

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ  
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais  
Departamento de Física e Química/Instituto de Ciências Exatas  
Dissertação de Mestrado

**Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em  
Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$**

**NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA**

**Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI**

Setembro de 2006

Nirton Cristi Silva Vieira

**Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em  
Dendrímeros PAMAM e Filmes Finos de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$**

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

Área de concentração: Polímeros e Cerâmicas.

Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – UNIFEI

Itajubá  
Universidade Federal de Itajubá  
2006

*À minha avó Maria, aos meus pais,  
Antônio e Leila, à minha irmã Vanessa, e  
à minha tia Lílian. Enfim a toda minha  
família...*

*... À memória de meu avô Osvaldo: sei que  
ainda cuidastes de mim...*

*...À minha namorada e futura esposa Bruna,  
pelo amor, compreensão e paciência...*

## **Agradecimentos**

Aproveito a oportunidade para agradecer, em uma ordem cronológica, aqueles que, passando por minha vida, tornaram possível a realização deste trabalho. A todos, meu muito obrigado.

A Deus, cheio de bondade, que me deu saúde e força de vontade para vencer todos os meus obstáculos;

À minha avó que sempre me deu carinho e amor, e nada me cobrou a não ser um dia o retorno para casa;

Ao meu pai Toninho, exemplo de caráter e dedicação, que desde cedo me mostrou a nobreza do trabalho e que sempre me apoiou em minhas decisões. Você pode não ter estudado como muitos, mas para mim o senhor sempre será meu doutor na arte da vida.

À minha mãe Leila, por toda a sua dedicação e carinho. Mãe a senhora, sem dúvida se esforçou o máximo para nos criar. Se não foi a melhores coisas e oportunidades que tivemos, sem dúvida foi o possível e feito, acima de tudo, com muito amor.

À minha irmã Vanessa, pelo carinho, amor e compreensão. Valeu mana! Nunca me esquecerei que em dias difíceis você abdicou de um ano de sua vida escolar em prol de meus estudos;

À minha tia LÍlian pela paciência em minha infância. Credo! Como eu te dava trabalho;

À Késia e Rosângela pelo carinho, paciência e por participar de minha criação;

À minha namorada Bruna. Depois da tempestade sempre vem a bonança. Não sabia que a tempestade seria tão forte e que a bonança seria tão boa assim;

Aos todos os meus professores, desde as “Tias” Beatriz e Ana Maria, minhas primeiras professoras;

Aos colegas do ensino fundamental, médio e graduação, pelos momentos agradáveis que nunca mais voltarão, a não ser na lembrança;

Ao professor e amigo Carlos Bernardes pelo incentivo, amizade e por todos os conselhos desde a graduação, valeu cara! Tudo começou com seu incentivo;

Ao professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, exemplo de caráter, brilhantismo e dedicação, por sua orientação acadêmica, pela amizade, paciência e por dividir comigo essa jornada;

Aos demais professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia pelo desenvolvimento do meu conhecimento científico, especialmente ao Prof. Dr. Piotr Trzesniak, por acreditar em mim desde o começo;

Ao professor Dr. Demétrio Artur Werner Soares por permitir a utilização do laboratório de caracterização elétrica;

Aos professores do IPEN-USP pelas análises microestruturais;

Ao amigo Edson Giuliani, pelos conselhos e amizade.

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

Às funcionárias da PPG, em especial à Maria Auta, Cristina e Margarete;

À vizinha Dona Dil, uma segunda mãe; por toda sua paciência e carinho;

Aos colegas da República Formiga Jedi, lugar onde sempre encontramos amizade e boa convivência;

Aos colegas do curso de Mestrado em Materiais para Engenharia, em especial a Laiza, Mayler, Ronaldo, Rodrigo, Camila, Marcelo, Vanessa, enfim, a toda aquela turma antiga;

Aos colegas da EEMC, em especial ao professor José Paulo, pela amizade e substituição em horas difíceis e à professora Amelúcia por sua amizade e correções ortográficas.

Aos colegas da EEWB, em especial à diretora Leda, aos vices Ramon e Andréia e aos professores Vânia, Luis Rogério, Gamariel e Bete, pela compreensão, amizade e convivência;

Ao meu amigo José dos Reis do SAAE-Pains pela compreensão e apoio nas épocas de graduação;

À amiga Elis da Santa Casa de Misericórdia de Itajubá pelo acompanhamento dos testes de glicose;

Aos meus alunos de ensino médio de todas as escolas que lecionei. Eu mais aprendi que ensinei convivendo com vocês.

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

**Valeu!**

## INTERMEZZO

I



II



III

Não me entrego sem lutar  
Tenho ainda coração.  
Não aprendi a me render:  
Que caia o inimigo então.

(Legião Urbana)

O guerreiro de fé nunca gela,  
Não agrada o injusto, e não amarela,  
O rei dos reis, foi traído, e sangrou nessa terra,  
Mas morrer como um homem é o prêmio da guerra.

(Racionais)

## 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>  | xiii |
| <b>Capítulo 1 – A glicose e o diabetes melito</b>                      | 1    |
| <b>1.1 O metabolismo da glicose o organismo</b>                        | 1    |
| <b>1.2 O diabetes melito</b>   | 5    |
| <b>1.3 Análise clínica do diabetes melito</b>                          | 7    |
| <b>1.4 Considerações finais</b>  | 12   |
| <b>1.5 Referências</b>   | 13   |
| <b>Capítulo 2 – Biossensores clínicos: conceitos gerais e evolução</b> | 15   |
| <b>2.1 Aspectos gerais</b>   | 15   |
| <b>2.1.1 Biossensores amperométricos</b>                               | 17   |
| <b>2.2.2 Biossensores potenciométricos</b>                             | 20   |
| <b>2.2.3 Biossensores ópticos</b>                                      | 22   |
| <b>2.2.4 Biossensores piezoelétricos</b>                               | 24   |
| <b>2.2.5 Biossensores calorimétricos</b>                               | 25   |
| <b>2.2 Considerações finais</b>  | 26   |



|   |           |
|---|-----------|
| 2.3 Referências   | 26        |
| <b>Capítulo 3 – As enzimas: a essência de um biossensor</b>   | <b>30</b> |
| 3.1 Noções gerais   | 30        |
| 3.2 Mecanismos da ação enzimática                             | 32        |
| 3.3 As enzimas glicose oxidase (GOx) e Peroxidase (HRP)       | 41        |
| 3.4 Técnicas de imobilização de enzimas                       | 44        |
| 3.4.1 <i>Encapsulamento</i>                                   | 45        |
| 3.4.2 <i>Adsorção</i>   | 46        |
| 3.4.3 <i>Ligação covalente</i>                                | 47        |
| 3.5.4 <i>Ligação covalente cruzada</i>                        | 49        |
| 3.5 Considerações finais                                      | 49        |
| 3.6 Referências   | 50        |
| <b>Capítulo 4 – Macromoléculas com arquitetura dendrítica</b> | <b>54</b> |
| 4.1 Histórico sobre o desenvolvimento de dendrímeros          | 54        |
| 4.2 A síntese de macromoléculas dendríticas                   | 56        |
| 4.3 O dendrímero PAMAM  | 58        |
| 4.4 Características elétricas do dendrímero PAMAM             | 59        |
| 4.5 Considerações finais                                      | 61        |
| 4.6 Referências   | 62        |
| <b>Capítulo 5 – O óxido de índio dopado com estanho (ITO)</b> | <b>65</b> |
| 5.1 Propriedades dos filmes ITO                               | 65        |

|   |    |
|---|----|
| 5.2 Aplicações de filmes de ITO no projeto de biossensores                    | 66 |
| 5.3 Preparação de filmes de ITO   | 69 |
| 5.4 Considerações finais  | 70 |
| 5.5 Referências   | 71 |
| <b>Capítulo 6 – Objetivos</b>   | 74 |
| <b>Capítulo 7 – Materiais e métodos</b>                                       | 75 |
| 7.1 Síntese e caracterização do eletrodo: filmes finos de ITO                 | 75 |
| 7.2 Obtenção do biossensor de glicose   | 77 |
| 7.2.1 <i>Síntese e caracterização do dendrímero PAMAM</i>                     | 77 |
| 7.2.2 <i>Imobilização das enzimas</i>   | 78 |
| 7.2.3 <i>Análise da performance do biossensor</i>                             | 80 |
| 7.3 Fundamentos das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho      | 81 |
| 7.3.1 <i>Caracterização espectroscópica: UV-Vis, FTIR e <sup>1</sup>H-NMR</i> | 81 |
| 7.3.2 <i>Caracterização elétrica</i>  | 83 |
| 7.3.3 <i>Caracterização microestrutural: MEV e DRX</i>                        | 86 |
| 7.4 Referências   | 88 |
| <b>Capítulo 8 – Resultados e discussão</b>                                    | 90 |
| 8.1 Caracterização dos filmes de ITO  | 90 |
| 8.1.1 <i>Estudo da condutividade elétrica</i>                                 | 90 |
| 8.1.2 <i>Caracterização espectroscópica (UV-Vis)</i>                          | 91 |
| 8.1.3 <i>Análise microestrutural (MEV, DRX).</i>                              | 93 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>8.2 Caracterização do dendrímero PAMAM</b>                                 | 96  |
| <i>8.2.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i>                          | 96  |
| <i>8.2.2 Caracterização espectroscópica (FTIR, UV-Vis, <sup>1</sup>H-NMR)</i> | 99  |
| <i>8.2.3 Estudo da condutividade elétrica</i>                                 | 103 |
| <i>8.2.4 Modelagem Molecular.</i>   | 107 |
| <b>8.3 Performance do Biossensor</b>  | 112 |
| <b>8.4 Referências</b>  | 115 |
| <b>Capítulo 9 – Conclusões</b>  | 118 |
| <b>Capítulo 10 – Perspectivas futuras</b>                                     | 120 |

