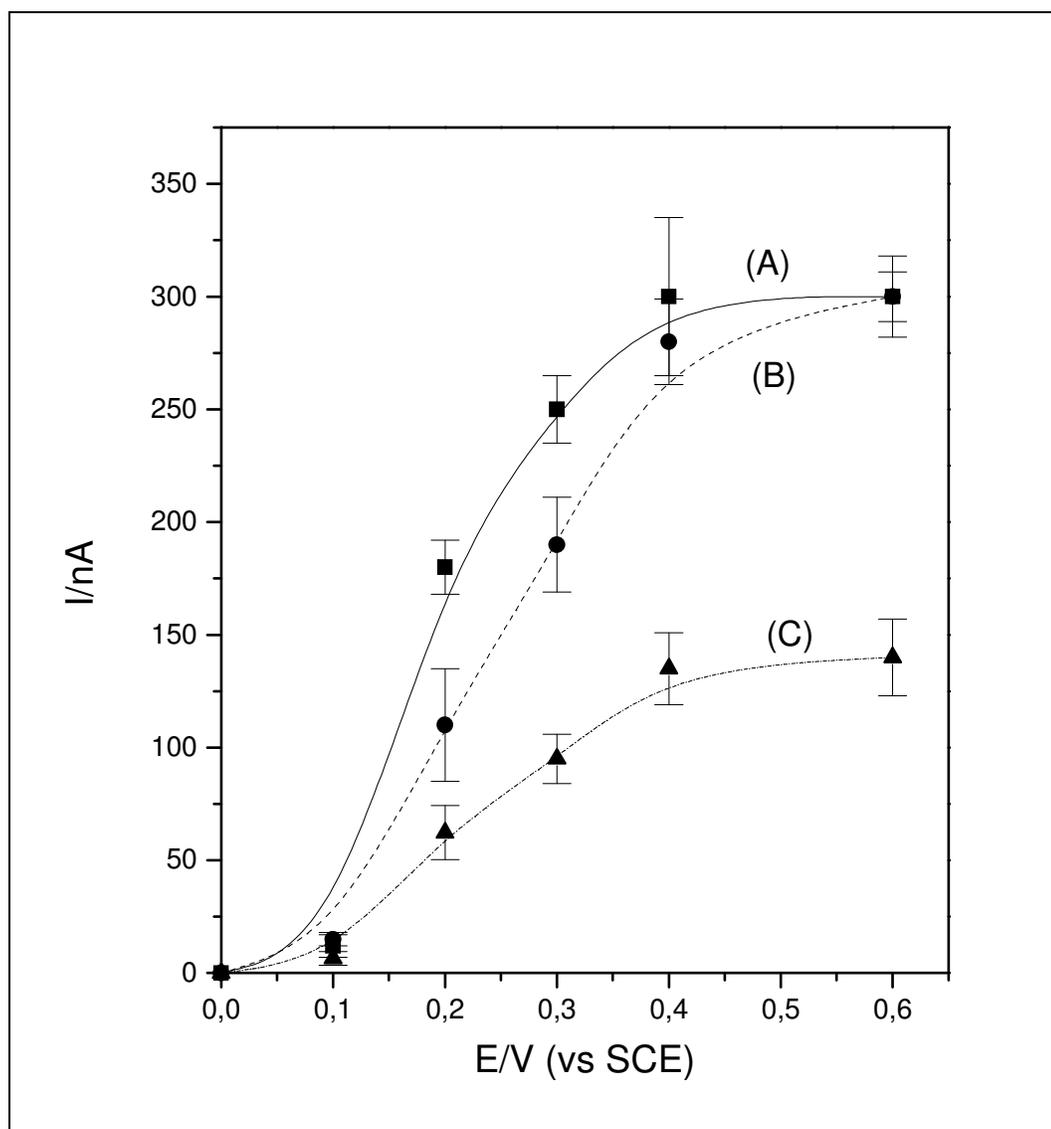
O problema central para ser resolvido na imobilização de enzimas para fabricação de biossensores é a escolha do suporte.<sup>19</sup> Sendo assim, um número de critérios como resistência microbiana, estabilidade térmica, inércia química e grupos funcionais na superfície do suporte, precisam ser considerados quanto à utilização de suportes orgânicos para o desenvolvimento de dispositivos biossensores.<sup>20</sup>



**Figura 8.3-** Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.<sup>21</sup>

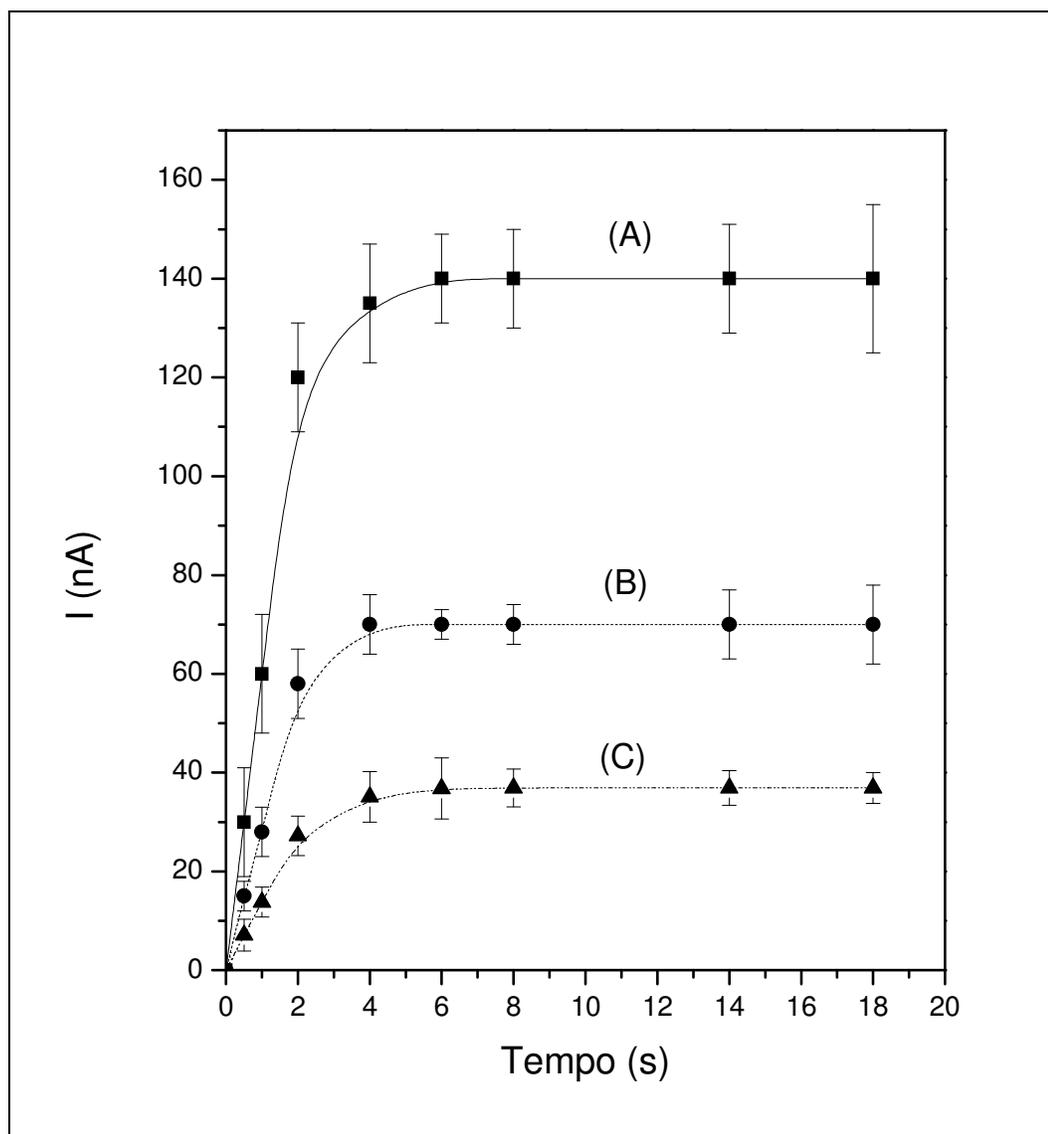
Deve ser observado que a utilização dos bioconjugados PGLD, CHD e PPID para construção de biossensores de glicose podem facilitar a fabricação de dispositivos em nanoescala, promovendo a integração de componentes biológicos a sistemas da microeletrônica a um nível de biocompatibilidade aceitável para o projeto de sistemas implantáveis.<sup>22-23</sup>

A Figura 8.4 ilustra a resposta da corrente em função do potencial aplicado para os dispositivos biossensores de glicose baseados nos dendrímeros PPID, PGLD e CHD. Observa-se que a resposta do biossensor aumenta com o potencial aplicado.



**Figura 8.4-** A relação entre a corrente resposta e o potencial dos biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em NaPBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de Glicose: 20 mM.

A relação corrente-tempo quando o potencial dos biossensores PPID, PGLD e CHD foi de 300 mV é mostrada na Figura 8.5.



**Figura 8.5-** Curva de corrente-tempo para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C), a 300 mV, pH 7,4 e 37 °C, em solução de glicose de 20 mM.

A maioria dos biossensores de glicose comercialmente disponível possui tempo de resposta de 12 segundos. Portanto, os biossensores de glicose desenvolvidos neste trabalho apresentaram um tempo de resposta significativamente menor relativamente aos biossensores

comerciais. Considerando que a enzima está uniformemente distribuída nos sistemas dendríticos estudados a saber; PGLD, CHD e PPID, a reação parece ocorrer predominantemente na superfície do biossensor a baixas concentrações de glicose. Entretanto, uma vez que os fenômenos de difusão da carga eletrônica e de substrato são competitivos, o pequeno desvio observado no tempo de saturação na corrente eletroquímica gerada na superfície do transdutor parece estar associada a processos de difusão ou o transporte de carga na interface dendrímero/transdutor.

Foi visto que a corrente resposta dos eletrodos enzimáticos alcança facilmente o estado de estabilidade (saturação). Dos resultados na Figura 8.6 o pico de saturação da corrente para o biossensor PGLD é significativamente maior que para os bioconjugados PPID e CHD. O decaimento observado na corrente resposta para o biossensor CHD e PPID pode estar relacionado a um processo de inibição da atividade da GOx pelos grupos amina, protonados, na periferia do CHD e PPID, respectivamente.

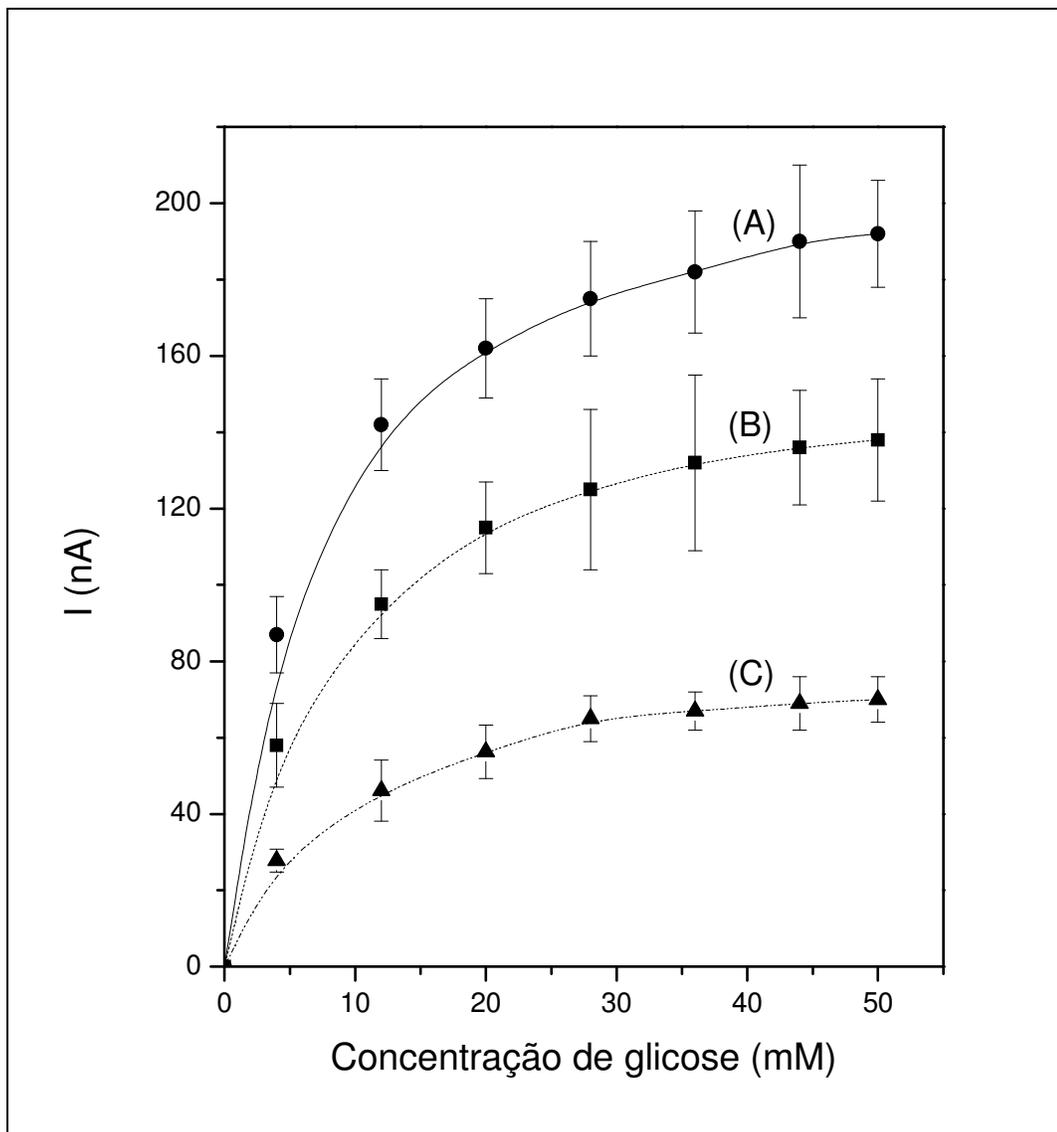
A relação entre corrente resposta e concentração de glicose é mostrada na Figura 8.6. Conforme pode ser observado, existe uma dependência da corrente com a concentração do substrato indicando que todos os sistemas dendríticos bioconjugados parecem obedecer o modelo proposto por Michaelis-Menten.