## Lista de figuras

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 - Fórmula estrutural da molécula de glicose.....  | 1  |
| Figura 1.2 - Representação esquemática do metabolismo da glicose no organismo: 1º fase (a) e 2º fase (b).....  | 2  |
| Figura 1.3 - Mecanismo de transporte de glicose pela ação da insulina.....   | 4  |
| Figura 1.4 - Número de diabéticos no Brasil e no mundo e uma projeção de sua evolução até o ano de 2024. <sup>8</sup> .....  | 6  |
| Figura 1.5 - Reação proposta por Trinder para a oxidação da 4-aminofenazona.....   | 8  |
| Figura 1.6 - Reação de oxidação da glicose em um biossensor.....   | 9  |
| Figura 1.7 - Aparelho biossensor Accu-Chek Advantage Complete mais fita enzimática.....  | 10 |
| Figura 1.8 - Evolução dos trabalhos científicos sobre biossensores de glicose até agosto de 2006. <sup>16</sup> .....  | 11 |
| Figura 1.9 - Teste clínico de glicose efetuado através de um biossensor comercial..  | 12 |
| Figura 2.1 - Componentes básicos de um biossensor: biocatalisador (a), transdutor (b), amplificador (c), processador (d).....  | 16 |
| Figura 2.2 - Representação esquemática para biossensores amperométricos segundo o processo de transferência de cargas. 1º geração (a), 2º geração (b), 3º geração (c). <sup>12</sup> .....   | 19 |
| Figura 2.3 - Representação esquemática de um biossensor amperométrico de 1º geração: Um potencial é aplicado entre o catodo de platina e o anodo de prata, gerando uma corrente (I) que escoar entre os eletrodos por meio de uma solução saturada do KCl..... | 20 |
| Figura 2.4 - Estrutura física de um MOSFET (a) em comparação com um ISFET (b).....   | 22 |
| Figura 3.1 - Representação da energia de ativação $E_a$ de uma reação não enzimática e uma reação enzimática: $\Delta G$ – energia livre de Gibbs, S-substrato e P-produto.  | 31 |
| Figura 3.2 - Modelo chave-fechadura para ação enzimática.....  | 34 |
| Figura 3.3 - Mudança conformacional do sítio ativo de uma enzima adaptando-se ao seu substrato.....  | 35 |
| Figura 3.4 - Fotografias de Leonor Michaelis e Maud Menten.....  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 3.5 - Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.....  | 40 |
| Figura 3.6 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.....  | 42 |
| Figura 3.7 - Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase. O FAD está representado pela região vermelha.....  | 42 |
| Figura 3.8 - Estrutura de fitas representando a enzima peroxidase. No centro está representado seu sítio ativo.....  | 43 |
| Figura 3.9 - Principais métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas.....  | 45 |
| Figura 3.10 - Ativação de suportes para imobilização covalente de enzimas: Complexação com cloreto cianúrico (A), silanização (B), reação com carbodiimina (C), glutaraldeído (D). Figura reproduzida da referência 27 com permissão do autor.....     | 48 |
| Figura 4.1 - Estruturas poliméricas clássicas (a) comparativamente a estruturas dendríticas (b).....   | 55 |
| Figura 4.2 - Técnicas de síntese de dendrímeros: método divergente (a), método convergente (b). O número de gerações é representado por G.....   | 57 |
| Figura 4.3 - Estrutura de um dendrímero PAMAM de 1º geração (G1).....  | 59 |
| Figura 4.4 - Estrutura química de alguns polímeros intrinsecamente condutores.....   | 60 |
| Figura 5.1 - Superfície do ITO usada na imobilização de grupos carboxílicos e aminas.....  | 67 |
| Figura 5.2 - ITO usado em EGFETs: EGFET convencional (a), ITO altamente dopado substituindo o Al (b), ITO como parte da membrana sensível (c). P, F e D representam, respectivamente, os eletrodos porta, fonte e dreno de um MOSFET convencional..... | 68 |
| Figura 7.1 - Fotografia do filme de ITO depositado em vidro obtido neste trabalho.....   | 76 |
| Figura 7.2 - Aparato experimental usado na caracterização por 4 pontos dos filmes de ITO depositados em vidro: vista de perfil (a); a mesma montagem vista por cima (b).....   | 76 |
| Figura 7.3 - Representação do biossensor obtido: ITO/PAMAM-GOx-HRP.....  | 79 |
| Figura 7.4 - Ilustração do processo de imobilização enzimática adotado neste trabalho.....   | 79 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 7.5 - Esquema da configuração usada para medida do sinal do biossensor ITO/PAMAM-GO <sub>x</sub> -HRP.....  | 81  |
| Figura 7.6 - Montagem básica para medida da resistividade/condutividade superficial de um material. <sup>6</sup> .....   | 83  |
| Figura 7.7 - Configuração para caracterização 4 pontos.....  | 84  |
| Figura 7.8 - Aparelhagem utilizada para caracterização morfológica: Microscópio MEV (a) e EDS (b) (IPEN/USP). ....   | 87  |
| Figura 7.9 - Condição para ocorrência da difração de raios-X.....  | 88  |
| Figura 8.1 - Comportamento I(V) do filme de ITO depositado em vidro obtido neste trabalho. Temperatura: 25 °C.....   | 90  |
| Figura 8.2 - Espectros de absorção UV-Vis para o óxido de índio (a) e para o ITO (b).....  | 92  |
| Figura 8.3 - Imagem típica de MEV da superfície dos filmes de ITO depositados em substrato de vidro: (a) ampliação de 1000 vezes e (b) 3000 vezes.....   | 95  |
| Figura 8.4 - Difratoograma de raios-X de um dos filmes obtido. Em Azul In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e verde In <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :Sn. No fundo está representação de uma estrutura cúbica de bixbyita. A esferas negras representam os átomos de índio e as brancas os átomos de oxigênio. | 96  |
| Figura 8.5 - Curva de calibração (a) e análise por GPC (b) do PAMAM G4 obtido neste trabalho.....  | 99  |
| Figura 8.6 - Espectro UV-Vis do dendrímero PAMAM (G4).....   | 100 |
| Figura 8.7 - Espectro FTIR do dendrímero PAMAM (G4).....   | 101 |
| Figura 8.8 - Espectro <sup>1</sup> H-NMR do dendrímero PAMAM G4 em CD <sub>3</sub> OD.....   | 102 |
| Figura 8.9 - Comportamento elétrico I(V) da heterojunção PAMAM/Al: PAMAM G0 (a) e PAMAM G1 (b).....  | 104 |
| Figura 8.10 - Dependência da condutividade do PAMAM G4 com T <sup>-1/2</sup> (a) e T <sup>-1/4</sup> (b). Intervalo de temperatura estudado: 291-323 K a 1 atm.....  | 107 |
| Figura 8.11 - Distribuição espacial dos orbitais de fronteira do PAMAM G0: HOMO (a) e LUMO (b).....  | 108 |
| Figura 8.12 - Distribuição espacial dos orbitais de fronteira do PAMAM G1: HOMO (a) e LUMO (b).....  | 109 |
| Figura 8.13 - Potencial eletrostático para o PAMAM G0.....   | 111 |
| Figura 8.14 - Potencial eletrostático para o PAMAM G1.....   | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 8.15 - Resposta do biossensor amperométrico ITO/PAMAM-GO <sub>x</sub> -HRP em função do tempo. Concentração de glicose 100 mg.dL <sup>-1</sup> .....  | 112 |
| Figura 8.16 - Resposta do biossensor ITO/PAMAM-GO <sub>x</sub> -HRP em função da concentração de glicose a um potencial anódico de 100 mV aplicado no eletrodo de trabalho.....  | 113 |
| Figura 8.17 - Linearização da resposta do biossensor ITO/PAMAM-GO <sub>x</sub> -HRP em função da concentração de glicose a um potencial anódico de 100 mV aplicado no eletrodo de trabalho. Os resultados obtidos correspondem a três medidas..... | 114 |

**Lista de tabelas**

---

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Alguns eletrodos enzimáticos utilizados em determinações analíticas. <sup>9</sup> .....  | 7  |
| Tabela 2 - Propriedades eletroópticas dos filmes de $\text{In}_2\text{O}_3$ e $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ obtidos. Os resultados estão de acordo com a literatura. <sup>1-5</sup> ..... | 93 |



## Lista de abreviaturas

---

- [E] – Concentração de enzima
- [ES] – Concentração de enzima e substrato
- [S] – Concentração de substrato
- <sup>1</sup>HNMR – Ressonância magnética nuclear de prótons
- ADP – Adenosina difosfato
- ATP – Adenosina trifosfato
- CVD – Evaporação química a partir da fase vapor
- E – Enzima
- ENFET – Transistor de efeito de campo enzimático
- EP – complexo enzima-produto
- ERE – Imagem de elétrons retroespalhados
- ES – Complexo enzima-substrato
- ES – Elétrons secundários
- FAD – Flavina adenina dinucleotídio
- FADH<sub>2</sub> – Flavina adenina dinucleotídio em forma reduzida
- FET – Transistor de efeito de campo
- FTIR – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier
- GLUT4 – Transportador de glicose
- GOx – Glicose oxidase
- GPC – Cromatografia de permeação em gel
- HOMO – Orbital molecular mais alto ocupado
- HRP – Peroxidase
- I(V) – Caracterização elétrica: monitoração da corrente elétrica I em função tensão V.
- IRS – Substrato receptor de insulina
- ISFET – Transistor de efeito de campo íon-seletivo
- ITO – Óxido de índio dopado com estanho
- LUMO – Orbital molecular mais baixo desocupado
- MEV – Microscopia eletrônica de Varredura
- MOSFET – Transistor de efeito de campo metal óxido semiconductor

P – Produto

PAMAM – Poli(amidoamina)

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

S – Substrato

TCO – Óxido condutor transparente

UV-Vis – Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível

## Resumo

---

Dendrímeros são polímeros isomoleculares com uma arquitetura bem definida que encontram um grande potencial para aplicação em medicina, incluindo diagnóstico e procedimentos terapêuticos. Bioconjugados de dendrímeros e enzimas são de grande interesse para aplicações em biossensores clínicos pelo fato das propriedades químicas destes materiais poderem ser adequadamente controladas. Neste trabalho, dendrímeros de poli(amidoamina) (PAMAM) de geração 4 (G4) foram sintetizados via rota divergente e caracterizados por espectroscopia UV-Vis, FTIR e NMR. A condutividade do dendrímero PAMAM é dependente de seu número de geração. Para uma melhor compreensão das propriedades do transporte eletrônico nos filmes de PAMAM, foi proposto um modelo teórico para a explicação da dependência entre a condutividade elétrica do dendrímero e o número de geração através de métodos da química quântica. As propriedades dos filmes finos de ITO como eletrodo em um biossensor de glicose baseado no bioconjugado de dendrímeros poli(amidoamina) (PAMAM)-Glicose oxidase (GOx)-Peroxidase (HRP) (PAMAM-GOx-HRP), são apresentadas. A grande afinidade eletrônica (ou função trabalho) dos filmes finos de ITO é adequada para promover o transporte eletrônico da reação redox enzimaticamente catalisada na interface do nanobiossensor PAMAM-GOx-HRP. Filmes nanoestruturados de ITO (100-200 nm) foram depositados em substrato de vidro pela técnica de deposição química a partir da fase vapor (CVD). Os filmes de ITO obtidos foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis e difratometria de raios-X. A superfície do filme de ITO apresentou boa transparência ótica, resultado de sua estrutura cristalina nanométrica. O bioconjugado PAMAM-GOx-HRP foi depositado em filmes finos de ITO. As propriedades sensoras do biossensor de glicose obtido neste trabalho se mostraram convenientemente adequadas em termos de sensibilidade e tempo de resposta no monitoramento de glicose, características essas, desejáveis para um dispositivo biossensor.

**Palavras-chave:** biossensor de glicose, filmes de ITO, dendrímeros PAMAM, diabetes melito.

## Abstract

---

Dendrimers are isomolecular polymers with a very well controlled architecture that have many potential applications in medicine, including diagnosis and therapeutic procedures. Bioconjugated dendrimers and enzymes are of great interest for clinical applications in biosensors design because of the way in which their chemical properties can be tailored. In this work, the poly(amidoamine) dendrimer (PAMAM) of generation 4 was synthesized by divergent route and characterized by UV-Vis, FTIR and NMR spectroscopy. The electrical conductivity of the PAMAM dendrimers was dependent of their generation number. To better understand the electronic transport through PAMAM films a molecular theoretical model using the quantum chemistry method was developed. The properties of a thin film of indium tin oxide (ITO) contact as a hole-injecting material for the design of glucose biosensors based on the bioconjugated poly(amide amine) dendrimers (PAMAM)-Glucose oxidase (GOx)-Peroxidase (HRP) (PAMAM-GOx-HRP) thin films is presented. The fairly large electron affinities (or work function) of ITO thin films may be adequate to improve the electron transfer processes at redox-enzyme interface of the PAMAM-GOx-HRP nanobiosensor. Nanosized thin layers (1–2 nm) of ITO were obtained on a glass substrate through the chemical vapor deposition (CVD) technique. The synthesized ITO thin film was characterized by using UV-Vis spectroscopy and X-ray diffraction technique. The surface of the ITO thin film was smooth and presents high transparency as the result of the nanosized crystallites of ITO. The bioconjugate PAMAM-GOx-HRP was deposited onto ITO crystalline films. The biosensing properties of the obtained glucose biosensor were sufficiently reproducible and the response times measured with respect to glucose concentration meet the requirement for glucose biosensor elements

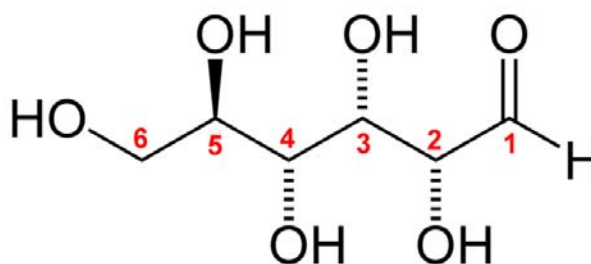
**Keywords:** glucose biosensor, ITO films, PAMAM dendrimers, diabetes mellitus.

## Capítulo 1 – A glicose e o diabetes melito

---

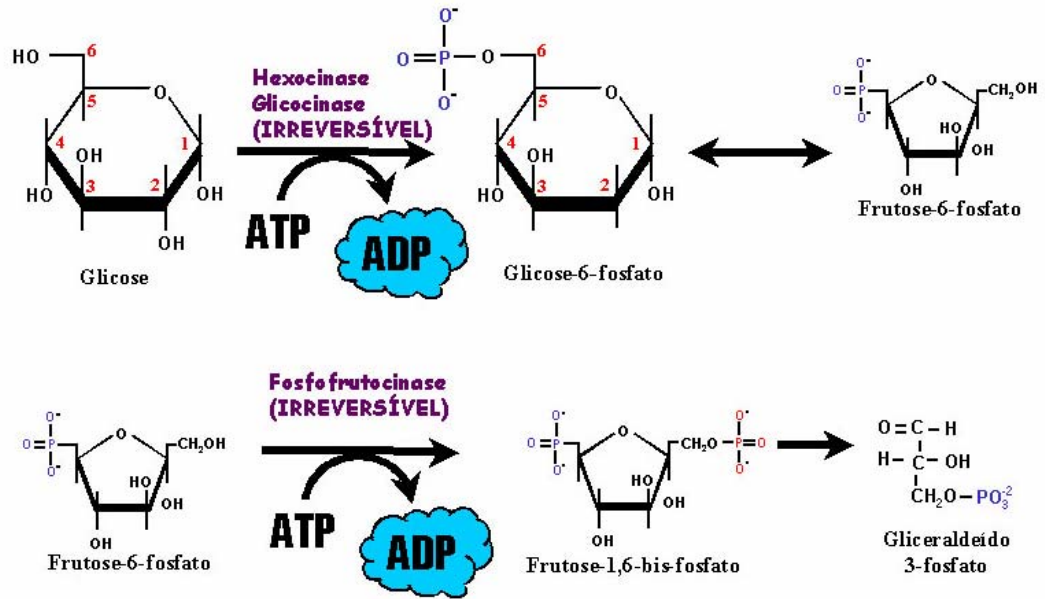
### 1.1 – O metabolismo da glicose no organismo

A glicose ou dextrose é um carboidrato do tipo monossacarídeo encontrada em vários frutos podendo ser obtida industrialmente pela hidrólise do amido.<sup>1</sup> A glicose também é chamada de açúcar do sangue, pois é o açúcar mais simples que circula nos vasos sanguíneos. A Figura 1.1 mostra a fórmula estrutural da molécula de glicose. Observa-se a presença de seis átomos de carbono bem como a presença de um grupo aldeído, dessa forma, a glicose recebe a designação de aldo-hexose segundo a classificação dos glicídeos.

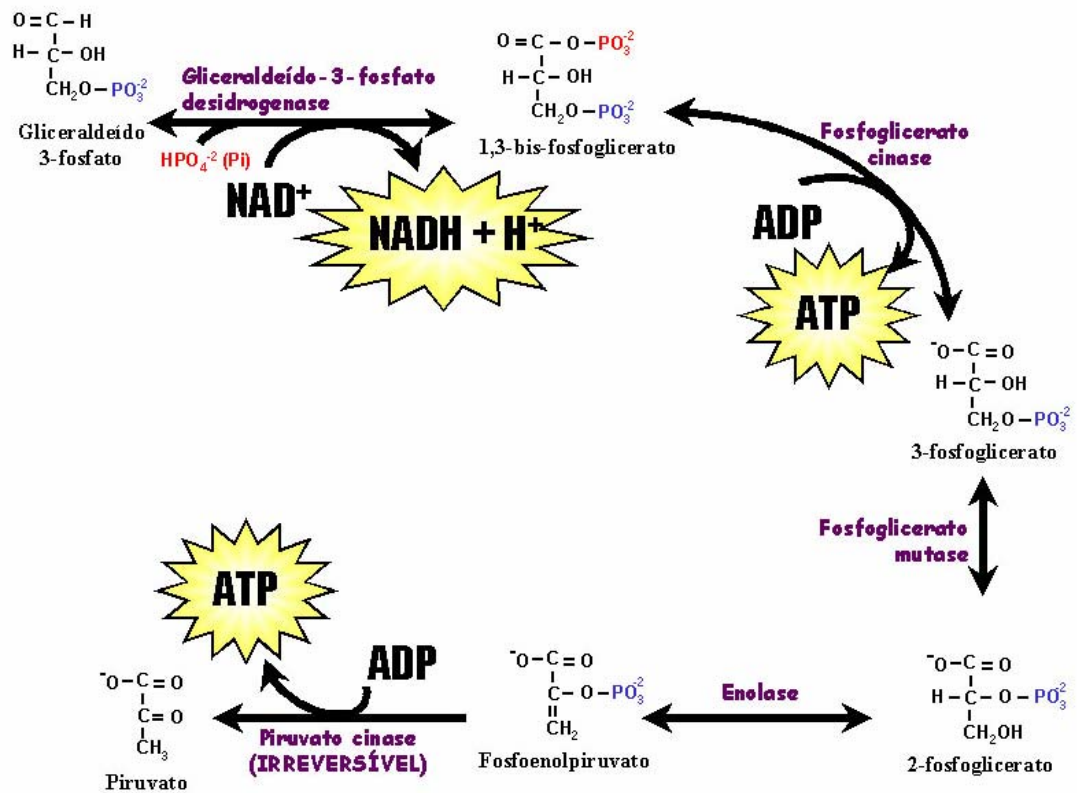


**Figura 1.1** - Fórmula estrutural da molécula de glicose.

No metabolismo, a glicose é uma das principais fontes de energia fornecendo quatro kilocalorias de energia por grama de glicose. Na obtenção de energia, uma molécula de glicose é degradada em uma série de reações catalisadas por enzimas para liberar duas moléculas de ácido pirúvico. Este processo é conhecido como glicólise e se divide em duas partes. O processo de metabolismo da glicose é ilustrado na Figura 1.2



(a)



(b)

**Figura 1.2** - Representação esquemática do metabolismo da glicose no organismo: 1º fase (a) e 2º fase (b).

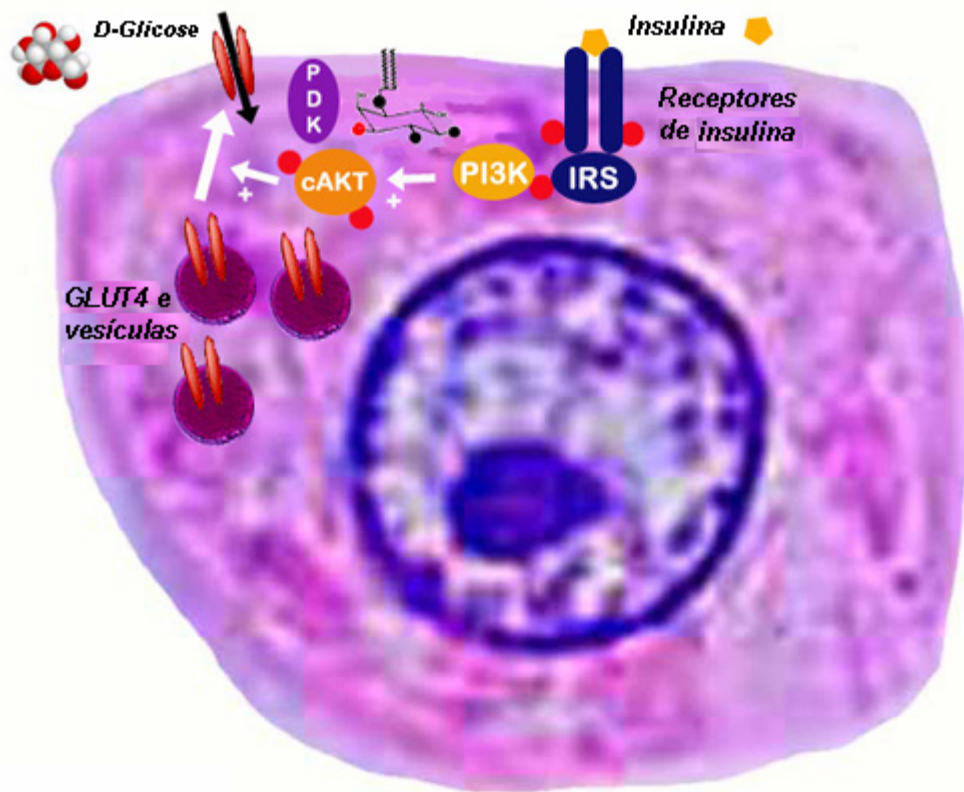
A primeira fase da glicólise vai até a formação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato e caracteriza-se como uma fase de gasto energético de duas moléculas de ATP (adenosina trifosfato) através de duas fosforilações ocorridas. A segunda fase da glicólise é caracterizada pela produção energética de quatro ATPs em reações oxidativas catalisadas enzimaticamente, que são independentes de oxigênio. Neste caso, o transporte de hidrogênio na reação de desidrogenação se dá através do NADH. Observa-se na Figura 1.2 que o rendimento energético líquido final do metabolismo anaeróbico da glicose são duas moléculas de ATP.<sup>2</sup>

Na presença de oxigênio, o piruvato formado na glicólise é oxidado nas mitocôndrias, havendo a formação de acetil-CoA e a liberação de uma molécula de CO<sub>2</sub> por cada piruvato oxidado. Este processo é conhecido como ciclo de Krebs. Sem a presença de oxigênio o piruvato é transformado em lactato ou etanol. Isso ocorre basicamente para regenerar o poder oxidante do NADH.

Para que o metabolismo da glicose no organismo ocorra normalmente é necessário que o pâncreas esteja em seu perfeito funcionamento. As células beta presentes nas ilhotas de Langerhans do pâncreas são responsáveis pela produção do hormônio insulina. Este hormônio, por sua vez, tem a finalidade de promover o transporte da glicose para as células.<sup>3</sup>

A ação da insulina (Figura 1.3) tem início por sua ligação a substratos receptores de insulina (IRS) presentes na membrana plasmática. A insulina induz a autofosforilação do receptor; o que desencadeia uma série de reações de fosforilação/desfosforilação, incluindo a ativação da enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Essa enzima promove a ativação das proteínas que estão contidas nas vesículas, as quais contêm transportadores de glicose (GLUT4). Uma vez

ativados, os GLUT4 promovem a entrada da glicose na célula onde então a energia é obtida (Figura 1.2).



**Figura 1.3** - Mecanismo de transporte de glicose pela ação da insulina.

A deficiência de insulina, ou uma falha em sua produção por parte do pâncreas, resulta em altos níveis de glicose no sangue, uma vez que a glicose não entra na célula. Dessa forma, o organismo humano está sujeito ao aparecimento de uma doença crônica denominada diabetes melito. Esta doença tem despertado a atenção dos órgãos de saúde pelo seu avanço a nível mundial.



## 1.2 – O diabetes melito

O diabetes melito envolve um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação.<sup>7</sup> A sua descoberta é datada do século XV antes de Cristo, no Egito antigo, onde se fazia menção de sintomas relacionados ao diabetes. Porém, foi Areteu da Capadócia, no século II da era cristã, que deu o nome de diabetes à doença que tinha como principal sintoma o elevado consumo de água por parte do enfermo. Atualmente, sabe-se que o diabetes se manifesta de várias formas possíveis, sendo suas formas mais frequentes o diabetes tipo 1, tipo 2 e o diabetes gestacional.<sup>8</sup>

O diabetes tipo 1 é a forma mais agressiva da doença. No diabetes tipo 1 ocorre uma destruição das células beta produtoras de insulina. O organismo entende que essas células são corpos estranhos e passa a destruí-las. Este fenômeno é conhecido como resposta auto-imune. A ciência ainda não possui um mecanismo para esse fato, porém, fatores hereditários parecem estar ligados ao surgimento do diabetes tipo 1.