A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K^{app}_M$ ), que dá indicação da cinética enzima-substrato para o biossensor de glicose baseado na imobilização da GOx nos dendrímeros PPID, CHD e PGLD podem ser calculadas pela equação eletroquímica de Lineweaver-Burk:<sup>24</sup>

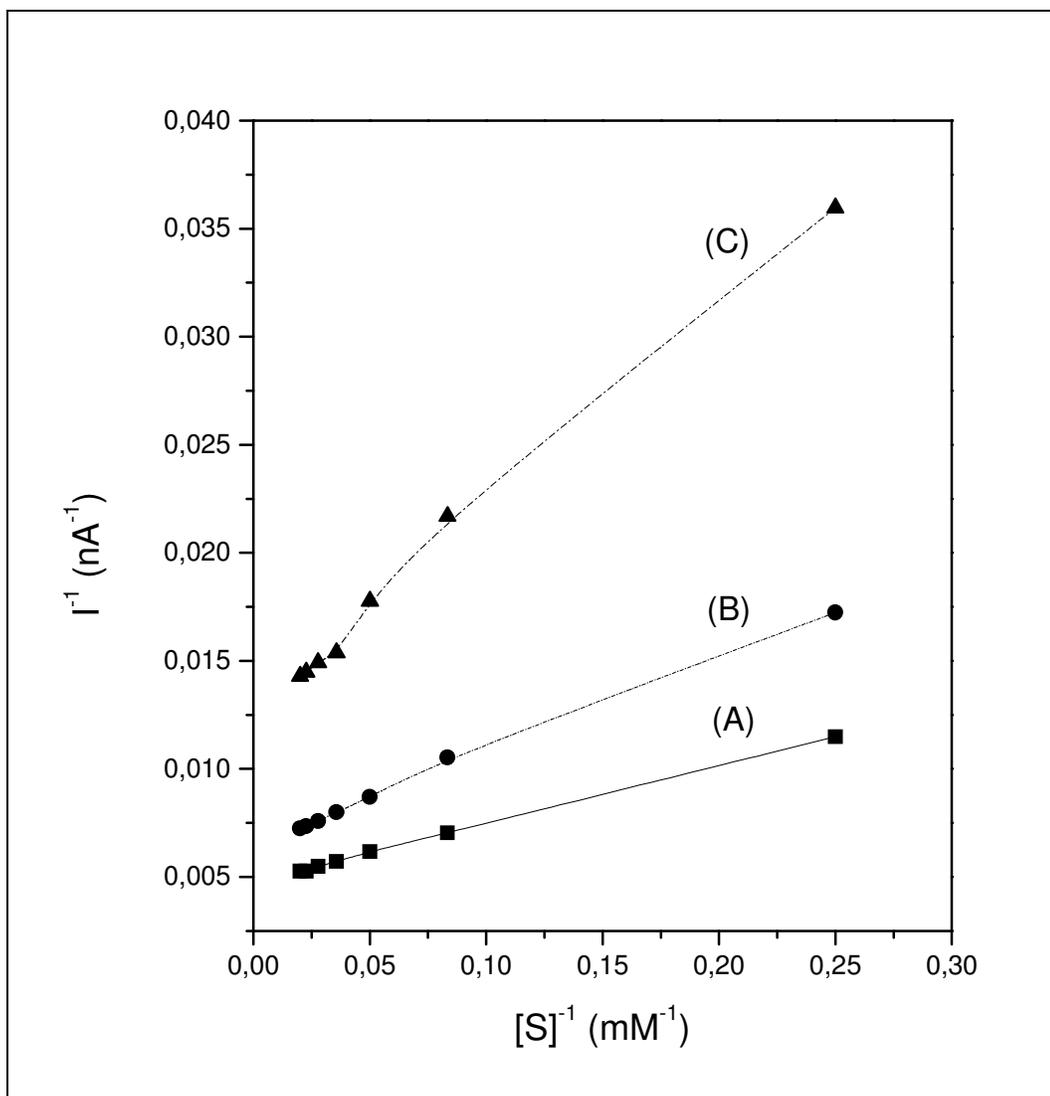
$$\frac{1}{i_{SS}} = \frac{K^{app}_M}{i_{Max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{i_{Max}} \quad (8.1)$$

sendo  $i_{SS}$  é a corrente de estado-constante depois da adição do substrato,  $i_{Max}$  é a máxima corrente medida abaixo da condição de saturação do substrato e  $[S]$  é a maior concentração de substrato.

O gráfico de Lineweaver-Burk  $1/i_{SS}$  versus  $1/[S]$  dos bioconjugados PGLD, PPID e CHD imobilizados em nanofibras de PANI é mostrado em Figura 8.7 a partir dos quais foi possível calcular os valores das correspondentes constantes cinéticas, cujos valores estão mostrados na Tabela 8.3.



**Figura 8.6-** A relação entre corrente resposta e concentração de glicose para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em 0,1 M NaPBS e pH 7,4 a 37 °C.



**Figura 8.7-** Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD:  $[I]^{-1} = 0,02708[S]^{-1} + 0,00474$  ( $r^2 = 0,999$ ), CHD:  $[I]^{-1} = 0,04351[S]^{-1} + 0,00648$  ( $r^2 = 0,997$ ) e PPID:  $[I]^{-1} = 0,09491[S]^{-1} + 0,01258$  ( $r^2 = 0,994$ ).

**Tabela 8.3-** Parâmetros cinéticos eletroquímico para a GOx immobilizada nos dendrímeros PGLD, CHD e PPID.

Dendrímero	$K_M^{app}$ (mM)	$i_{Max}$ (nA)	$K_M^{app} / i_{Max}$
PGLD	5.71	210.97	0.027
CHD	6.71	154.32	0.043
PPID	7.54	79.49	0.095
GOx solúvel	5,94 mM <sup>25</sup>	-----	-----

A constante de Michaelis,  $K_M^{app}$ , foi maior para o bioconjugado PPID-GOx, que para o bioconjugado CHD-GOx e PGLD-GOx. A  $K_M^{app}$  é relacionada à concentração do substrato que alcança a taxa máxima da reação enzima-catálise. Assim, o menor valor de  $K_M^{app}$ , é a menor concentração de substrato para obter o valor máximo da reação enzima-catálise. Para o menor valor de  $K_M^{app}$ , maior a afinidade da enzima para o substrato. Deste modo, o dendrímero PGLD parece ser um promissor portador de GOx. O novo biossensor projetado baseado no aumento da incorporação de GOx no dendrímero PGLD exibiu melhor desempenho analítico em relação às configurações dos biossensores que usam os dendrímeros CHD ou PPID.

A topologia do dendrímero é um importante parâmetro molecular que determina suas propriedades físicas e suas aplicações. Para controlar a topologia do dendrímero e arquitetura com precisão, é atualmente o tema central na ciência dos polímeros com enfoque para o preparo de macromoléculas com novas propriedades.<sup>26</sup>

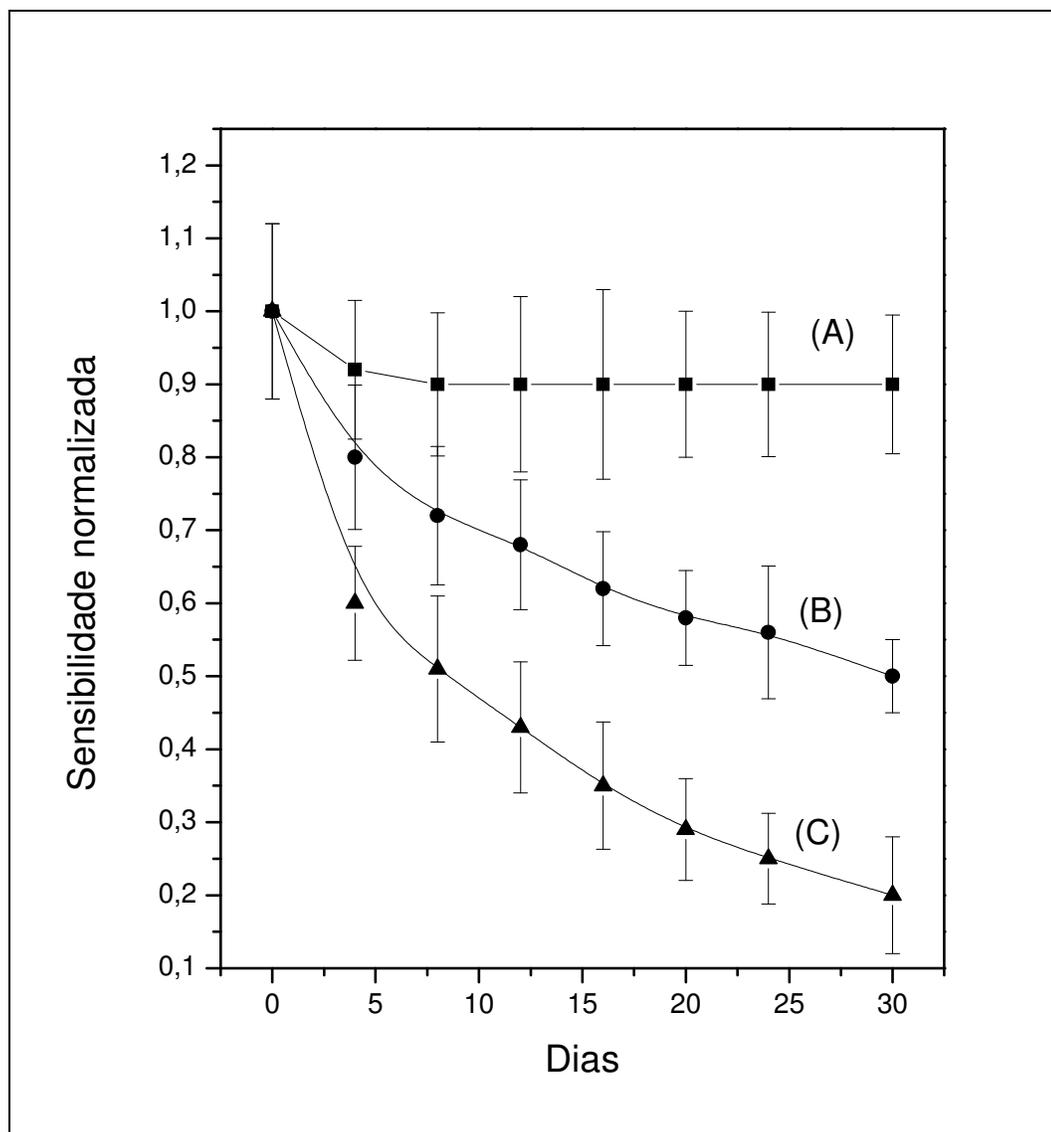
A periferia da unidade dendrítica dos dendrímeros CHD e PPID é preenchida com grupos primários amina, enquanto todos os pontos ramificados, no interior do dendrímero, são ocupados por amina terciária. É possível que as funções amina primárias, presentes na periferia da unidade dendrítica pode também participar através das ligações de hidrogênio com o local catalítico da enzima, resultando em um decréscimo da bioatividade dos biossensores CHD e PPID.

O baixo desempenho dos bioconjugados PPID e CHD em relação ao PGLD pode ser explicado em exame das estruturas químicas do PPID e CHD. Ambos, PPID e CHD são polímeros catiônicos altamente ramificados que possuem aminas primárias, secundárias e

terciárias. Estes grupos são protonados em pH fisiológico, tornando o polímero positivamente carregado. Sua forte carga catiônica interage com o local ativo da enzima, reduzindo a atividade da enzima.

Um dos aspectos mais importantes a ser considerado em imobilização de enzima é a estabilidade de armazenamento. A estabilidade dos bioconjugados PPID-GOx, CHD-GOx e PGLD-GOx foi estudada por imersão do biossensor em solução de PBS pH 7,4 a 4°C por períodos de tempo predeterminados. Soluções de GOx livre também foram preparadas e armazenadas sob as mesmas condições e as atividades relativas dos biossensores PPID, CHD e de PGLD foram determinadas. A atividade relativa (RA) foi definida como a relação das atividades dos bioconjugados observadas sobre a atividade obtida de uma quantia equivalente da enzima livre.

Como pode ser visto na Figura 8.8, a ligação covalente da GOx sobre o dendrímero PGLD também apresenta alta estabilidade em relação ao sensor de PANINT's/CHD-GOx e PANINT's/PPID-GOx, cuja sensibilidade parece quase inalterada com o tempo de armazenamento durante as primeiras 3 semanas. Com uma maior estabilidade, tem-se a garantia de que com o decorrer do tempo, a resposta do biossensor continuará estável, garantindo a confiabilidade do resultado.



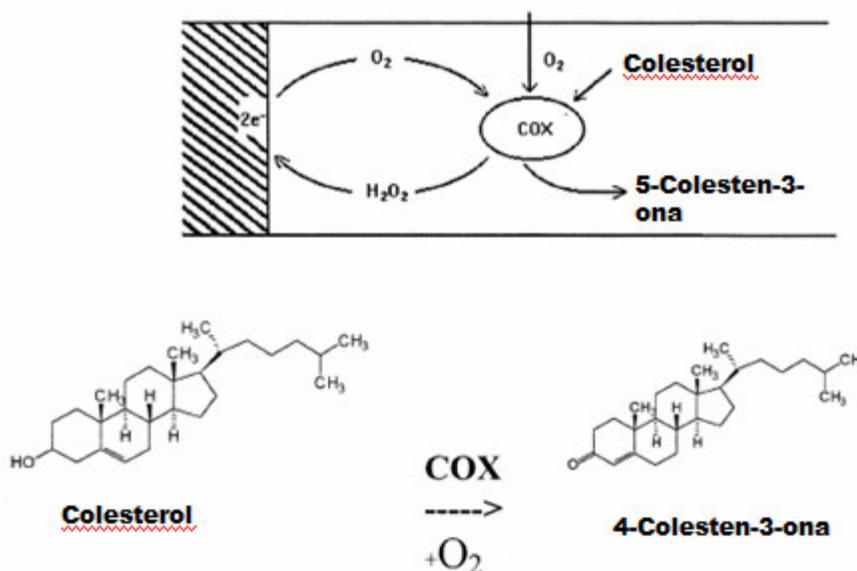
**Figura 8.8-** Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para glicose medida para os biossensores de PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a incerteza das medidas em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em NaPBS (0.1 M, pH 7,4) a 4 °C.

Uma diminuição constante é observada para o PANINT's/CHD-GOx e PANINT's/PPID-GOx, provavelmente devido a um efeito de inibição da estrutura de CHD e PPID na atividade da GOx. A mais baixa estabilidade dos biossensores de CHD e PPID pode ser devido a uma distribuição menos homogênea de GOx na superfície do sensor, que também poderia resultar em uma certa restrição no acesso de glicose para o sítio ativo da enzima.

#### 8.4- Biossensores de colesterol

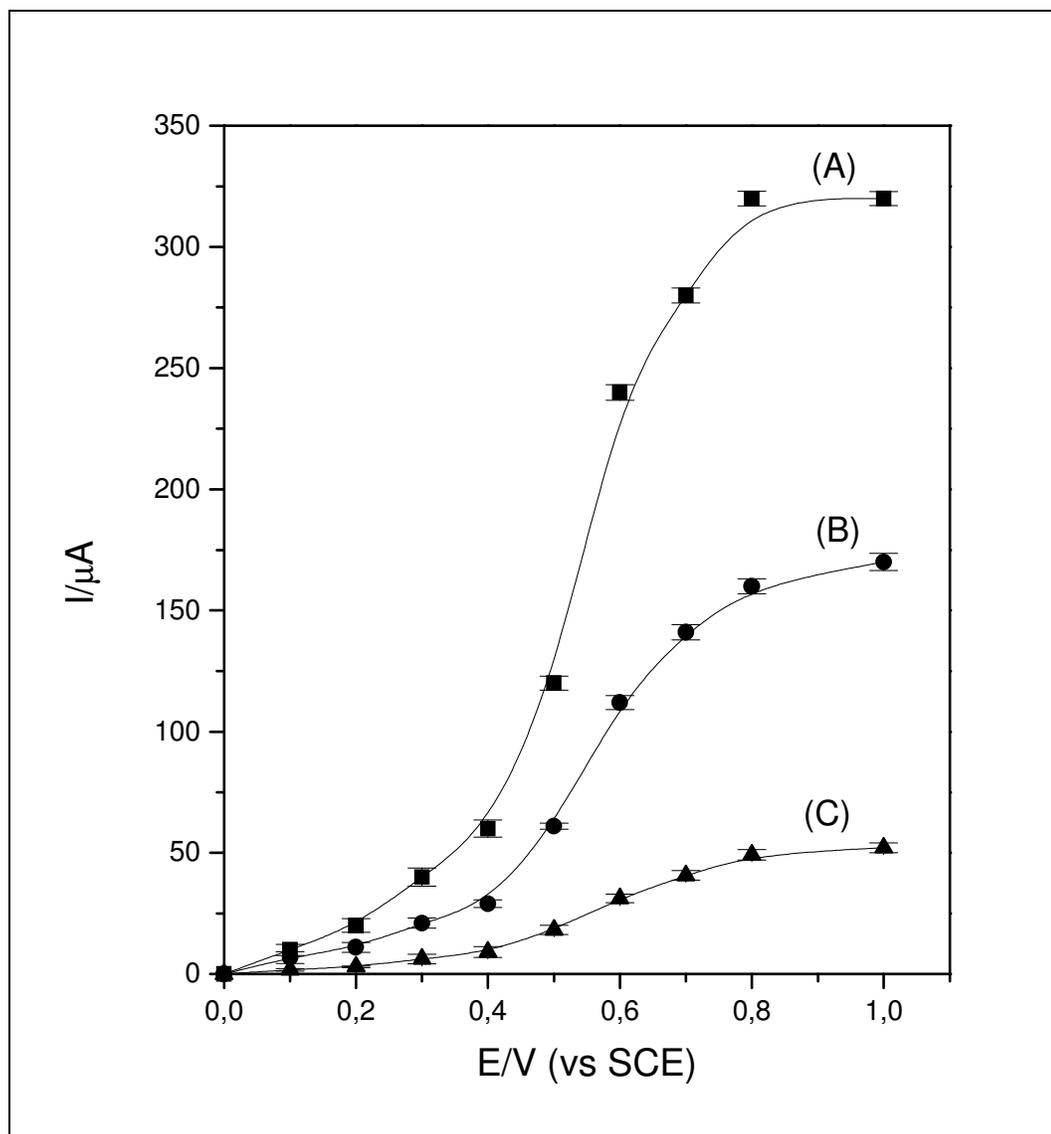
A maioria dos biossensores de colesterol comercial possui limite de leitura de 150 a 300 mg/dL e tempo de resposta de 180 segundos. Esses biossensores são vendidos em lotes separadamente do dispositivo eletrônico para análise.

As moléculas de colesterol podem sofrer a ação da enzima colesterol oxidase, produzindo 4-colesten-3-ona e peróxido de hidrogênio, como ilustrado na Figura 8.9.



**Figura 8.9-** Representação da reação de catálise da enzima colesterol oxidase.

O biossensor para colesterol foi analisado através de ensaios *in vitro* com soluções de colesterol com diferentes concentrações. A medida da resposta do biossensor foi feita em um multímetro Keithley modelo K 237, lendo-se a corrente gerada pelo dispositivo. A Figura 8.10 ilustra a relação entre a corrente e o potencial aplicado.



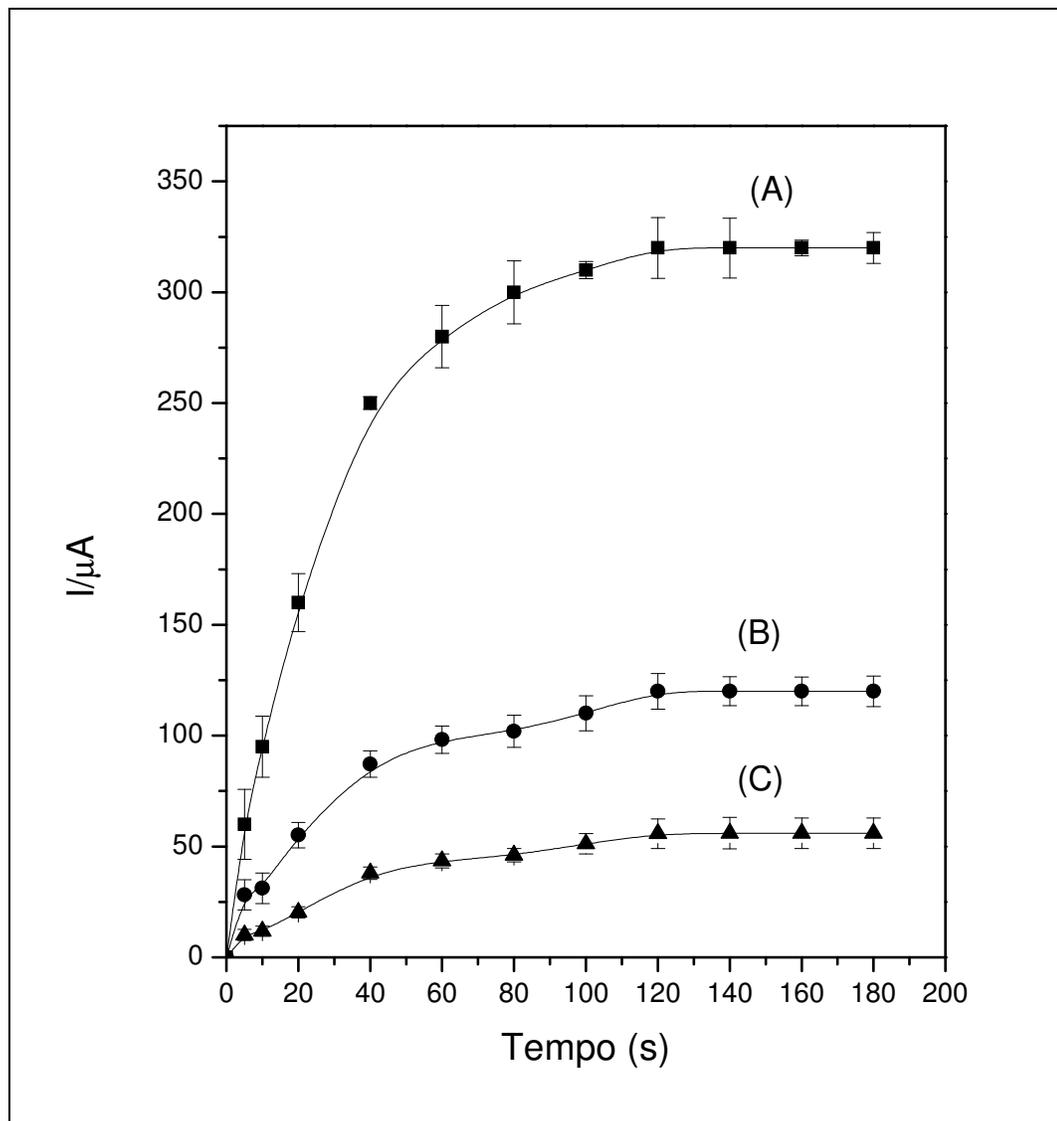
**Figura 8.10-** A relação entre a corrente resposta e o potencial dos biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em PBS pH 7.02 a 37 °C. Concentração de colesterol: 1 mmol.dm<sup>-3</sup>.

Sendo um biossensor um dispositivo analítico, é esperado que este apresente uma boa sensibilidade frente ao analito a ser determinado. Além de caráter sensível, é esperado também que um biossensor seja relativamente rápido quanto à monitoração do analito.

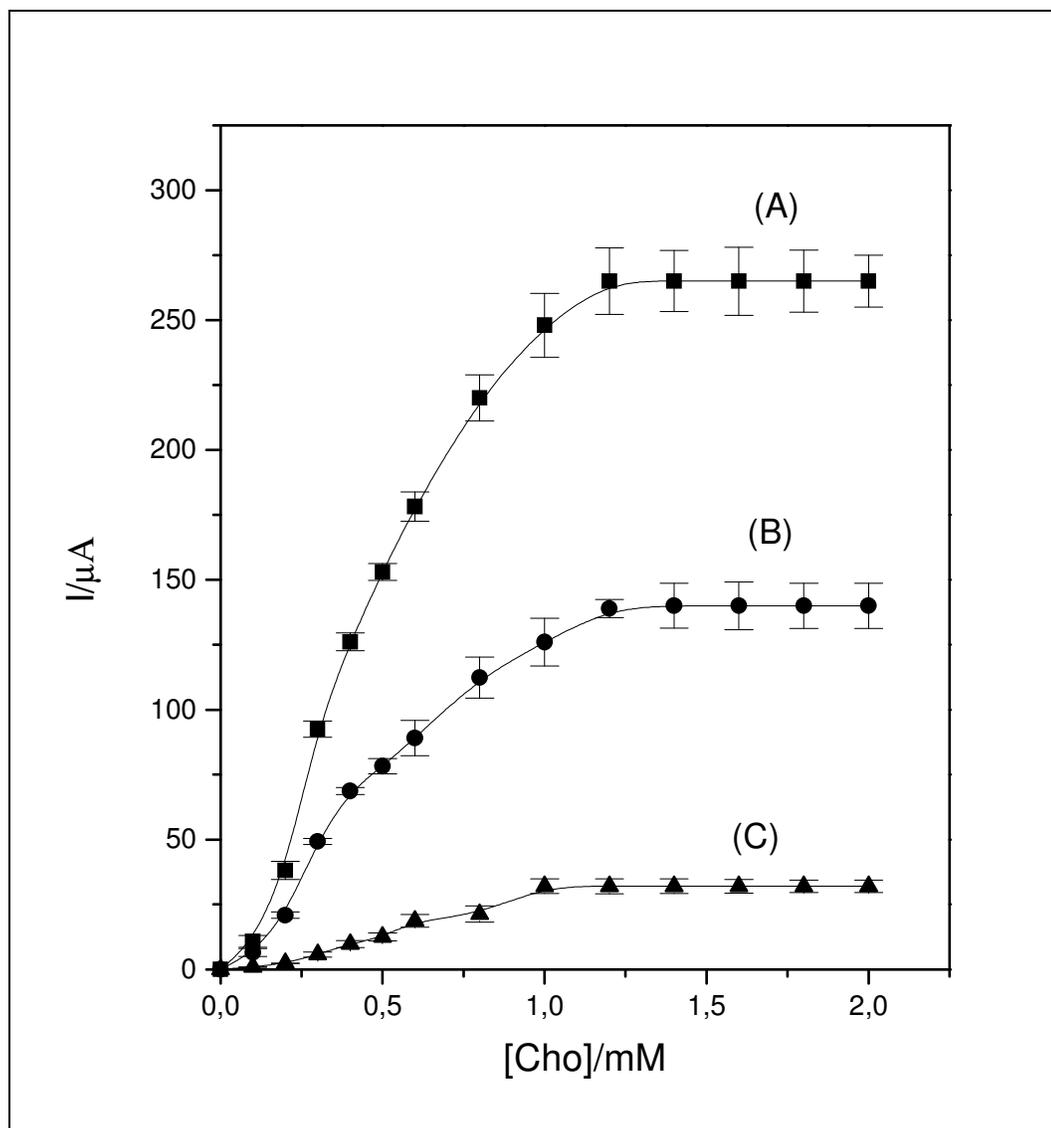
Uma análise *in vitro* do comportamento do biossensor obtido neste trabalho foi realizada frente à concentração de colesterol. A Figura 8.11 mostra a resposta dos biossensores baseados nos bioconjugados PGLD/COx, CHD/COx e PPID/COx em função do tempo em uma solução de colesterol a uma concentração de 1 mM. A resposta do biossensor cresce com o aumento do