Bem mais comum que o diabetes tipo 1, o diabetes tipo 2 possui um fator de hereditariedade ainda maior que o primeiro e a obesidade, bem como o sedentarismo são fatores que estão relacionados a esse tipo de diabetes. A maioria dos diabéticos tipo 2 são pessoas obesas, sendo que a maior incidência ocorre após os 40 anos.

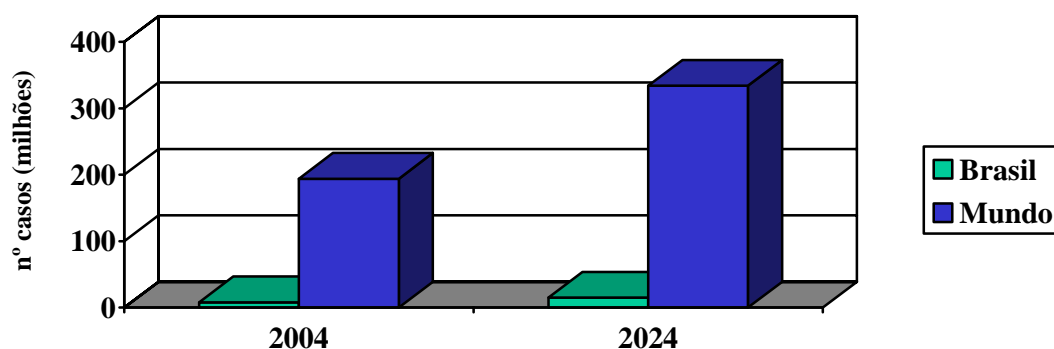
A ingestão em demasia de açúcar induz a produção de uma grande quantidade de insulina; o que leva ao metabolismo de uma quantidade maior de glicose, resultando em baixos níveis de glicose no sangue (hipoglicemia). A hipoglicemia leva o pâncreas a se “acomodar” com a não produção de insulina e quando a glicemia se torna alta novamente (frequente ingestão de açúcar, por exemplo), o pâncreas já não produz toda a insulina suficiente.

Portanto, o diabetes tipo 2 é caracterizado pela secreção inadequada de insulina pelo pâncreas; assim sendo, as células não conseguem metabolizar toda a glicose contida na corrente sanguínea (resistência insulínica).

Por fim, o diabetes gestacional é a alteração das taxas de glicose no sangue que aparece ou é detectada pela primeira vez na gravidez. A doença pode persistir ou desaparecer após o parto.

Nos estágios mais avançados da doença, o diabetes pode causar cegueira total (retinopatia), infarto do miocárdio, paralisção total ou parcial dos rins (nefropatia) e necrose, acarretando, assim, a morte do doente.<sup>9</sup>

Existe uma grande preocupação quanto ao número de diabéticos no Brasil e no mundo. Atualmente as estatísticas apontam que cerca de 194 milhões de pessoas sofrem de diabetes e outros 140 milhões poderão desenvolver a doença nos próximos 20 anos a nível mundial. Somente no Brasil, estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas desenvolverão diabetes até o ano de 2024 (Figura 1.4).<sup>8</sup>



**Figura 1.4** - Número de diabéticos no Brasil e no mundo e uma projeção de sua evolução até o ano de 2024.<sup>8</sup>

Acredita-se que no Brasil o aumento da incidência do diabetes deve-se à crescente urbanização, o que leva ao sedentarismo e ao consumo excessivo de alimentos industrializados com elevados teores de gordura, os quais favorecem o aumento de peso e conseqüentemente o aumento do risco relacionado ao diabetes.<sup>10</sup>

A taxa de glicemia, dentro dos níveis fisiológicos normais, situa-se entre 80 e 110 mg.dL<sup>-1</sup> em jejum e em torno 140 a 200 mg.dL<sup>-1</sup> após alimentação.<sup>11</sup> Níveis de glicose, acima dos citados acima, caracterizam a pré-disposição ao diabetes, sendo necessário um tratamento preventivo para controle da glicemia sanguínea. O acompanhamento clínico do paciente é indispensável para impedir as graves conseqüências dessa enfermidade.

### **1.3 – Análise clínica do diabetes melito**

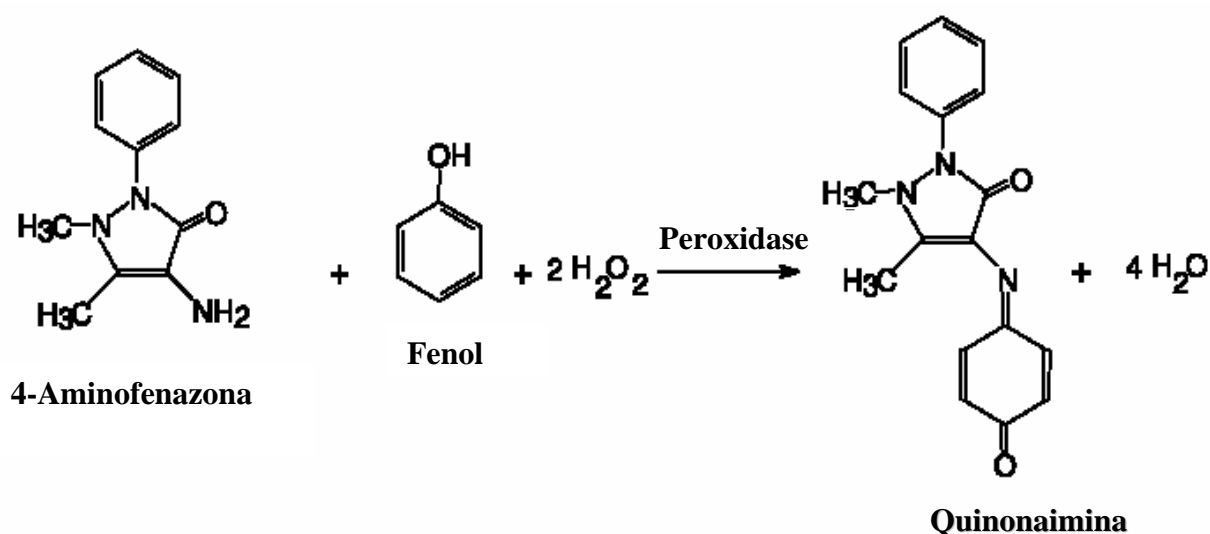
A análise clínica do diabetes melito é estabelecida pela medida da glicemia no soro ou plasma sanguíneo após um jejum de 8 a 12 horas. Tal análise envolve técnicas espectrofotométricas utilizando-se equipamentos de grande porte como espectrofotômetros automatizados (ou não) ou microanálise através de biossensores.

O ensaio espectrofotométrico para determinação de glicose no sangue envolve várias etapas. Inicialmente faz-se a coleta do material e a separação do plasma sanguíneo. Uma solução de glicose oxidase (GOx), peroxidase (HRP), 4-aminofenazona e fenol é preparada e a ela adiciona-se alguns microlitros de plasma. Há uma pausa de 10 minutos onde os reativos (plasma e solução) são incubados em banho-maria a 37°C, possibilitando então a determinação da concentração de glicose fotometricamente.

Na presença da enzima peroxidase, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) resultante da oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase, oxida compostos que

não possuem absorção na região visível em compostos coloridos. A intensidade da cor formada possui absorvância máxima em 500-520 nm e é diretamente proporcional à concentração do substrato (glicose) inicial.

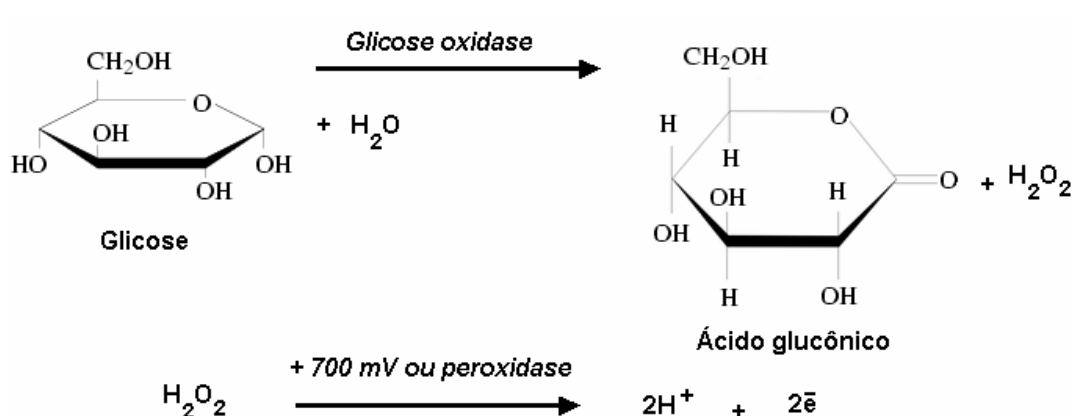
Esta metodologia para a determinação da concentração da glicose foi inicialmente descrito por Trinder em 1969.<sup>12</sup> Tal método baseia-se na oxidação da 4-aminofenazona pelo  $H_2O_2$ , a qual combina-se com um composto fenólico para formar uma quinonaimina colorida com alta absorvância em 500-520 nm. Na Figura 1.5 tem-se o mecanismo da reação de Trinder. O tempo de reação para a formação da quinonaimina é de 10 minutos à temperatura ambiente (15-30 °C) ou 5 minutos à temperatura de 37 °C.<sup>13</sup>



**Figura 1.5** - Reação proposta por Trinder para a oxidação da 4-aminofenazona.

Atualmente, testes de glicose mais rápidos e práticos podem ser efetuados através de biossensores.<sup>14</sup> Tais dispositivos baseiam-se no sinal elétrico (corrente ou tensão) criado na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase (Figura 1.6). A

reação bioquímica ilustrada na Figura em 1.6 pode alterar o pH do meio devido à formação de ácido glucônico, criando uma diferença de potencial (biossensor potenciométrico). A polarização do eletrodo pode gerar uma corrente devido à oxidação do peróxido de hidrogênio (biossensor amperométrico). O sinal amperométrico produzido é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra a ser analisada.



**Figura 1.6** - Reação de oxidação da glicose em um biossensor.

Os biossensores têm se mostrado bastante úteis em aplicações biomédicas. Neste sentido, o desenvolvimento de fitas enzimáticas para o teste de glicemia alcançou um sucesso considerável em todo o mundo. Atualmente existem no mercado farmacêutico biossensores para o ensaio clínico de vários hemometabólicos, como glicose, colesterol e triglicérides.<sup>15</sup> Entretanto, os biossensores são ainda de custo elevado para a população de baixa renda de nosso país.

Considerando-se um aparelho biossensor para determinação de glicose, em uma farmácia, o custo do aparelho (circuito digitalizador de sinais) está em torno de

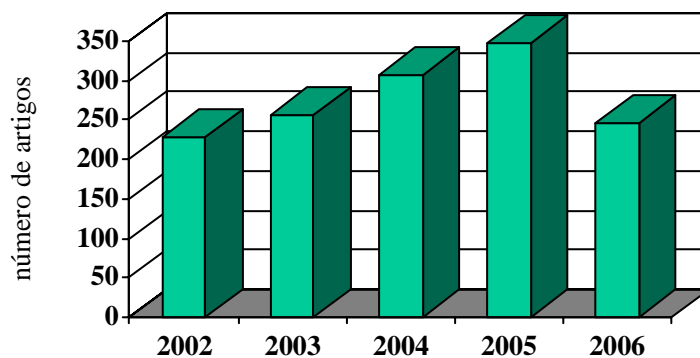
R\$ 150,00, enquanto o custo das fitas enzimáticas é de R\$ 2,50/fita (Figura 1.7).<sup>#</sup> Alguns pacientes normalmente utilizam duas ou mais fitas por dia. Uma vez que o salário mínimo em nosso país é de R\$ 350,00, conclui-se facilmente que o custo de um aparelho biossensor para determinação de glicose é consideravelmente elevado.