tempo, indicando que o processo pelo qual o analito (colesterol) chega a superfície do eletrodo é difusional. Este processo se deve ao gradiente de concentração existente entre o seio da solução fisiológica e a superfície do eletrodo. A concentração do analito na superfície do eletrodo e no seio da solução é a mesma, caso o sistema se encontre em passagem de corrente. No início da varredura catódica, ocorre a polarização do eletrodo com o aparecimento de uma corrente de redução. O peróxido de hidrogênio formado pela oxidação enzimática do colesterol é reduzido eletroquimicamente na superfície do eletrodo, levando a um gradiente de concentração e, assim, observa-se a formação de uma corrente difusional. Consequentemente diz-se que o processo difusional controla a chegada do analito ao eletrodo. A saturação na curva  $I_{xt}$  (Figura 8.11) ocorre mais rapidamente nos biossensores de CHD e PPID significando que a difusão do analito é menor nestes dois materiais.

A Figura 8.12 mostra a dependência da resposta do biossensor frente à concentração de colesterol. Quando a concentração de colesterol é muito baixa, ocorre um decréscimo na atividade da enzima, contudo se a concentração da enzima for muito alta, pode ocorrer uma inibição do substrato. Como pode ser observado na Figura 8.12, observa-se uma saturação nas respostas dos biossensores de CHD e PPID a 1 mM. Neste caso associações do colesterol via ligações de hidrogênio com a periferia do dendrímero poderia reduzir significativamente a difusão do analito e conseqüentemente levar à uma saturação mais rápida na corrente. Para o biossensor de PGLD a saturação ocorreu somente a 60 mM, indicando que a difusão do analito neste bioconjugado parece ser maior, relativamente aos biossensores de CHD e PPID.



**Figura 8.11-** Dependência de tempo da corrente resposta para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) a 0.8 V em PBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de colesterol: 1 mM.



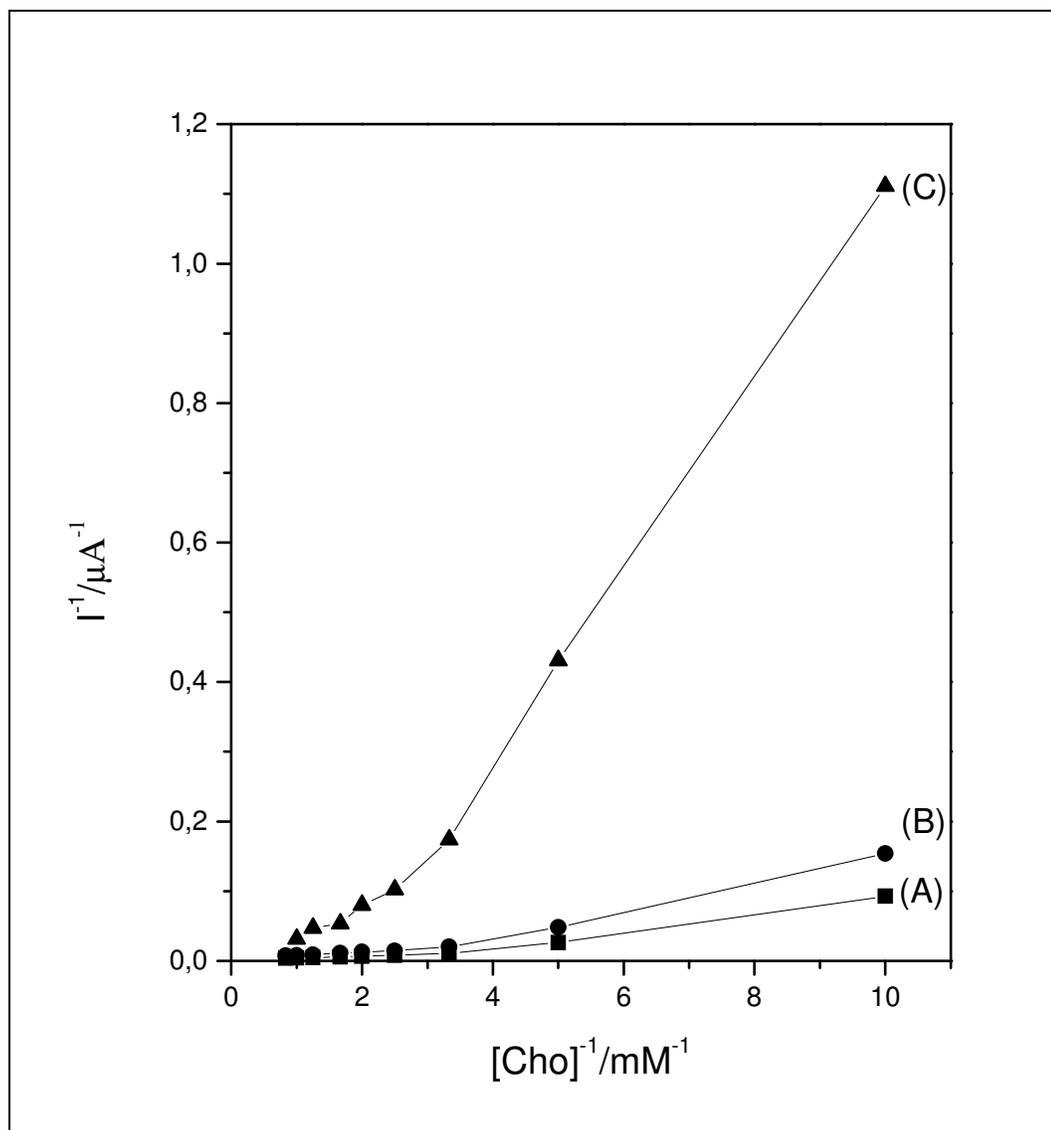
**Figura 8.12-** A relação entre corrente resposta para o PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) eletrodos enzimáticos e concentração de colesterol de 0,1 M PBS, pH 7,02 a 37 °C e 0,8 V.

O efeito da concentração do substrato, colesterol, na resposta dos biossensores PGLD, CHD e PPID é apresentado na Figura 8.12. Desta Figura observa-se que todas as formas de COx obedecem à uma cinética prevista pelo modelo de Michaelis-Menten. A seguir, aplicando-se o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk, obteve-se a Figura 8.13, da qual foi possível calcular os valores das correspondentes constantes cinéticas, cujos valores estão mostrados na Tabela 8.4.

**Tabela 8.4-** Parâmetros cinéticos eletroquímico para a COx imobilizada em dendrímeros bioconjugados.

Dendrímero	$K_M^{app}$ (mM)	$i_{Max}$ (nA)	$K_M^{app} / i_{Max}$
PGLD	0,84	87,56	0,0096
CHD	0,92	58,46	0,0171
PPID	6,25	0,34	18,621
COx Livre	1,3215 <sup>27</sup>	-----	-----

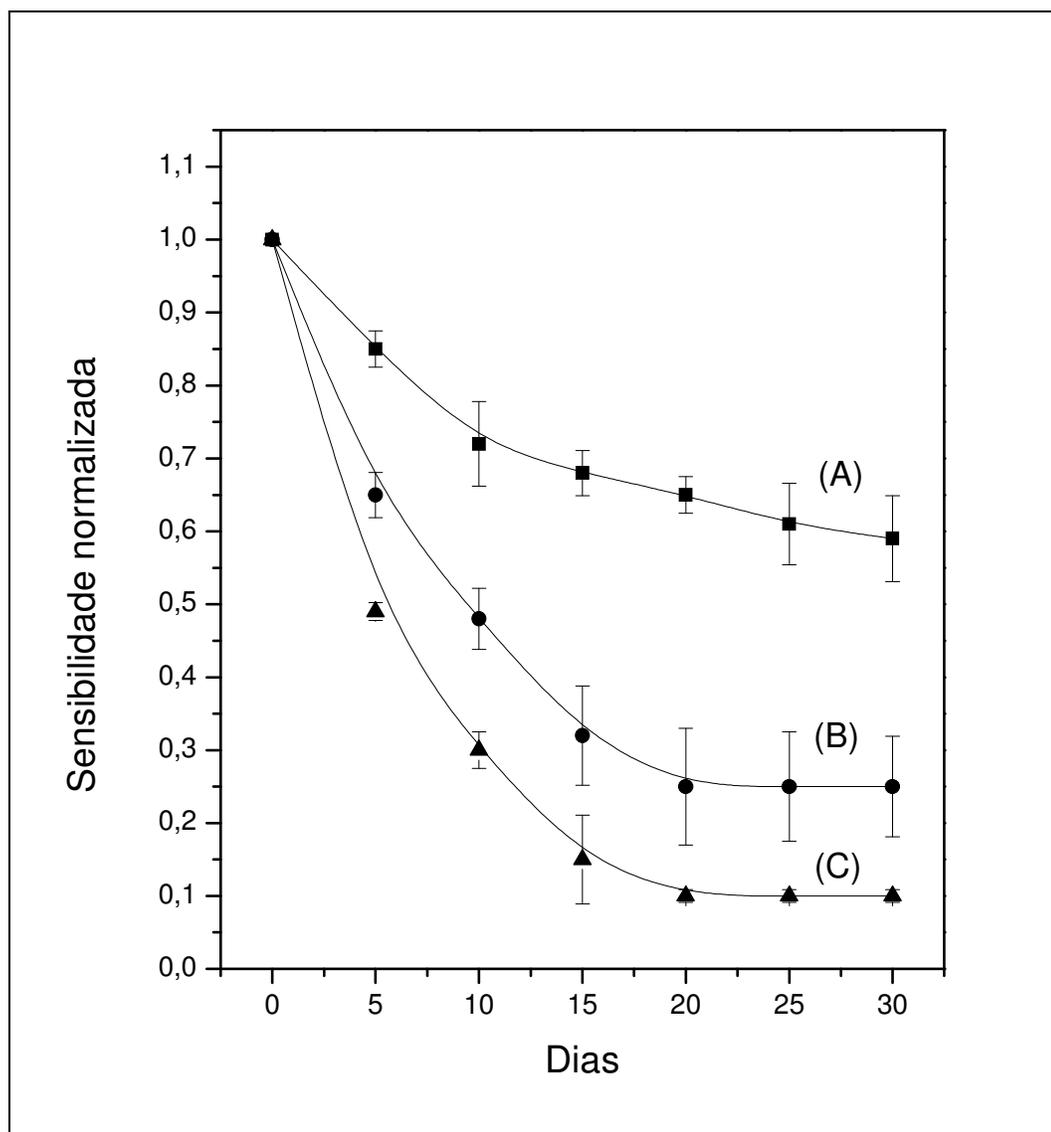
Observa-se que os valores da constante de Michaelis-Menten são significativamente maiores para o bioconjugado PPID relativamente à enzima livre. Esta observação experimental pode ser devido ao fato de que o processo de imobilização parece perturbar de alguma forma o sítio ativo da enzima. Neste sentido, os bioconjugados PGLD e CHD parecem ser mais adequados para o projeto de dispositivos biossensores. Entretanto, deve-se observar que a comparação direta em termos absolutos dos valores das constantes cinéticas das formas solúvel e imobilizada da enzima colesterol oxidase com os da literatura é difícil, devido às diferentes condições de medida da atividade, da origem e do grau de pureza da enzima e do tipo de imobilização e de suportes utilizados.



**Figura 8.13-** Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores de colesterol PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD (A):  $[I]^{-1} = 0,0096 [S]^{-1} - 0,01142$  ( $r^2=0,941$ ), CHD (B):  $[I]^{-1} = 0,0159 [S]^{-1} - 0,0171$  ( $r^2=0,950$ ) e PPID:  $[I]^{-1} = 18,621 [S]^{-1} + 2,977$  ( $r^2=0,854$ ).

A Figura 8.14 ilustra a sensibilidade em função do tempo de armazenamento para a medida de colesterol para os biossensores de PGLD(A), CHD (B) e PPID (C). Observa-se na Figura 8.14 uma queda acentuada na resposta do biossensor com o tempo de armazenamento para os bioconjugados CHD e PPID relativamente ao bioconjugado PGLD. O fato de a resposta decair mais acentuadamente para os bioconjugados amínicos seria justificado como sendo devido à

alterações na estrutura terciária da enzima devido a associações do tipo ligação de hidrogênio com o sítio ativo da enzima. Entretanto, estudos sobre a densidade de cargas (potencial zeta) da superfície dos dendrímeros CHD e PPID são necessários para confirmar esta hipótese.



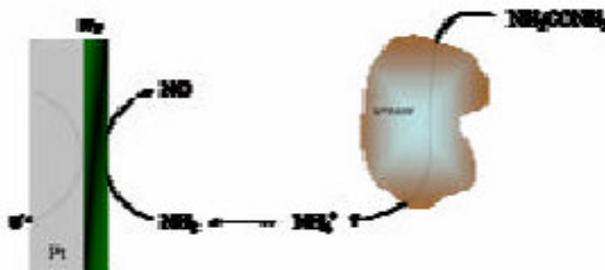
**Figura 8.14-** Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para medida de colesterol para os biossensores de PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a incerteza das medidas em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em 0,1 M PBS, pH 7,4 a 4 °C.

### 8.5- Biossensores de uréia

É fato conhecido da literatura de que existe atualmente um grande interesse voltado para a incorporação de materiais nanoestruturados na construção de biossensores para que a transdução do sinal químico resultante da reação enzimática seja mais eficiente, seja pela contribuição da grande área superficial desses materiais ou pela facilidade do analito se difundir através da nanoestruturas.

A metodologia de nanoestruturação do biossensor de uréia adotado neste trabalho analogamente aos outros biossensores se baseou na formação de um depósito dos dendrímeros bioconjugados dispersos regularmente nos interstícios dos nanotubos de polianilina, obtidos pela técnica de matriz digitalizada por eletropolimerização, conforme discutido anteriormente.

A dosagem da uréia no sangue é empregada principalmente para avaliar doenças renais e hepáticas. Neste trabalho estudou-se a detecção eletroquímica da amônia pelos bioconjugados dendríticos PGLD, CHD e PPID. A enzima imobilizada nas superfícies dendríticas foi a urease. Uma vez que esta enzima é capaz de catalisar a decomposição da uréia em amônia, os dispositivos desenvolvidos neste trabalho podem ser denominados de biossensores de uréia, conforme exemplificado na Figura 8.15.

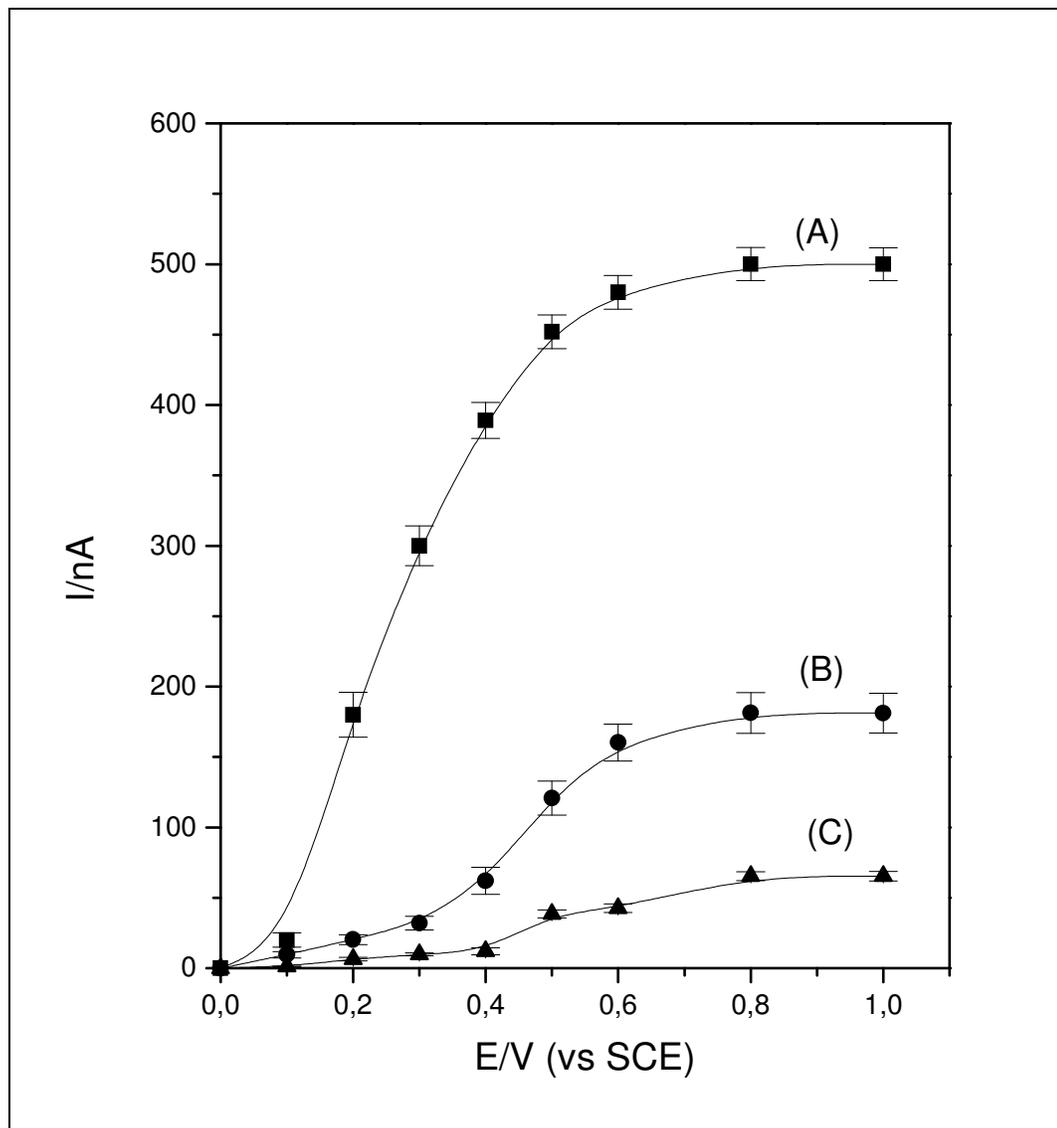


**Figura 8.15-** Esquema do biossensor de uréia.

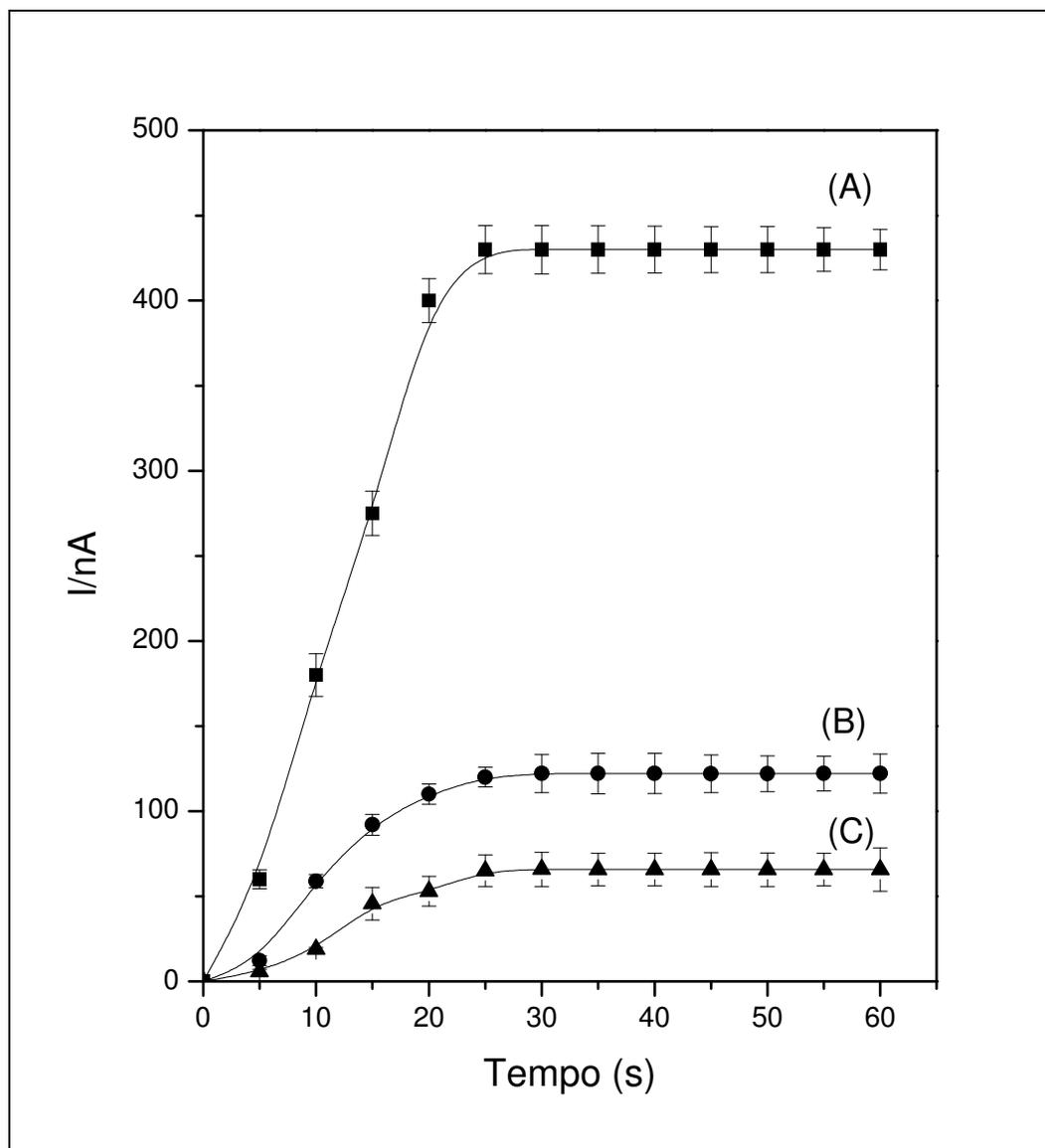
A Figura 8.16 ilustra a relação entre a corrente amperométrica e o potencial aplicado para a detecção de amônia para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). Como pode ser observado, a resposta do biossensor aumenta com o potencial aplicado saturando em cerca de 600 mV para os sistemas estudados. Observa-se que a sensibilidade de detecção do filme de PGLD é significativamente maior para o dendrímero de PGLD indicando que esta nanoestrutura parece ser mais apropriada para a imobilização da enzima relativamente aos dendrímeros amínicos.

A Figura 8.17 mostra a resposta dos biossensores baseados nos bioconjugados PGLD/CO<sub>x</sub>, CHD/CO<sub>x</sub> e PPID/CO<sub>x</sub> em função do tempo em uma solução de uréia a uma concentração de 10 mM. A resposta do biossensor cresce com o aumento do tempo, indicando que o processo pelo qual o analito (uréia) chega a superfície do eletrodo é difusional. Este processo se deve ao gradiente de concentração existente entre o seio da solução fisiológica e a superfície do eletrodo como já discutido anteriormente.

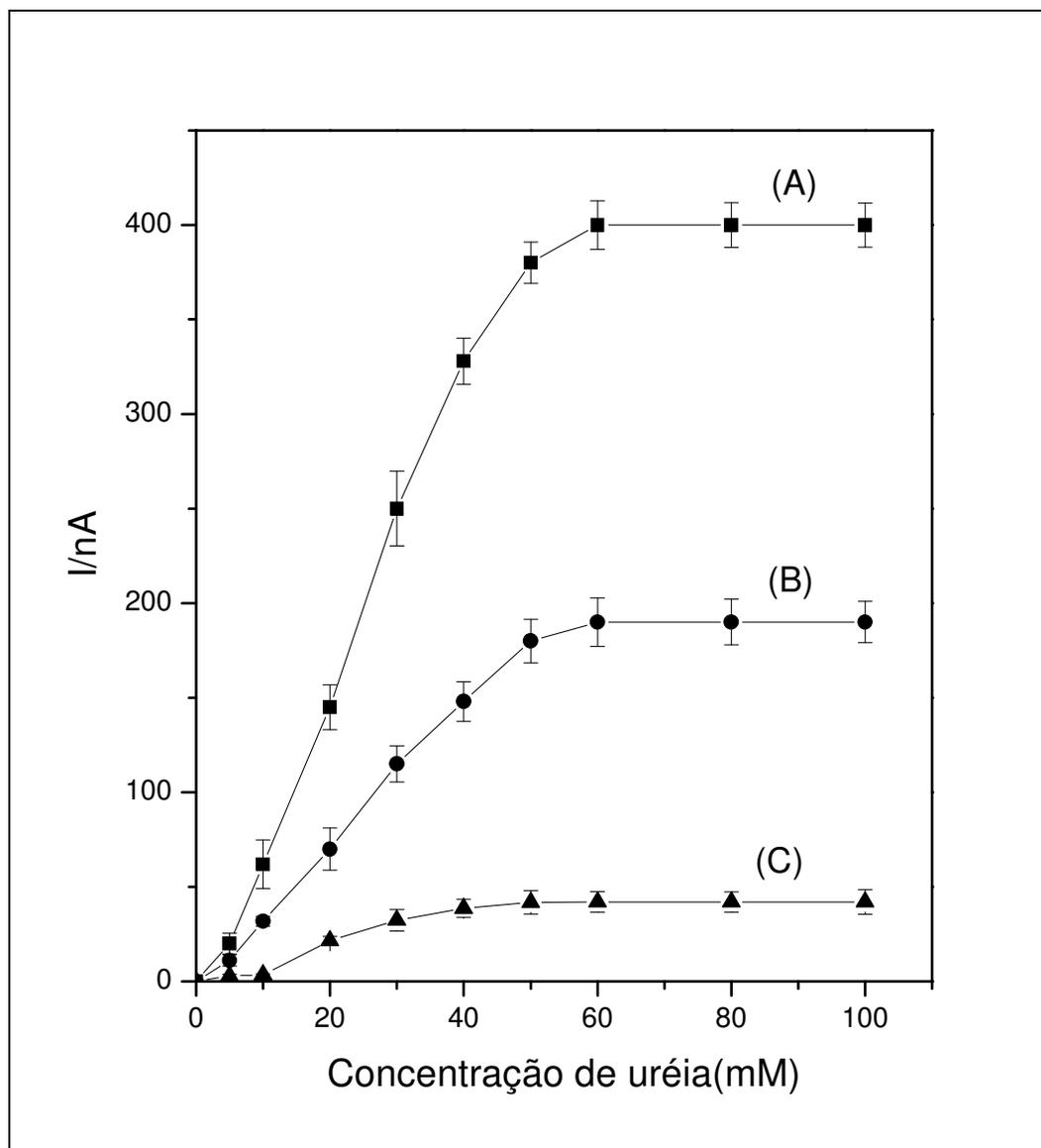
A Figura 8.18 mostra a dependência da resposta do biossensor frente à concentração de uréia. Quando a concentração de uréia é muito baixa, ocorre um decréscimo na atividade da enzima, contudo se a concentração da enzima for muito alta, pode ocorrer uma inibição do substrato. Como pode ser observado na Figura 8.18, observa-se uma saturação nas respostas dos biossensores de PGLD e CHD a 50 mM enquanto que para o dendrímero de PPID a saturação ocorre a 40 mM. Neste caso associações do de íons amônia via ligações de hidrogênio com a periferia do dendrímero de PPID poderia reduzir significativamente a difusão do analito e conseqüentemente levar a uma saturação mais rápida na corrente. Ao mesmo tempo observa-se que o comportamento das enzimas parece concordar com a cinética prevista pelo modelo de Michaelis-Menten. Aplicando-se o método de linearização preconizado por Lineweaver-Burk, obteve-se a Figura 8.19, da qual foi possível calcular os valores das correspondentes constantes cinéticas, cujos valores estão mostrados na Tabela 8.5.