Um biossensor é formado essencialmente por uma enzima depositada em um eletrodo. Uma vez que a enzima não pode ser depositada diretamente sobre os metais, pois esta poderia ser inativada, novos materiais são sintetizados para que possam desempenhar a função de suportes para o biocatalisador e ao mesmo tempo mediadores para o transporte de elétrons na interface. Neste contexto, as pesquisas para o desenvolvimento e a caracterização de materiais sintéticos que possam vir a fazer parte do desenvolvimento de biossensores enzimáticos, têm se intensificado nas últimas décadas. O número de publicações relacionadas ao desenvolvimento de biossensores de glicose é de 3658 segundo o portal isiknowledge. Esse número vem evoluindo nos últimos 5 anos segundo a Figura 1.8.<sup>16</sup>



**Figura 1.7** - Aparelho biossensor Accu-Chek Advantage Complete mais fita enzimática.

<sup>#</sup> Preço médio pesquisado na cidade de Itajubá-MG em junho de 2006.



**Figura 1.8** - Evolução dos trabalhos científicos sobre biossensores de glicose até agosto de 2006.<sup>16</sup>

O teste de glicemia através de um biossensor é rápido e prático, sendo possível então, se efetuar o trabalho de prevenção do diabetes através do monitoramento da glicose no sangue utilizando-se um dispositivo de fácil manuseio.

A Figura 1.9 ilustra um teste clínico de glicose utilizando-se um biossensor comercial. Em nosso país os biossensores de glicose mais comuns são produzidos por multinacionais tais como Johnson & Johnson, Roche, Medlevenson e Glicomed. Até o presente momento não se observa o desenvolvimento a nível comercial de biossensores para o monitoramento de glicose no sangue por empresas genuinamente nacionais.



**Figura 1.9** - Teste clínico de glicose efetuado através de um biossensor comercial.

#### 1.4 – Considerações finais

O diabetes é uma doença que se caracteriza pelo alto nível de glicose no sangue (hiperglicemia). Esta doença pode causar diversas complicações, sendo que no seu estágio mais avançado, o paciente pode vir a sofrer efeitos colaterais de grande repercussão como a cegueira, infarto, nefrites ou mesmo a gangrena.

O número de pessoas que sofrem de diabetes vem aumentando significativamente no Brasil e no mundo. A perspectiva é que esse número aumente ainda mais devido ao desenfreado processo de urbanização pelo qual passa nossa sociedade. O alarmante é que no Brasil apenas a metade dos diabéticos sabe que possuem a doença. Como um diagnóstico precoce é sempre recomendado, a pesquisa para desenvolver sistemas inteligentes (biossensores) para medida da glicemia sanguínea tem se intensificado, visto que o método convencional colorimétrico é demorado e de elevado custo relativamente a um dispositivo biossensor. Porém, para a população de baixa renda de nosso país, o custo, bem como a manutenção de um biossensor, ainda é economicamente inviável.



Neste sentido, o custo elevado e a incipiente tecnologia existente em nosso país referente ao desenvolvimento de biossensores nos motivam a iniciar a pesquisa de um biossensor para a monitoração de glicose.

O princípio de funcionamento de um biossensor é norteado por vários princípios da eletroquímica. Os aspectos relevantes referentes a esses sistemas bem como o princípio de operação dos principais tipos de biossensores é abordado no próximo capítulo.

#### 1.4 – Referências

- [1] Silva, F.F.; Bertonha, A.; Freitas, P.S.L.; Muniz, A.S.; Rezende, R.; Gonçalves, A.C.A.; Labegalini, A.; Neto, V.S.C. Desdobramento do amido em glicose para identificar água residuária de indústria de mandioca no perfil do solo. *Acta Science Agronomy*, **27** (3), p. 507-511, 2005.
- [2] Lehninger, L.A. *Bioquímica 1*. Edgard Blücher, 1976.
- [3] Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, p. 799-806, 2001.
- [4] Haber, E.P.; Curi, R.; Carvalho, C.R.O.; Carpinelli, A.R. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **45** (3), p. 219-227, 2001.
- [5] Furtado, L.M.; Poon, V.; Klip, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiologica Scandinavica*, **178**, p. 287-296, 2003.
- [6] Krook, A.; Henriksson, A.W.; Zierath, J.R. Sending the signal: Molecular mechanisms regulating glucose uptake. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **36** (7), p. 1212-1217, 2004.

- [7] Gross, J.L.; Silveiro, S.P.; Camargo, J.L.; Reichelt, A.J.; Azevedo, M.J. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação de controle glicêmico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolia*, **46** (1), p. 16-25, 2002.
- [8] The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **20**, p.1183-1197, 1997.
- [9] Gross, J.L.; Nehme, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia. *Revista da Associação Médica Brasileira*, **45** (3), p. 279-284, 1999.
- [10] Sartorelli, D.S.; Franco, L.J. Tendências do diabetes melito no Brasil: o papel da transição nutricional. *Cadernos de Saúde Pública*, **19** (1), p. 29-36, 2003.
- [11] <http://www.saudevidaonline.com.br/artigo47.htm>: Acesso em 05/03/2006.
- [12] Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, **6**, p. 24-27, 1969.
- [13] [http://www.goldanalisa.com.br/produtos/GLICOSE\\_PP.pdf](http://www.goldanalisa.com.br/produtos/GLICOSE_PP.pdf): Acesso em 05/03/2006.
- [14] Newman, J.D.; Turner, A.P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, p. 2435-2453, 2005.
- [15] [http://www.accu\\_chek.com.br/br/rewrite/content/pt\\_BR/1:10/article/ACCM\\_general\\_article\\_1486.htm](http://www.accu_chek.com.br/br/rewrite/content/pt_BR/1:10/article/ACCM_general_article_1486.htm): Acesso em 05/03/2006.
- [16] <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi/portal.cgi?Init=Yes&SID=H29An7j2PcaHoH4cM4h> <http://www.sciencedirect.com>: Acesso em 05/03/2006.

## Capítulo 2 – Biossensores clínicos: conceitos gerais e evolução

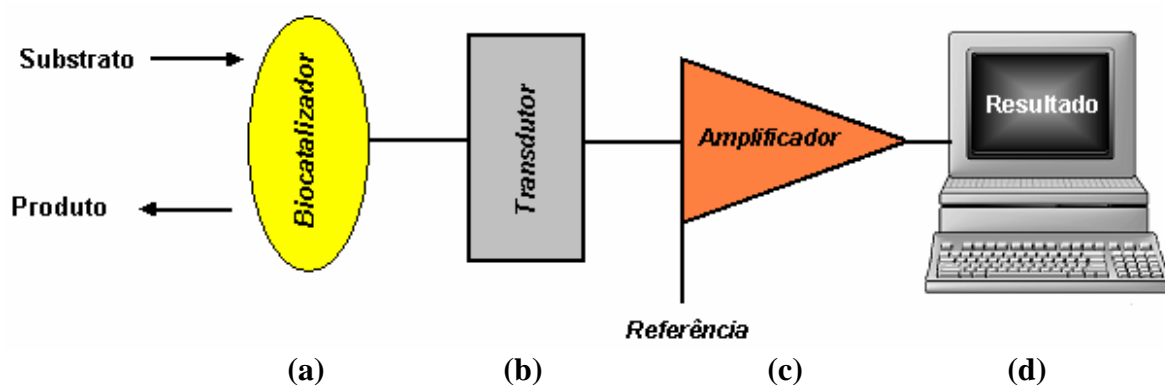
---

### 2.1 – Aspectos gerais

Biossensores são dispositivos híbridos do tipo chip material biológico capazes de converter uma reação biológica/bioquímica em um sinal apropriado. Este sinal pode ser potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, piezelétrico ou entalpimétrico.<sup>1,2</sup> O sinal criado é proporcional à concentração do analito, também conhecido como substrato. Com isso, ocorre a união da especificidade dos sistemas biológicos com a engenharia, oferecendo uma ferramenta versátil para ser utilizada em análises clínicas.

Os biossensores contêm como espécies imobilizadas biocatalisadores necessários para detecção de determinados analitos. Os materiais biológicos imobilizados nas superfícies dos transdutores podem ser de vários tipos, tais como, tecidos celulares, microorganismos, organelas, membranas, enzimas, anticorpos, dentre outros.<sup>3</sup>

Na Figura 2.1 são mostrados os componentes básicos de um biossensor. Em (a), tem-se o biocatalisador. Neste local ocorre a reação bioquímica responsável pela geração do sinal. O sinal é então convertido em um sinal elétrico no transdutor (b), amplificado em (c) e então processado (d).



**Figura 2.1** - Componentes básicos de um biossensor: biocatalizador (a), transdutor (b), amplificador (c), processador (d).

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lions em 1962, o qual ficou conhecido como "eletrodo enzimático".<sup>4</sup> Desde então, diversos tipos de biossensores foram desenvolvidos para os mais diversos tipos de análises clínicas. O monitoramento de hemometabólicos no sangue humano (como glicose 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>5-7</sup>

Biossensores contendo enzimas como materiais biocatalíticos são denominados biossensores ou eletrodos enzimáticos. Estes são usados em uma série de determinações analíticas (Tabela 1), das quais, a detecção da taxa de glicose (analito de informação vital para o controle do diabetes) no sangue é mais comum do ponto de vista comercial.<sup>8</sup>

**Tabela 1** - Alguns eletrodos enzimáticos utilizados em determinações analíticas <sup>9</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>Açúcar</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 desidrogenase</i>        | <i>O<sub>2</sub></i>                                |

Desde o eletrodo de Clark, um notável progresso foi alcançado em quatro décadas quanto ao desenvolvimento de biossensores para análise clínicas, em especial, destaca-se o desenvolvimento e/ou aprimoramento dos biossensores amperométricos, potenciométricos, ópticos, piezoelétricos e calorimétricos. O princípio básico de funcionamento destes dispositivos é relatado a seguir.

### 2.1.1 – Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos baseiam-se em reações de transferência de elétrons (oxi-redução) entre o material biocatalítico e o analito com um eletrodo de referência polarizado a uma tensão pré-determinada.<sup>10</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>11</sup>

Os biossensores amperométricos são classificados de acordo com o processo envolvido na transferência de cargas em três grupos: biossensores amperométricos de primeira, segunda e terceira gerações, como pode ser ilustrado na Figura 2.2.

Os biossensores amperométricos de primeira geração trabalham a altos potenciais e baseiam-se na diminuição da concentração de oxigênio, onde dois eletrodos são separados da amostra por uma membrana permeável a gás (Figura 2.3). Neste caso, o oxigênio difundido através da membrana é reduzido em um eletrodo catodicamente polarizado na presença de um eletrodo de referência.<sup>11</sup>

Os biossensores amperométricos, se baseiam também na detecção da concentração de peróxido de hidrogênio, quando este é oxidado em um eletrodo polarizado anodicamente, gerando assim o sinal elétrico.

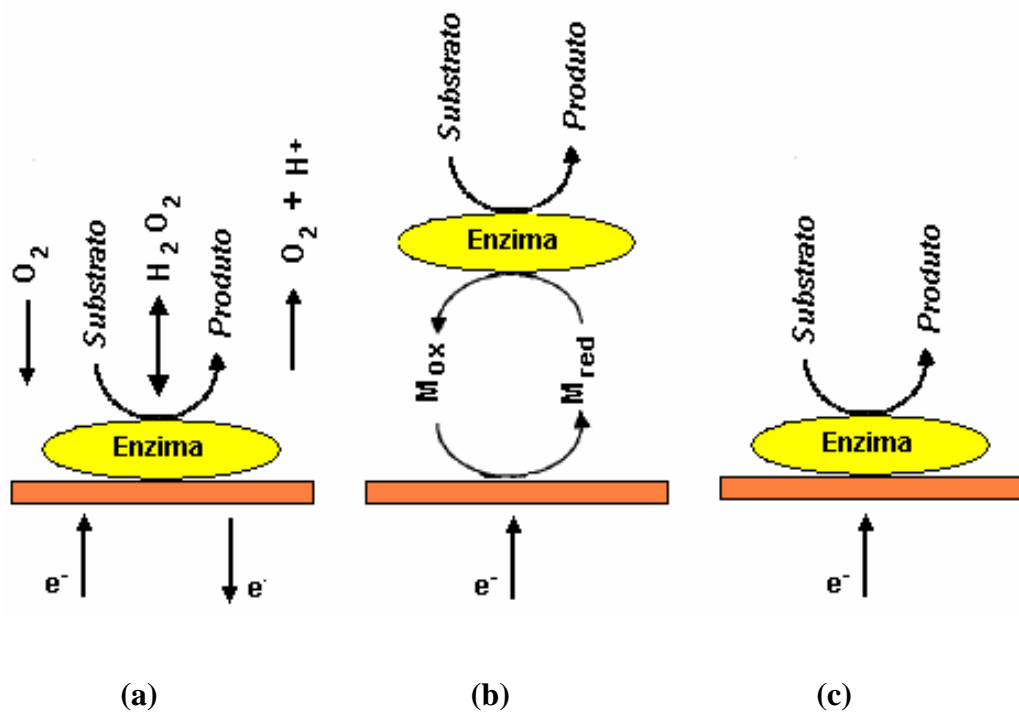
O princípio de funcionamento de um biossensor de segunda geração se baseia no uso de um mediador para transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, a fim de se diminuir o potencial aplicado no eletrodo de trabalho.<sup>13</sup> Esses mediadores eletrônicos podem ser materiais orgânicos, inorgânicos ou complexos de metais de transição e ainda polímeros condutores. Os mediadores de elétrons mais utilizados ultimamente em biossensores são cobalto-ftalocianina e derivados de ferroceno pelo fato destes compostos possuírem baixos potenciais de oxi-redução.<sup>14-16</sup>

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>17</sup>

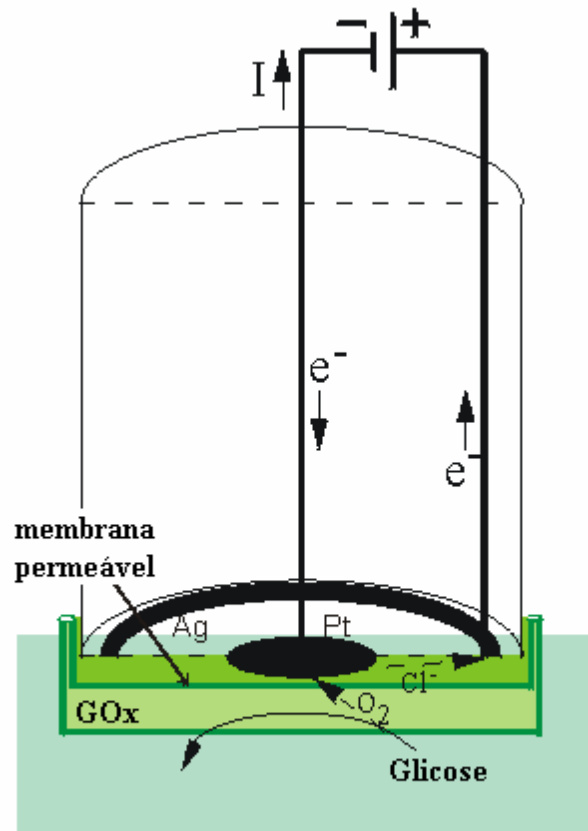
Os biossensores amperométricos são aplicados na indústria, na medicina e no monitoramento do meio ambiente. Eles dão uma análise mais precisa do analito a ser medido, pois a relação entre a quantidade de substrato e o sinal criado varia linearmente de acordo com a equação:<sup>18</sup>

$$I = nFAv_a, \tag{2.1}$$

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



**Figura 2.2** - Representação esquemática para biossensores amperométricos segundo o processo de transferência de cargas. 1º geração (a), 2º geração (b), 3º geração (c).<sup>12</sup>



**Figura 2.3** - Representação esquemática de um biossensor amperométrico de 1<sup>o</sup> geração: Um potencial é aplicado entre o catodo de platina e o anodo de prata, gerando uma corrente ( $I$ ) que escoza entre os eletrodos por meio de uma solução saturada do KCl.

### 2.1.2 – Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos são dispositivos do tipo íons-seletivos e são constituídos por uma membrana contendo biocatalisadores imobilizados onde ocorre a reação catalisada enzimaticamente. Neste tipo de biossensor, a geração de prótons  $H^+$  altera o pH do meio e uma diferença de potencial é criada entre um eletrodo de referência e o eletrodo íon-seletivo.<sup>19</sup>

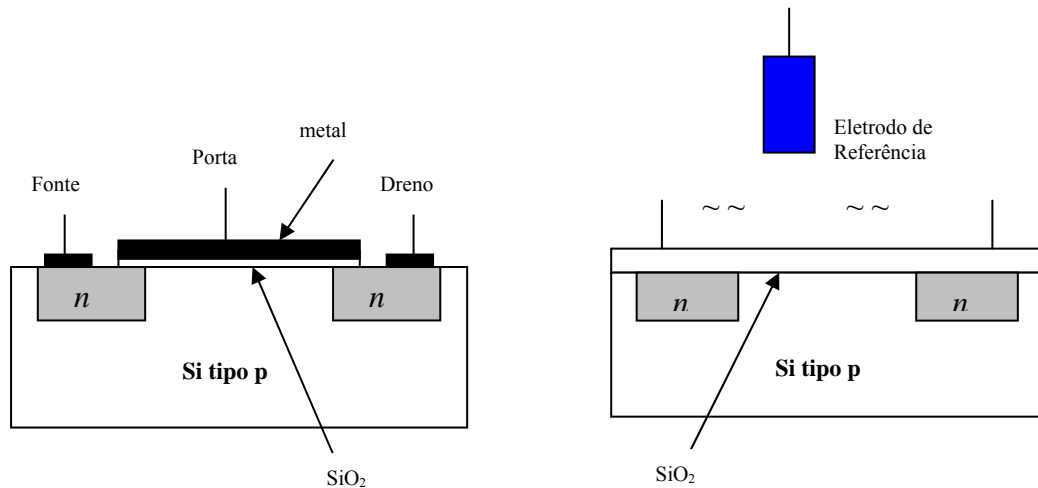


A resposta de um biossensor potenciométrico é dada pela equação de Nernst:<sup>20</sup>

$$E = E_0 + \frac{RT}{zF} \ln([i]) \quad (2.2)$$

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 presentes na solução.

Um desenvolvimento recente de biossensores potenciométricos é a produção de transistores de efeito de campo íon-seletivos (ISFETs).<sup>21</sup> Um ISFET, é um MOSFET (transistor de efeito de campo metal-óxido semicondutor) modificado. A diferença entre os dois dispositivos baseia-se no fato de 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 de uma solução eletrolítica. Uma alteração do potencial da solução controla o fluxo de corrente entre os eletrodos fonte e dreno do ISFET. A Figura 2.4 ilustra a estrutura física de um ISFET comparativamente a um MOSFET.



**Figura 2.4** - Estrutura física de um MOSFET (a) em comparação com um ISFET (b).

A imobilização de enzimas na porta do ISFET/MOSFET, permite a utilização destes dispositivos como biossensores. São os chamados ENFET's (Transistores de Efeito de Campo Enzimáticos). Neste caso é a reação catalisada pela enzima que altera o potencial do meio, sendo esta alteração proporcional à concentração do analito.<sup>22</sup>

A vantagem desses dispositivos é a possibilidade do uso da microeletrônica na sua produção, o que possibilita 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 no desempenho do biossensor.<sup>21</sup>

### 2.1.3 – Biossensores ópticos

Biossensores ópticos baseiam-se na determinação das mudanças de absorção de radiação eletromagnética na região do visível/infravermelho entre os reagentes e produtos da reação, ou na medida da emissão de luz por um processo luminescente.<sup>23</sup>

A forma mais comum envolve o uso de tiras colorimétricas, as quais, contêm enzimas oxi-redutoras e uma substância capaz de mudar suas propriedades ópticas em resposta a uma mudança nas condições do meio (cromógeno). O produto gerado na reação entre a enzima e o analito (na maioria das vezes  $H_2O_2$ ), oxida o cromógeno. A absorvância do composto formado é proporcional à concentração do analito a ser determinada.

Atualmente o uso mais comum de biossensores ópticos é no controle do diabetes pela determinação do nível de glicose no sangue usando-se as enzimas glicose oxidase (GOx) e peroxidase (HRP), juntamente com o composto que não absorve luz na região do visível (400-700 nm).<sup>24</sup> O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) resultante da oxidação da glicose pela GOx, na presença da HRP, 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 um sistema colorido previamente elaborado.

Um modelo elegante de biossensores ópticos são biossensores baseados na técnica de ressonância de plásmons de superfície (SRP). Plásmons de superfície (SP) são ondas eletromagnéticas com densidades de cargas eletromagnéticas longitudinais ou transversais que se propagam ao longo de uma interface metal/dielétrico.<sup>25</sup> Na SPR a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas do índice de refração, quantidade de luz absorvida, propriedades fluorescentes das moléculas analisadas ou um meio de transdução químico-óptico. A técnica de ressonância de plásmons de superfície (SRP) baseia-se nas propriedades ópticas, podendo ser empregada para estudos de fenômenos de superfície, monitorando a medida da mudança do índice de refração, devido, por exemplo, a ligação de uma camada orgânica à superfície do metal. O sucesso da técnica da ressonância de plásmon de

superfície para aplicações biotecnológicas deve-se ao fato da SPR permitir o cálculo das cinéticas de interações biomoleculares em tempo real com um alto grau de sensibilidade.<sup>26</sup>

#### 2.1.4 – Biossensores piezoelétricos

Piezoelasticidade é a propriedade dos cristais de gerar uma tensão em resposta a uma vibração externa. Este efeito é reversível e, dessa forma, todos os cristais piezoelétricos 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 uma frequência de vibração característica. Essa frequência característica muda quando o cristal absorve ou desorve moléculas em sua superfície. A relação entre o transporte de massa na superfície do cristal piezoelétrico e o sinal deste transdutor é dada por:<sup>27</sup>

$$\Delta f = \frac{K_p \cdot f^2 \Delta m}{A}, \quad (2.3)$$

sendo,  $\Delta f$  é a variação da frequência característica,  $\Delta m$  é a variação da massa do material adsorvido,  $K_p$  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 através de impedância. Portanto, esses tipos de biossensores contêm enzimas imobilizadas em cristais piezoelétricos que funcionam como transdutores do sinal elétrico produzido na interface.<sup>27</sup>

Um bom exemplo de um biossensor piezoelétrico é um transdutor para a detecção de formaldeído. Este biossensor é basicamente formado por desidrogenase

imobilizada em um cristal de quartzo. Esse sistema demonstrou boa sensibilidade ao formaldeído gasoso.<sup>28</sup>

O principal inconveniente dos biossensores piezoelétricos 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>

### 2.1.5 – Biossensores calorimétricos

Muitas reações que são catalisadas 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 biocatalisador (enzima) imobilizado.<sup>31</sup> Tal medida é efetuada através de termistores, um tipo de resistor usado para medir mudanças de temperatura baseado em variações de sua resistência com a mesma. Neste caso, a variação da resistência elétrica com a temperatura, obedece à relação:<sup>31</sup>

$$\frac{R_1}{R_2} = e^{B\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)} \quad (2.4)$$

sendo,  $R_1$  e  $R_2$  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 ampla aplicabilidade em processos biotecnológicos ou de interesse clínico, aliado à possibilidade de uso em soluções concentradas. Porém existe a dificuldade de se manter a temperatura do biocatalisador constante, fato que pode levar à desnaturação da enzima, afetando assim o funcionamento do biossensor.