**Figura 8.16**– A relação entre corrente resposta e o potencial para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) em 0,1 M NaPBS, pH 7,02 e 37 °C. Concentração de uréia: 10 mM.

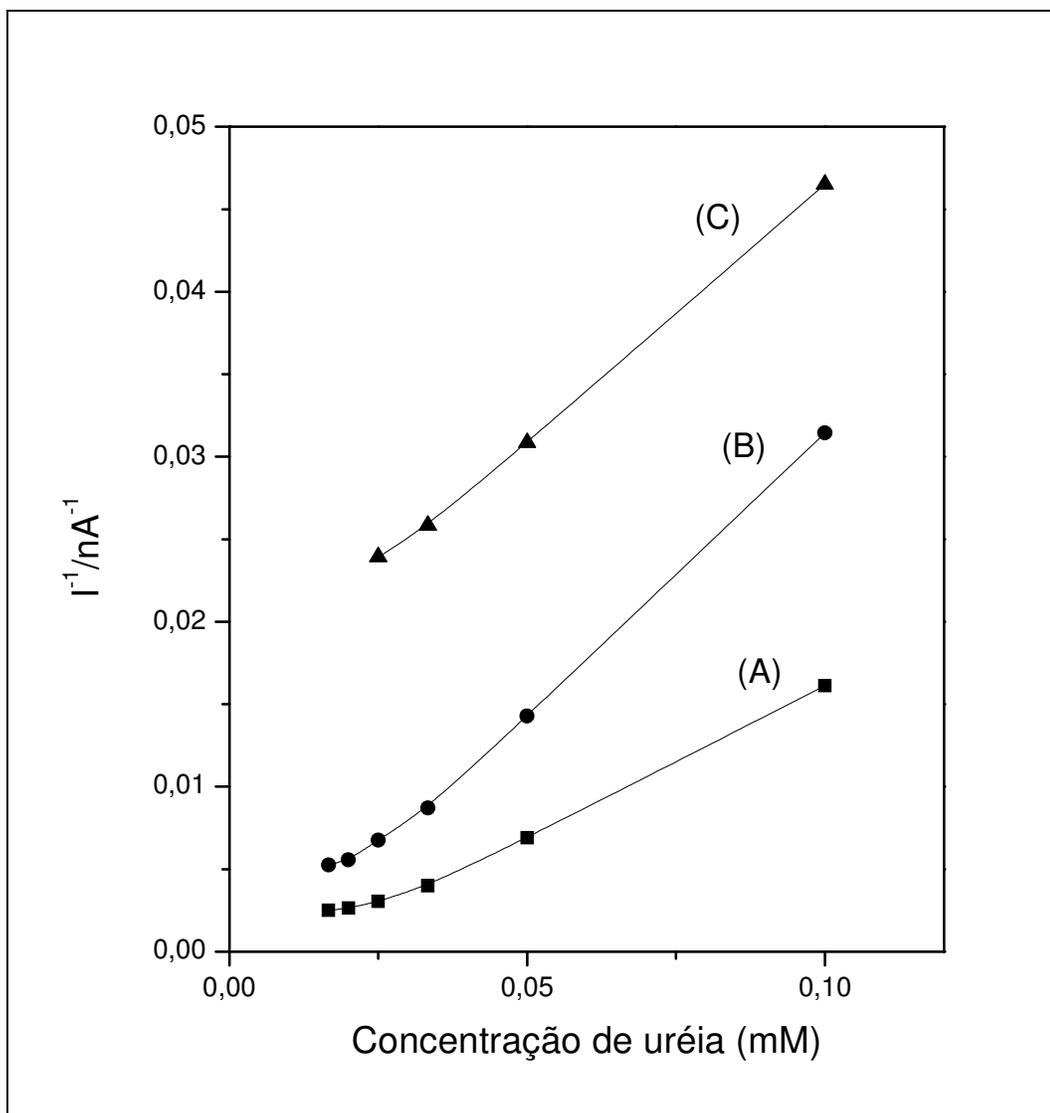


**Figura 8.17-** Dependência do tempo da corrente resposta para os biossensores PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) a 0.8 V em PBS pH 7,4 a 37 °C. Concentração de uréia: 10 mM.



**Figura 8.18-** A relação da corrente resposta dos eletrodos enzimáticos PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) e a concentração de uréia em 0,1 M PBS, pH 7,02 a 37 °C e 0,6 V.

A linearização da relação da corrente resposta dos eletrodos enzimáticos PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) e a concentração de uréia está ilustrada na Figura 8.16.



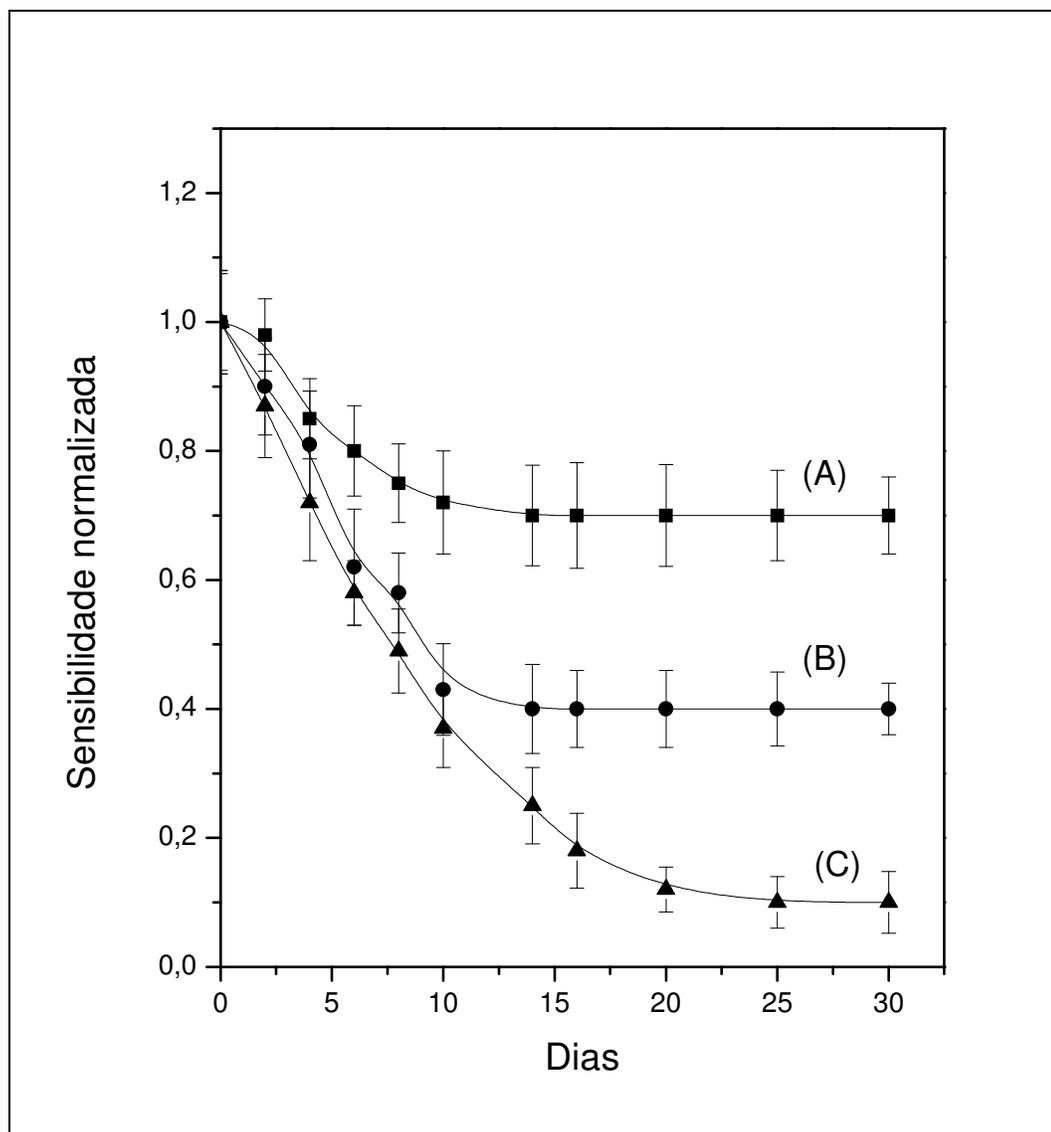
**Figura 8.19-** Gráfico eletroquímico de Lineweaver-Burk para os biossensores de uréia baseados nos sistemas PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). PGLD (A):  $[I]^{-1} = 0.168[S]^{-1} - 9.86 \cdot 10^{-4}$  ( $r^2=0.990$ ), CHD (B):  $[I]^{-1} = 0.321[S]^{-1} - 0.0011$  ( $r^2=0.994$ ) e PPID:  $[I]^{-1} = 0.305 [S]^{-1} + 0.016$  ( $r^2=0.999$ ).

**Tabela 8.5-** Parâmetros cinéticos eletroquímicos para a enzima uréase imobilizada nos dendrímeros PGLD, CHD e PPID.

Dendrímero	$K_M^{app}$ (mM)	$i_{Max}$ (nA)	$K_M^{app} / i_{Max}$
PGLD	170,39	$1,04 \cdot 10^3$	0,168
CHD	291,81	909,09	0,321
PPID	19,06	62,5	0,305
Urease Solúvel	4,0 mM <sup>28</sup>	-----	-----

Observa-se que os valores da constante de Michaelis-Menten são significativamente maiores para os bioconjugados PPGLD e CHD indicando que a estrutura mais propícia para o projeto de biossensores de uréia é o dendrímero de PPID. Esta observação experimental pode estar relacionada à maior afinidade existente entre o dendrímero de PPID e íons amônia, gerada pela reação catalizada pela urease. Ressalta-se que, similarmente aos estudos anteriores, a comparação direta em termos absolutos dos valores das constantes cinéticas obtidas neste trabalho das formas solúvel e imobilizada da enzima urease com os da literatura não parece ser adequado devido às diferentes condições de medida da atividade, da origem e do grau de pureza da enzima e do tipo de imobilização e de suportes utilizados.

A sensibilidade em função do tempo de armazenamento em solução PBS para uréia dos biossensores de PGLD (A), CHD (B) e PPID (C) está ilustrada na Figura 8.20. Observa-se na Figura 8.20 uma queda acentuada na resposta do biossensor com o tempo de armazenamento para os bioconjugados CHD e PPID relativamente ao bioconjugado PGLD. O fato de a resposta decair mais acentuadamente para os bioconjugados amínicos seria justificado como sendo devido à alterações na estrutura terciária da enzima urease devido a associações do tipo ligação de hidrogênio com o sítio ativo da enzima. Entretanto, como citado anteriormente, estudos sobre a densidade de cargas (potencial zeta) da superfície dos dendrímeros CHD e PPID são necessários para confirmar esta hipótese.



**Figura 8.20-** Sensibilidade em função do tempo de armazenamento para uréia medida para os biossensores de uréia baseados nos sistemas PGLD (A), CHD (B) e PPID (C). As barras verticais representam a incerteza das medidas em três sensores diferentes. Quando não em uso, os sensores foram armazenados em 0,1 M PBS, pH 7,4 a 4 °C.