## 2.2 – Considerações finais

Os biossensores são dispositivos compactos que são capazes de fornecer uma resposta quantitativa ou semiquantitativa para o monitoramento de diversos analitos. Tais dispositivos são classificados de acordo com o sinal que é gerado na interface como resultado da reação entre o analito e o material biológico (na maioria das vezes enzimas) imobilizado em sua superfície. A determinação de hemometóbolos no sangue humano tem sido a principal área de interesse na pesquisa em biossensores, dos quais, a glicose é destaque, tendo em vista que a medida de glicemia sanguínea controla o diabetes.

A imobilização de biocatalisadores em sistemas híbridos orgânicos-inorgânicos pode contribuir significativamente para a performance de um biossensor. Os aspectos fundamentais sobre a ação das enzimas bem como os métodos de imobilização destes biocatalisadores são descritos no próximo capítulo.

## 2.3 – Referências

- [1] <http://www.iupac.org/reports/1999/7112thevenot/>: Acesso em 22/03/2006.
- [2] Karube, I.; Omura, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, p. 177-181, 2000.
- [3] Wilson, G.S.; Gifford, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*, **20** (12), p. 2388-2403, 2005.
- [4] Clark, L.C.Jr.; Lion, C. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **29**, p. 102-123, 1968.
- [5] Richardson, N.J.; Gardner, S.; Rawson, D.M. A chemically mediated amperometric biosensor of monitoring eubacterial respiration. *Journal of applied bacteriology*, **70** (5), p. 422-426, 1991.

- [6] Whelan, R.J; Zare, R.N. Single-cell immunosensors for protein detection. *Biosensors and Bioelectronics*, **9**, (4), p.331-336, 2003.
- [7] 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*, **21**, (7), p. 1116-1124, 2006.
- [8] Newman, J.D.; Turner, A. P.F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, **20** (12), p. 2435-2453, 2005.
- [9] Oliveira Neto, G.; Yamanaka, H. Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores. *Química nova*, **11** (4), p. 432-435, 1988.
- [10] Wang, J. Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **19**, p. 43-59, 1999.
- [11] Updike, S.J.; Hicks, G.P. The enzyme electrode. *Nature*, **214**, p. 986-988, 1967.
- [12] Rosatto, S.S. *Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada*. Campinas, Universidade de Campinas—Instituto de Química, 2000. (Tese de Doutorado).
- [13] Scheller et. al. Second Generation biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **6** (3), p. 245-253, 1991.
- [14] Adhikari, B.; Majumdar, S. Polymers in sensor applications. *Progress in Polymer Science*, **29** (7), p. 699-766, 2004.
- [15] Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—new trends. *Applied Clay Science*, **27** (3-4), p. 159-177, 2004.
- [16] Iwuoha et al. Electrochemistry and application of a novel monosubstituted squarate electron-transfer mediator in a glucose oxidase-doped poly(phenol) sensor. *Pure and Applied Chemistry*, **76** (4), p. 789-799, 2004.

- [17] 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*, **19**, (1), p.1479-1486, 2004.
- [18] PETER, T. K.; Introduction to Amperometric Biosensor Configurations. Disponível em: <http://www.currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3f.pdf>: Acesso em 22/03/2006.
- [19] Kuralay, F.; Özyörük, H.; Yildiz, A. Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly(vinylferrocenium) film. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **109** (2), p. 194-199, 2005.
- [20] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/potenciometric.html>: Acesso em 22/03/2006.
- [21] Bergveld, P. Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **88** (1), p. 1-20, 2003.
- [22] Luo et. al. Glucose biosensor based on ENFET doped with SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **97**, (2-3), p. 249-255, 2004.
- [23] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/optical.html>: Acesso em 22/03/2006.
- [24] Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, **6**, p. 24-27, 1969.
- [25] Salamon, H.Z.; Macleod, A.; Tollin, G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1331** (2), p. 117-129, 1997.



- [26] Salamon, H.Z.; Macleod, A.; Tollin, G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1331** (2), p. 131-152, 1997.
- [27] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/piezo.html>. Acesso em 22/03/2006.
- [28] Kumar, A. Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. Disponível em: <http://www.tms.org/pubs/journals/JOM/0010/Kumar/Kumar-0010.html>. Acesso em 22/03/2006.
- [29] Guilbault, G.G. Biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, **2** (1) 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*, **3** (4) p. 295-304, 1991.
- [31] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/calorimetric.html>. Acesso 22/03/2006.

## Capítulo 3 – As enzimas: a essência de um biossensor

---

### 3.1 – Noções gerais

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações químicas. As enzimas são fundamentais para qualquer processo bioquímico a nível fisiológico ou biotecnológico, apresentando uma extraordinária eficiência catalítica e um alto grau de especificidade por seus substratos quando comparadas aos catalisadores de origem sintética. Tais biocatalisadores aceleram as reações químicas de maneira formidável e atuam em meio aquoso e em condições relativamente suaves de pH e temperatura.<sup>1</sup> Neste sentido, as enzimas ocupam uma posição de destaque a nível molecular na área da catálise.

A partir do isolamento e cristalização da enzima urease (isolada do feijão), feito por J. Summer em 1926, a pesquisa com enzimas que catalisam as reações do metabolismo humano se intensificou. Tal fato levou à purificação de milhares de enzimas, à elucidação da estrutura molecular de tais moléculas e a compreensão de como esses biocatalisadores funcionam.<sup>2</sup>

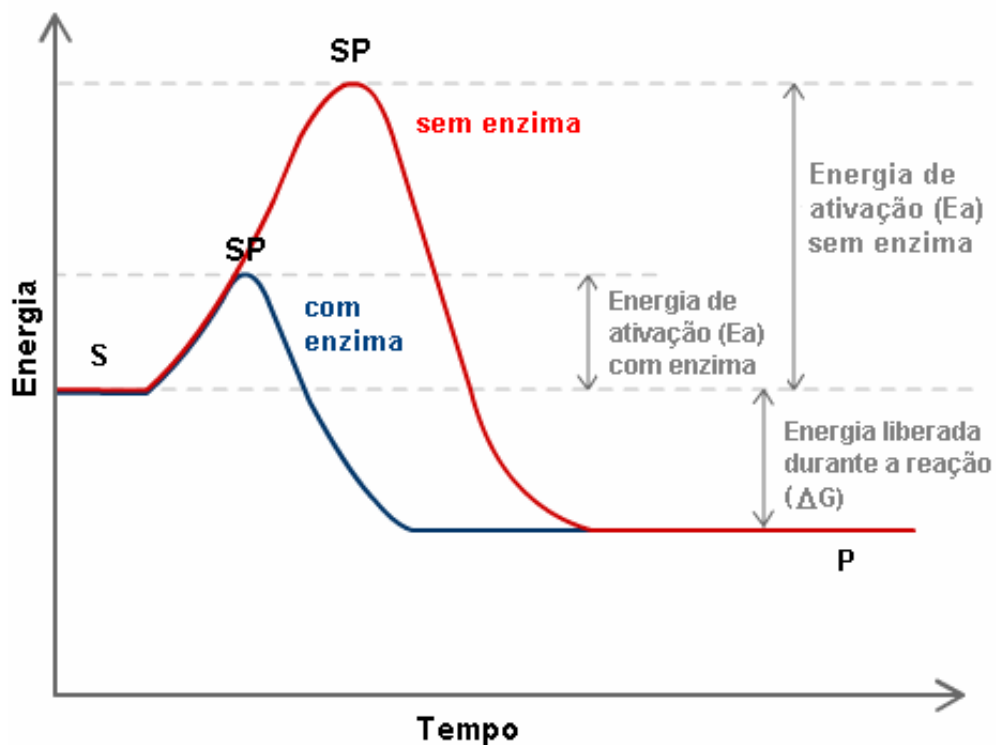
A atividade catalítica de uma enzima, a princípio, se resume ao seu sítio catalítico bioativo, que corresponde a uma região da enzima formada por resíduos de aminoácidos cujos grupos substituintes podem se ligar a um substrato específico, catalisando a transformação do substrato em um ou mais produtos.

Devido a várias propriedades como a possibilidade de isolamento, purificação, poder catalítico e especificidade, as enzimas se tornaram atraentes como catalisadores para biotransformações e, sua aplicação na indústria foi e ainda é objeto de muitas investigações. Com isso, atualmente, existem diversas técnicas de purificação de enzimas (diálise, métodos cromatográficos, eletroforese), os quais,

permitem que uma enzima de alta pureza possa ser obtida e usada em escala industrial ou analítica, proporcionando a reutilização da mesma.<sup>3-5</sup> Obviamente, como todo catalisador, uma enzima possui um mecanismo de ação altamente específico.

### 3.2 – Mecanismos da ação enzimática

Como todo catalisador a função de uma enzima é aumentar a velocidade de uma reação, diminuindo a energia de ativação ( $E_a$ ) para que a reação química se torne termodinamicamente favorável e, sua presença na reação, não afeta o equilíbrio químico da mesma, como observado na Figura 3.1.<sup>1,2</sup>



**Figura 3.1** - Representação da energia de ativação  $E_a$  de uma reação não enzimática e uma reação enzimática:  $\Delta G$  – energia livre de Gibbs, S-substrato e P-produto.

Todos os processos que ocorrem no universo estão sujeitos às leis básicas da termodinâmica. As reações que se verificam nas células vivas não são exceções. A primeira lei da termodinâmica afirma que a energia não pode ser criada nem destruída. Em qualquer processo, uma forma de energia pode ser convertida em outra, porém a energia total do sistema mais a das vizinhanças, permanece constante. Portanto, a primeira lei da termodinâmica é simplesmente uma lei de conservação de energia. Nada é mencionado sobre a utilidade relativa das diferentes formas de energia ou sobre a direção de um processo ou reação.<sup>6</sup>

A segunda lei da termodinâmica afirma que todos os processos que ocorrem naturalmente envolvem uma direção que leva a um nível mínimo de energia potencial, isto é, em direção a um estado de equilíbrio. Essas reações espontâneas liberam energia à medida que tendem a um equilíbrio e teoricamente a energia liberada pode ser aproveitada de forma útil produzindo trabalho.<sup>6</sup>

O fato de uma reação apresentar  $\Delta G < 0$  não significa que uma reação se processa a uma grande velocidade.  $\Delta G < 0$  indica simplesmente o sentido da reação, se é que ela ocorre. A velocidade de qualquer reação química homogênea depende da frequência das colisões entre as moléculas que reagem entre si. A frequência de colisão, por sua vez, é influenciada pela concentração de moléculas reagentes e também pela concentração de sua energia cinética que é dependente da temperatura. A frequência de colisão é igual à velocidade da reação pois somente uma pequena parcela das colisões ocorre com energia suficiente para provocar a reação. A energia mínima para que uma reação ocorra é chamada de energia de ativação,  $E_a$ .

A relação entre  $E_a$  e a temperatura foi formulada empiricamente por Arrhenius em 1888. A relação é geralmente descrita como a equação de Arrhenius:<sup>6</sup>

$$k = Ae^{-E_a/RT} \quad (3.1)$$

ou de forma linear:

$$\log k = \frac{E_a}{2,3R} \frac{1}{T} + \log A. \quad (3.2)$$

A forma integrada da equação de Arrhenius é:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2,3R} \left( \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1} \right), \quad (3.3)$$

sendo  $k_2$  e  $k_1$  as constantes de velocidade específicas da reação às temperaturas  $T_2$  e  $T_1$ , respectivamente.