### 8.6- Determinação dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia simultaneamente utilizando uma RNA

Os biossensores representam atualmente uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas da química clínica existentes, devido as suas características únicas, tais como: seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização;

facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento pelo próprio paciente. Entretanto, é necessário enfatizar que a determinação simultânea de hemometabólitos ainda permanece um desafio devido à dificuldade da determinação simultânea de várias variáveis.

Uma análise mais completa dos constituintes do sangue aumenta também a complexidade do problema, conduzindo ao uso de ferramentas estatísticas mais sofisticadas, dentre as quais a mais simples é sem dúvida a regressão linear múltipla. Outras técnicas como as análises de componentes principais e análises de agrupamento hierárquicas também podem ser utilizadas.<sup>29</sup> Tem-se observado na literatura que em química analítica, os problemas classicamente resolvidos por técnicas multivariadas como, por exemplo, a análise dos componentes de uma mistura; tem sido atualmente comparado com a solução através de redes neurais.<sup>30</sup>

Como já mencionado anteriormente, as RNAs são programas computacionais que imitam o funcionamento do cérebro humano através de uma estrutura em rede, na qual as informações são passadas à camada de entrada, processadas em uma ou mais camadas escondidas (também chamadas intermediárias) e o resultado emerge na camada de saída. Estes sistemas computacionais funcionam por meio de aprendizagem, que pode ser supervisionada ou não-supervisionada.

A aprendizagem supervisionada consiste em fornecer informações à rede através dos dados de entrada e dos resultados desejados. A rede, na fase de treinamento, utiliza os dados de entrada e, através de pesos, tenta chegar ao resultado desejado pelo supervisor.

Neste trabalho foi utilizado a RNA mais simples, do tipo Backpropagation, que utiliza a aprendizagem supervisionada e um algoritmo utiliza a retroalimentação, ou seja, neste tipo de rede, os pesos são modificados durante o cálculo de modo que o próximo peso será dado em função do peso atual, da diferença entre a saída desejada e a saída atual e da denominada taxa de aprendizado. O processo foi considerado concluído quando os resultados obtidos nesta fase de treinamento reproduziram adequadamente a saída desejada. Neste sentido, foram utilizadas soluções onde a composição dos hemometabólitos uréia, glicose e colesterol de 11 amostras com concentrações de glicose, colesterol e uréia foram variadas de 0 a 24 mM, 0 a 1,2 mM e 0 a 40 mM em solução tampão PBS pH 7,4, respectivamente (Tabela 8.6).

**Tabela 8.6-** Concentrações das soluções dos hemometabólitos glicose, uréia e colesterol para treinamento da rede neural.

[Glicose]	[Colesterol]	[Uréia]
0	0	0
2,0	0,1	4,0
4,0	0,2	8,0
6,0	0,3	12,0
8,0	0,4	16,0
10,0	0,5	20,0
12,0	0,6	24,0
14,0	0,7	28,0
16,0	0,8	32,0
20,0	1,0	36,0
24,0	1,2	40,0

Foram obtidas 11 curvas IxV sendo cada intensidade da curva tomada como entrada na RNA. Pesos apropriados foram aplicados para treinamento do algoritmo até que os resultados esperados fossem atingidos dentro do erro estabelecido.

As Figuras 8.21 a 8.23 ilustram os resultados obtidos na determinação simultânea dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia utilizando a RNA tipo backpropagation. O erro quadrático médio para os conjuntos de treinamento foi aproximadamente de 1,5%, portanto a rede consegue reproduzir bem o teor de hemometabólitos das amostras utilizadas na sua construção.

A Tabela 8.7 mostra os resultados obtidos pela aplicação da RNA treinada a um conjunto teste. A RNA treinada parece ser adequada para a determinação dos hemometabólitos glicose, uréia e colesterol uma vez que os erros absolutos foram baixos.

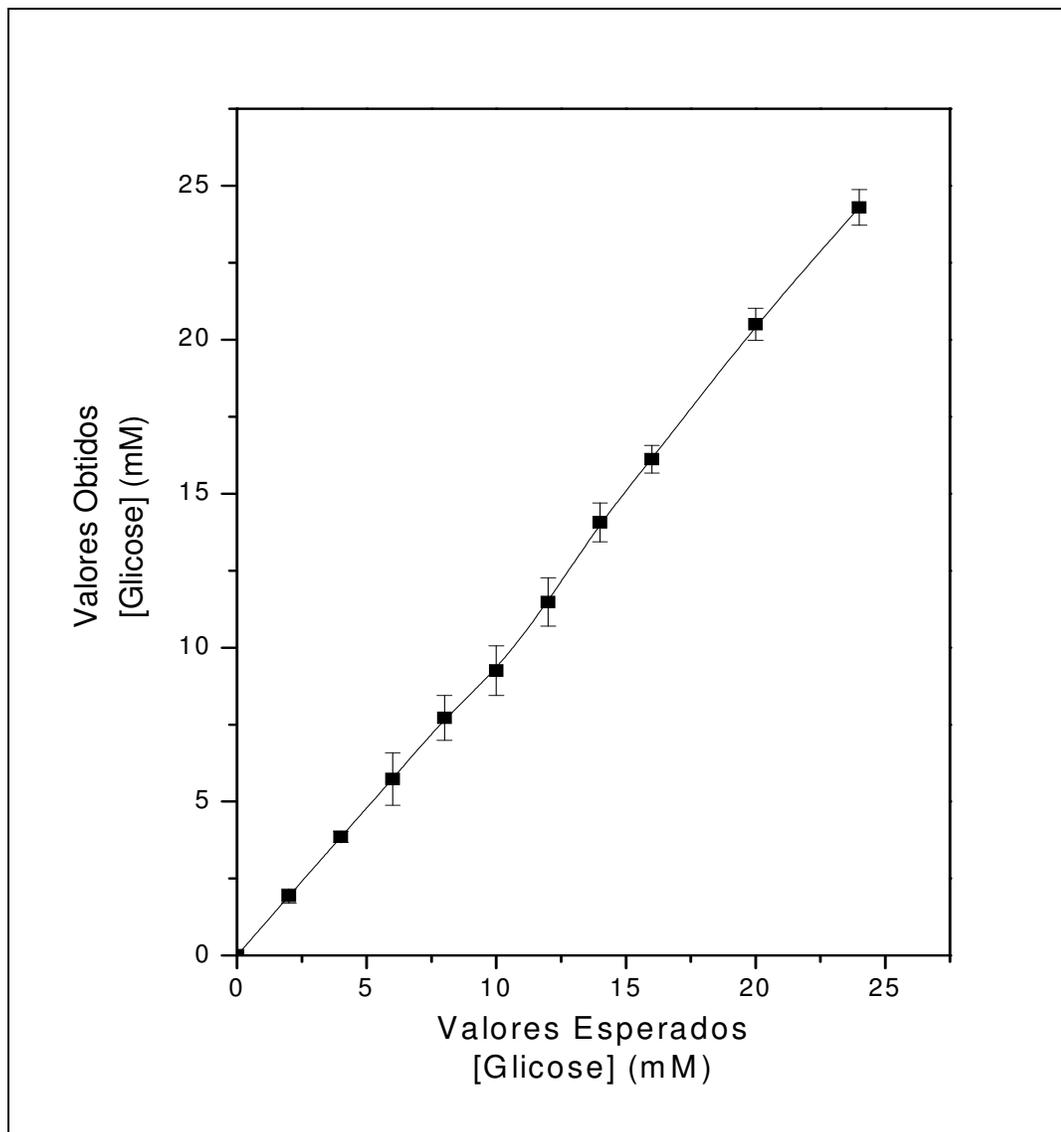
**Tabela 8.7-** Erro obtido durante o teste da rede neural para os hemometabólitos colesterol, glicose e uréia em ensaios in vitro.

Amostras	Valor esperado (mM)	Valor obtido (mM)	Erro Absoluto (%)
Glicose	0,000	0,003	-0,3
Glicose	3,890 <sup>a</sup>	3,873	1,7
Glicose	6,132 <sup>b</sup>	6,095	3,7
Uréia	0,000	0,009	-0,9
Uréia	1,340 <sup>c</sup>	1,309	3,1
Uréia	3,351 <sup>d</sup>	3,312	3,9
Colesterol	0,000	-0,001	0,1
Colesterol	1,200	1,185	1,5
Colesterol <sup>e</sup>	1,200	1,185	1,5

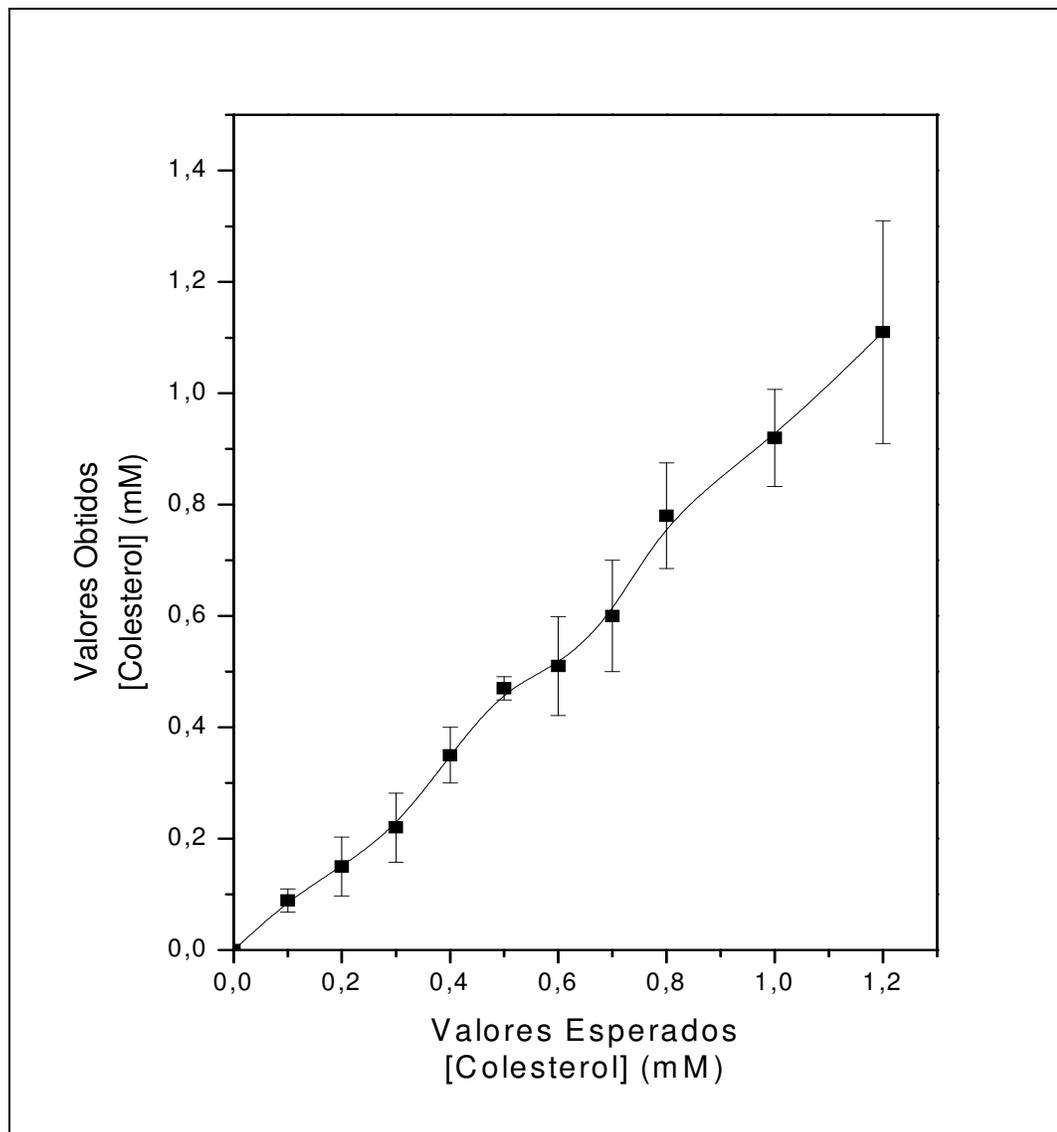
<sup>a,b</sup>Correspondentes aos limites clínicos superior e inferior para glicose, respectivamente.

<sup>c,d</sup>Correspondentes aos limites clínicos superior e inferior para uréia, respectivamente.

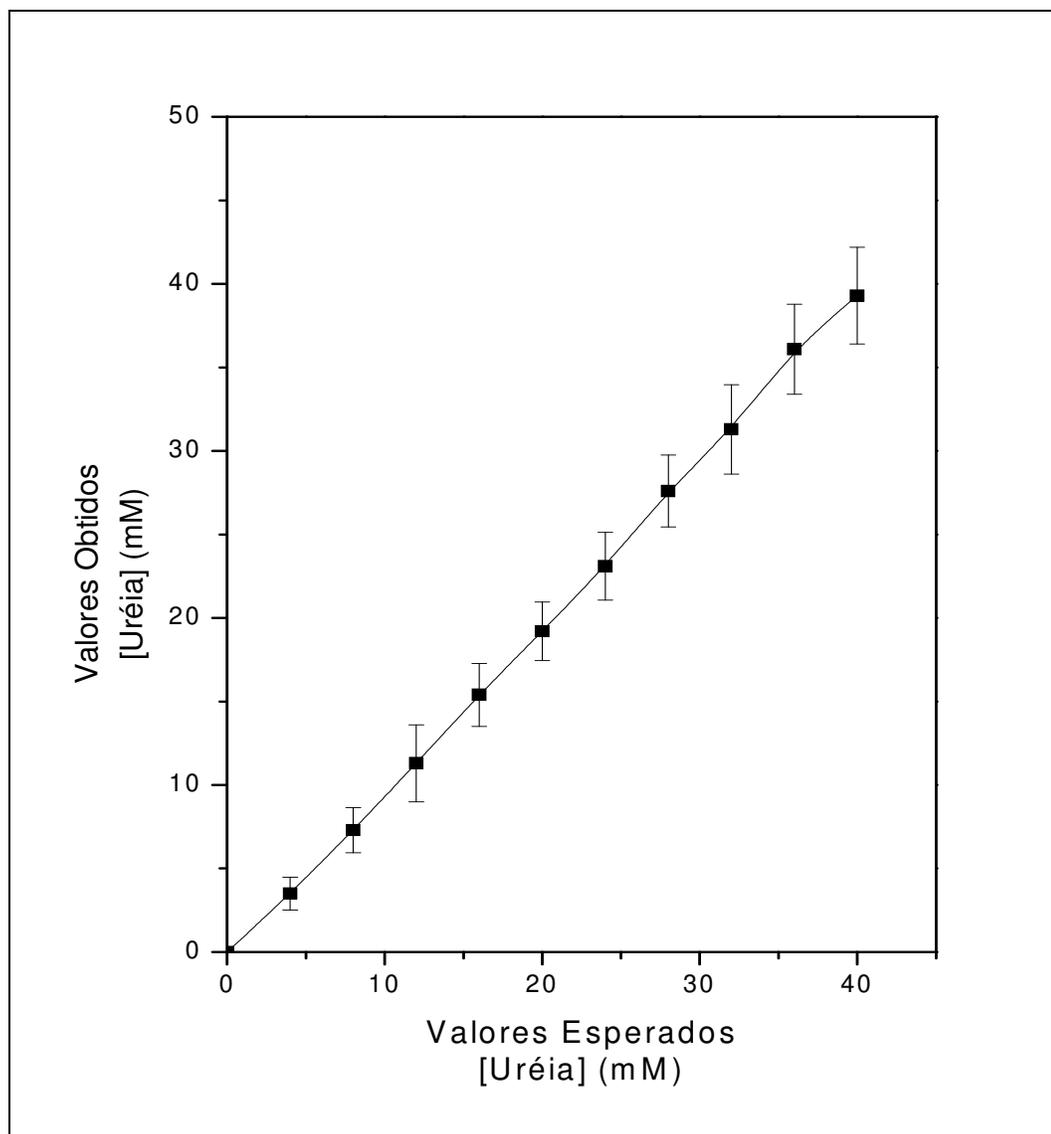
<sup>e</sup>Correspondente ao limite clínico desejável para colesterol total.



**Figura 8.21-** Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de glicose. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos:  $Y = 1,023 (\pm 0,014) [\text{Glicose}] - 0,335 (\pm 0,177)$ ,  $R = 0,999$ .



**Figura 8.22-** Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de colesterol. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos:  $Y = 0,943 (\pm 0,025) [\text{Colesterol}] - 0,02452 (\pm 0,0159)$ ,  $R = 0,997$ .



**Figura 8.23-** Resultados esperados versus resultados obtidos para o treinamento da RNA para as concentrações de uréia. Ajuste pelo método dos quadrados mínimos:  $Y = 0,998 (\pm 0,008) [\text{Uréia}] - 0,500 (\pm 0,0190)$ ,  $R = 0,999$ .

### 8.7- Referências

- [1] IJIMA, S.; Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, v.354, p.56, 1991.
- [2] HUGHES, T. V.; Chambers, C. R.; **U.S. pat.**v. 405,p.480, 1889.
- [3] KROTO, H. W.; HEATH, J. R.; O'BRIEN, C. O.; CURL, R. F.; SMALLEY, R. E.; **Nature**, v.318, p.162, 1985.
- [4] DAY, L.; MAU, A. W. H. **Adv. Mater.** v.13, p.899, 2001.

- [5] Disponível em: [http://www.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0521262\\_07\\_cap\\_01.pdf](http://www.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0521262_07_cap_01.pdf)  
Acessado em 21/04/08.
- [6] AJYAN, P.M. Nanotubes from carbo. **Chem. Rev.**, v. 99, n. 7, p. 1787-1799, 1999.
- [7] CONROY, K.G. & BRESLIN, C.B. The electrochemical deposition of polyaniline at pure aluminium: electrochemical activity and corrosion protection properties. **Electroc. Act.**, 48, p. 271-32, 2003.
- [8] FAEZ, R.; MARTINS, C.R.; FREITAS, P.S.; KOSIMA, O.K.; RUGGERI, G.; PAOLI, M.A. Polímeros condutores. **Química Nova**. n.11, 2000.
- [9] PARK, SM.; LEE, H.J. Recent advances in electrochemical studies of  $\pi$ - conjugated polymers. **Bull. Korean. Chem. Soc.**, 26 (5), p. 697-706, 2005.
- [10] EFTEKHARI, A. Electropolymerization of aniline onto passivated substrate and its application for preparation of enzyme-modified electrode. **Synt. met.**, 145, p. 211-216, 2004.
- [11] FERNANDES, E.G.R.; SOARES, D.A.W.; DE QUEIROZ, A.A.A. Electrical properties of electrodeposited polyaniline nanotubes. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, v.19, n.5, p.457-462, 2008.
- [12] KNISCHKA, R.; LUTZ, P.J.; SUNDER, A.; MULHAUPT, R.M.; FREY, H. Functional poly(ethylene oxide) multiarm star polymers: core-first synthesis using hyperbranched polyglycerol initiators. **Macr.**, v.33, p. 315-20, 2000.
- [13] TOMALIA D.A., NAYLOR A.M., GODDARD W.A. Starbust dendrimers: molecular level control of size, shape, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. **Angew.Chem.Int.** ed. 29, p.138-75, 1990.
- [14] MOORE, J.C. **J.Polym.Sci.**, p.835, 1964.
- [15] COWIE, J.M.G. **Polymers: chemistry & physics of modern materials**. New York, Chapman & Hall, p. 210-3, 1991.
- [16] SANTOS, A.N.; FERNANDES, E.G.R.; QUEIROZ, A.A.A. Properties of glucose biosensors based on dendrimer layers: Effect of dendrimer topology. SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS EM MATERIAIS. 2007, Natal, **Anais**, Rio Grande do Norte.
- [17] GIAROLA, V. M. **Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis**. 2007, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.

- [18] SILVA, A R.P. **Estudo das propriedades bioquímicas de sistemas arborescentes PGLD-AAS para o tratamento do câncer**. 2008, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.
- [19] QUEIROZ, A.A.A.; VARGAS, R.R.; HIGA, O.Z.; RIBEIRO, R.R.; VÍTOLO, M. Lactam-Amide Graft Copolymers as Novel Support for Enzyme Immobilization, p. 767-777, 2001.
- [20] SVOBODOVÁ, L.; SNEJDÁRKOVÁ, M.; HIANIK, T. **Anal.Bioanal.Chem.**, v.373, p.735, 2002.
- [21] VIEIRA, N.C.S. Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ . **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), 2006. Orientador: Prof. Dr. Álvaro A. A. de Queiroz.
- [22] TOMALIA, D.A.; HEDSTRAND, D. M.; FERRITTO, M. S. **Macromolecules**, v. 24, p. 1435, 1991.
- [23] LASKIN, A. I. Enzymes and immobilized cells in biotechnology. EUA, Benjamin/Cummings Co, 1985.
- [24] WILSON, F.R.; WILSON, G.S. **Anal.Chem.**, v.240, p.2209, 1965.
- [25] LIU, Y.; ZHANG X.; LIU, H.; DENG, J. Immobilization of Glucose Oxidase onto The Blend Membrane of Poly(vinyl alcohol) and Regenerated Silk Fibroin: Morphology and Application to Glucose Biosensor. **Journal of Biotechnology**, v. 46, p. 131-138, 1996.
- [26] ESFAND, R.; TOMALIA, D.A.; Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. **Drug Discovery Today**, v.6, p. 427-436, 2001.
- [27] GUPTE, A.; NAGARQJAN, R.; KILARA, A. Enzymatic Oxidation of Cholesterol in Reverse Micelles. **Ind. Eng. Chem. Res.**v.34, p. 2910-2922, 1995.
- [28] FISHBEIN, W.N.; WINTER, T.S.; DAVIDSON, J. D. Urease Catalysis: I. stoichiometry, specificity, and kinetics of a second substrate: hydroxyurea. **Journal of Biological Chemistry**. v. 240, n. 6, 1965.
- [29] MOITA NETO J.M., MOITA G.C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v. 21, p.467-469, 1998.
- [30] BROWN C.W., ELO S.C. Chemical information based on neural network processing of near-IR spectra. **Anal.Chem.** v. 70, p.2983-2990, 1998.

## Capítulo 9- Conclusões

---

O estudo das propriedades cinéticas dos dendrímeros PGLD, CHD e PPID bioconjugados com as enzimas GOx, COx e urease foi realizado através de ensaios eletroquímicos para análise da resposta do biossensor ao seu respectivo substrato. Cada ensaio foi essencial tanto para a caracterização dos dendrímeros quanto à sua utilização como nanoplataforma para imobilização do biocatalizador quanto à sua performance na análise clínica dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia.

Em linhas gerais, concluiu-se deste trabalho que os dendrímeros PGLD, CHD e PPID bioconjugados com as enzimas GOx, COx e urease apresentam respostas eletroquímicas diferenciadas em presença dos substratos glicose, colesterol e uréia, respectivamente. Dentre os bioconjugados, mereceu destaque o bioconjugado baseado no dendrímero PGLD que apresentou alta estabilidade operacional e de armazenamento. No caso particular dos dendrímeros CHD e PPID, concluiu-se serem necessários estudos mais aprofundados do trinômio densidade de cargas/difusão do substrato/topologia. Finalmente, os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

### 9.1- Quanto ao mediador de elétrons

- a) A polianilina depositada eletroquimicamente pela técnica da matriz digitalizadora apresentou estrutura de nanotubos com elevada área superficial.
- b) Os nanotubos de polianilina apresentaram comportamento elétrico adequado para atuarem no processo de transferência eletrônica nas reações enzimáticas.

### 9.2- Quanto aos dendrímeros

- a) Os sistemas macromoleculares PGLD, CHD e PPID apresentaram baixa polidispersão e grau de ramificação próximo de 1, propriedades estas características de dendrímeros.

### 9.3- Quanto aos biossensores

- a) As características elétricas observadas permitem concluir uma boa homogeneidade na distribuição dos bioconjugados na rede de nanotubos de polianilina.
- b) Os bioconjugados de PGLD apresentaram melhor resposta biossensora relativamente aos bioconjugados de CHD e COx.
- c) A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) para os bioconjugados baseados no PGLD são: 5,71 mM (GOx), 0,84 mM (COx) e 170,39 (urease).
- d) A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) para os bioconjugados baseados no CHD são: 6,71 mM (GOx), 0,92 mM (COx) e 291,81 (urease).
- e) A constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{app}$ ) para os bioconjugados baseados no PPID são: 7,54 mM (GOx), 6,25 mM (COx) e 19,06 (urease).
- f) As constantes cinéticas indicaram que o PGLD como a nanoplataforma mais adequada para o preparo de biossensores dos hemometabólitos glicose, colesterol e uréia.
- g) Os biossensores desenvolvidos nesta dissertação apresentaram a corrente resposta aos hemometabólitos em tempo inferior aos valores da literatura/comerciais.
- h) A relação entre a corrente resposta e o potencial aplicado para os biossensores amperométricos desenvolvidos neste trabalho foram da ordem de 400 mV (glicose), 700 mV (colesterol) e 600 mV (uréia).
- i) Os bioconjugados baseados no dendrímero de PGLD apresentaram uma maior estabilidade quanto ao tempo de armazenamento em solução fisiológica, relativamente às enzimas livres.
- j) A rede neural construída para a determinação dos hemometabólitos mostrou-se eficiente durante a fase de treinamento e teste da rede. Entretanto, a aplicação da rede deve ser validada frente a amostras clínicas reais.

## Capítulo 10- Perspectivas futuras

---

O número de pessoas com disfunções hemometabólicas nos níveis de glicose, colesterol e uréia tem se mostrado elevado no Brasil e no mundo. Os altos níveis destes metabólitos no sangue é fator de risco para o desenvolvimento de várias complicações, como diabetes, infarto do miocárdio, amputação de membros inferiores, hemodiálise, perda da visão dentre outras.

Sistemas inteligentes para o monitoramento de hemometabólitos representam um elevado potencial de crescimento mercadológico. Os biossensores já têm sido utilizados para tal finalidade, contudo, ainda é grande o número de pessoas que ainda não têm acesso ao monitoramento dos níveis de glicose, colesterol e uréia, devido ao alto custo dos dispositivos atuais. Neste sentido, espera-se que o presente trabalho possa despertar o interesse para o desenvolvimento de biossensores nacionais.

Algumas etapas necessitam ser estudadas e analisadas cuidadosamente quanto ao projeto de um biossensor multienzimático genuinamente nacional. Neste sentido, esta dissertação se propôs a estudar novas plataformas orgânicas para a imobilização de enzimas. Como já citado anteriormente, a imobilização de enzimas representa uma etapa essencial no projeto de biossensores.

As perspectivas de continuidade deste trabalho repousam em três aspectos principais a saber, validar clinicamente o biossensor obtido, avaliar as propriedades biocompatíveis com vistas à obtenção de um biossensor implantável, desenvolver um chip de armazenamento de dados não volátil (EPROM- erasable programmable read-only memory).