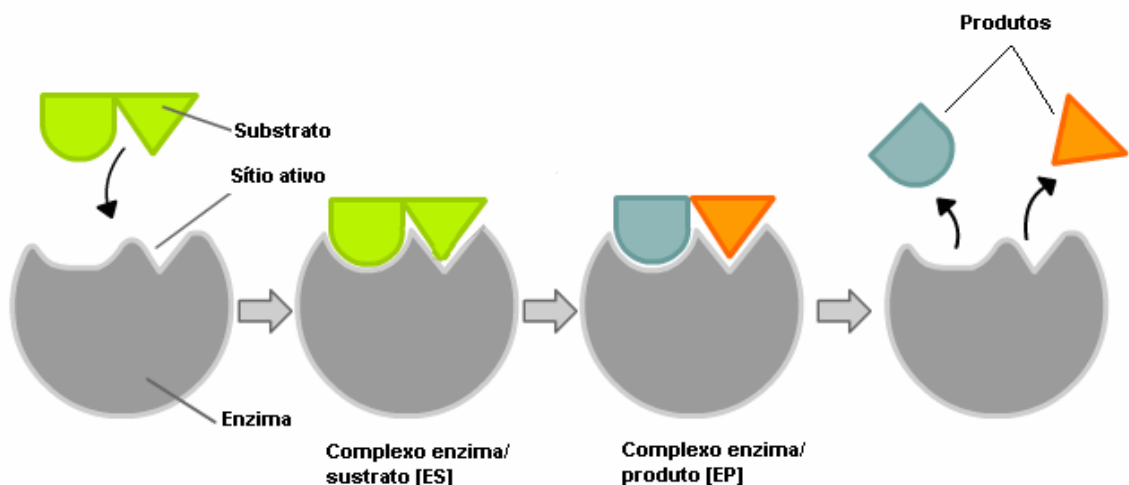
No intuito de explicar a necessidade de energia mínima para que uma reação possa se processar, Fyring em 1935, propôs que uma molécula reagente deveria ultrapassar uma barreira energética e passar por um estado de transição antes de se transformar em produto da reação (Figura 3.1). Moléculas reagentes que atingem somente uma fração da energia de ativação necessária simplesmente retornam ao estado inicial. O estado de transição é visto como uma fase intermediária, onde as ligações e orientações são distorcidas. Uma vez que os reagentes ultrapassem a barreira energética atingindo o estado de transição, eles prosseguem para formar os produtos da reação com uma velocidade que independe da temperatura e da natureza dos reagentes, ou seja, eles passam para o outro lado da barreira energética seguinte.

Na presença de uma enzima apropriada, a temperatura ambiente fornece uma quantidade suficiente de moléculas reagentes com a necessária energia de ativação. Uma reação catalisada por uma enzima pode se processar a 25 °C,  $10^6$  a  $10^8$  vezes mais rapidamente que uma mesma reação não catalisada enzimaticamente.

As enzimas não afetam o  $\Delta G$  ou  $k_{eq}$  de uma reação. Elas simplesmente aceleram a velocidade com a qual a reação alcança o equilíbrio.

Embora a enzima participe da seqüência da reação, ela não sofre nenhuma transformação. Sendo assim, apenas poucas moléculas de enzimas são capazes de catalisar a conversão de milhares de moléculas de substrato S a produto P.

Emil Fischer, em 1894, estabeleceu que as interações entre uma enzima e seu substrato seriam complementares, propondo o modelo “chave-fechadura” para explicar a ação enzimática.<sup>8</sup> De acordo com este modelo, o sítio ativo da enzima e o substrato possuem formas geométricas semelhantes. Dessa forma, o substrato (chave) se encaixa perfeitamente ao sítio ativo da enzima como se este fosse rígido analogamente a uma fechadura (Figura 3.2). Estados intermediários (ES e EP) são formados antes do produto.



**Figura 3.2** - Modelo chave-fechadura para ação enzimática.

Apesar do modelo de Fischer explicar perfeitamente a especificidade de uma enzima por seu substrato, nenhuma menção é feita quanto à estabilização do estado de transição que ocorrem. Um modelo mais acurado para explicar a teoria da especificidade de uma enzima por seu substrato foi proposto Koshland e

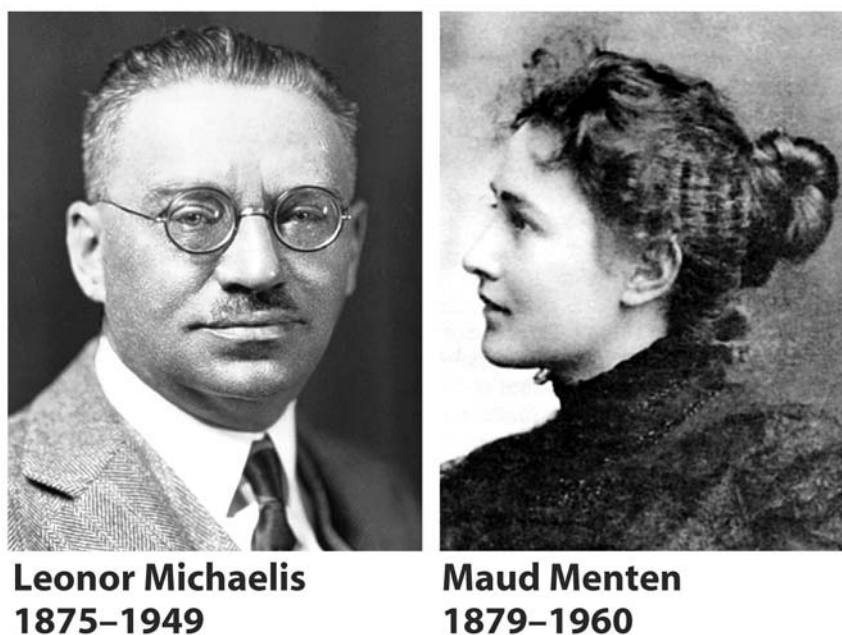
colaboradores em 1958.<sup>8</sup> Esta teoria sugere que, através da complexação, o substrato induz uma mudança conformacional na subunidade da enzima com a qual interage (sítio ativo). Essa mudança pode ser transmitida às subunidades vizinhas, induzindo na enzima a conformação responsável pelo processo catalítico, o que explica melhor tanto a especificidade quanto a formação de estados intermediários (Figura 3.3).



**Figura 3.3** - Mudança conformacional do sítio ativo de uma enzima adaptando-se ao seu substrato.

São vários os fatores que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima. O fator principal é a concentração do substrato [S]. Estudar os efeitos da concentração de substrato se torna complicado pelo fato dessa concentração variar à medida que a reação ocorre. Prefere-se então, uma abordagem acerca da velocidade inicial da reação  $V_0$ , tendo em vista que na maioria dos casos, a concentração do substrato é muito maior que a concentração da enzima [E]. Neste caso, o tempo da reação será muito curto e as variações em [S] poderão ser desprezadas.

Uma abordagem mais geral e quantitativa a respeito da ação enzimática, foi proposta por Leonor Michaelis e Maud Menten em 1913 (Figura 3.4).



**Figura 3.4** - Fotografias de Leonor Michaelis e Maud Menten.

Leonor Michaelis era bioquímico e médico alemão que ficou famoso pelo seu trabalho com Maud Menten sobre a cinética enzimática. Nascido em Berlim, estudou medicina em Freiburg onde se graduou em 1897. Mudou-se novamente para Berlim onde obteve seu doutorado no mesmo ano. Em 1906 iniciou sua carreira como diretor do laboratório de bacteriologia no hospital Berlins Charité, tornando-se professor na Universidade de Berlim em 1908. Em 1922 transferiu-se para a escola médica da Universidade de Nagoya (Japão) como professor de bioquímica e em 1926 para a Universidade de Johns Hopkins em Baltimore, em Maryland como conferencista residente em pesquisa médica. Em 1929 Leonor Michaelis, transferiu-se para o instituto Rockefeller em Nova York, se aposentando em 1941.

Maud Leonora Menten foi uma cientista e médica canadense que fez significativas contribuições a respeito da cinética enzimática. Maud Menten nasceu em Port Lambton, Ontário (Canadá) e estudou medicina na universidade de Toronto.



Estava entre as primeiras mulheres canadenses a obter um título de doutorado e para desenvolver sua tese teve que se deslocar para Universidade de Chicago, uma vez que, naquela época, as mulheres eram proibidas de trabalharem em pesquisa no Canadá. Em 1912 transferiu-se para Berlim onde trabalhou com Leonor Michaelis, obtendo seu Ph.D. em 1916. Menten trabalhou como patologista na universidade de Pittsburgh (1923-1950) e como pesquisadora no British Columbia Medical Research Institute.

Michaelis e Menten postularam que num primeiro passo, a enzima (E) se combina com o substrato (S) em um processo rápido e reversível, formando o complexo enzima-substrato (ES). Numa segunda etapa, mais lenta, o complexo enzima-substrato se quebra liberando o produto reacional e a enzima livre. A seqüência dessas reações é escrita como: <sup>7,10</sup>



sendo  $k_1$  a constante de velocidade de formação do complexo ES,  $k_2$  a constante de velocidade da dissociação do complexo,  $k_3$  a constante de velocidade da dissociação do complexo formando o produto (P) e  $v$  a velocidade de formação do produto.

A velocidade de consumo do substrato, ou formação do produto, diminui com o tempo devido à diminuição da concentração de substrato no decorrer da reação enzimática.

A partir da equação (3.4), a velocidade de reação para o consumo de substrato e formação de produtos é dada por:

$$v = \frac{d[S]}{dt} = k_2[ES] - k_1[S][E] \quad (3.5)$$

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_3[ES]. \quad (3.6)$$

Logo, a velocidade de consumo do complexo ES é descrita por:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES]. \quad (3.7)$$

Considerando um estado estacionário, no qual a taxa de formação do complexo ES é igual à taxa de dissociação, onde a concentração [ES] permanece constante, tem-se:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \Rightarrow k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \quad (3.8)$$

A concentração total de enzima,  $[E]_t$ , é a soma de suas formas livre e associada formando o complexo ES:

$$[E]_t = [E] + [ES].$$

Logo, pelo princípio da conservação de massa:

$$[E] = [E]_t - [ES] \quad (3.9)$$

Substituindo a equação (3.9) na equação (3.8), obtém-se:

$$k_1[E]_t[S] = [ES](k_1[S] + k_2 + k_3) \Rightarrow [ES] = \frac{k_1[E]_t[S]}{k_1[S] + k_2 + k_3}.$$

(3.10)

E substituindo a equação (3.10) na equação (3.6):

$$v = k_3 \cdot \frac{k_1[E]_t[S]}{k_1[S] + k_2 + k_3} \quad (3.11)$$

O valor máximo da velocidade será alcançado quando toda a enzima se encontrar na forma do complexo ES. Assim, a velocidade máxima da reação,  $V_{\text{máx}}$ , é dada pela reação entre a concentração total da enzima e a constante de decomposição do complexo, matematicamente expresso por:

$$v_{\text{máx}} = k_3 \cdot [E]_t \quad (3.12)$$

Dessa forma, substituindo a equação (3.12) na equação (3.11), tem-se a equação de Michaelis e Menten:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m} \quad \text{com } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.13)$$

sendo  $K_m$  a constante de Michaelis-Menten.

Uma importante relação da equação (3.13) é obtida quando  $V$  é a metade de  $V_{\max}$ :

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3.14)$$

Dividindo por  $V_{\max}$  :

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.15)$$

e isolando  $K_m$ , tem-se:

$$K_m = [S] \quad \text{quando } V = \frac{1}{2} V_{\max} \quad (3.16)$$

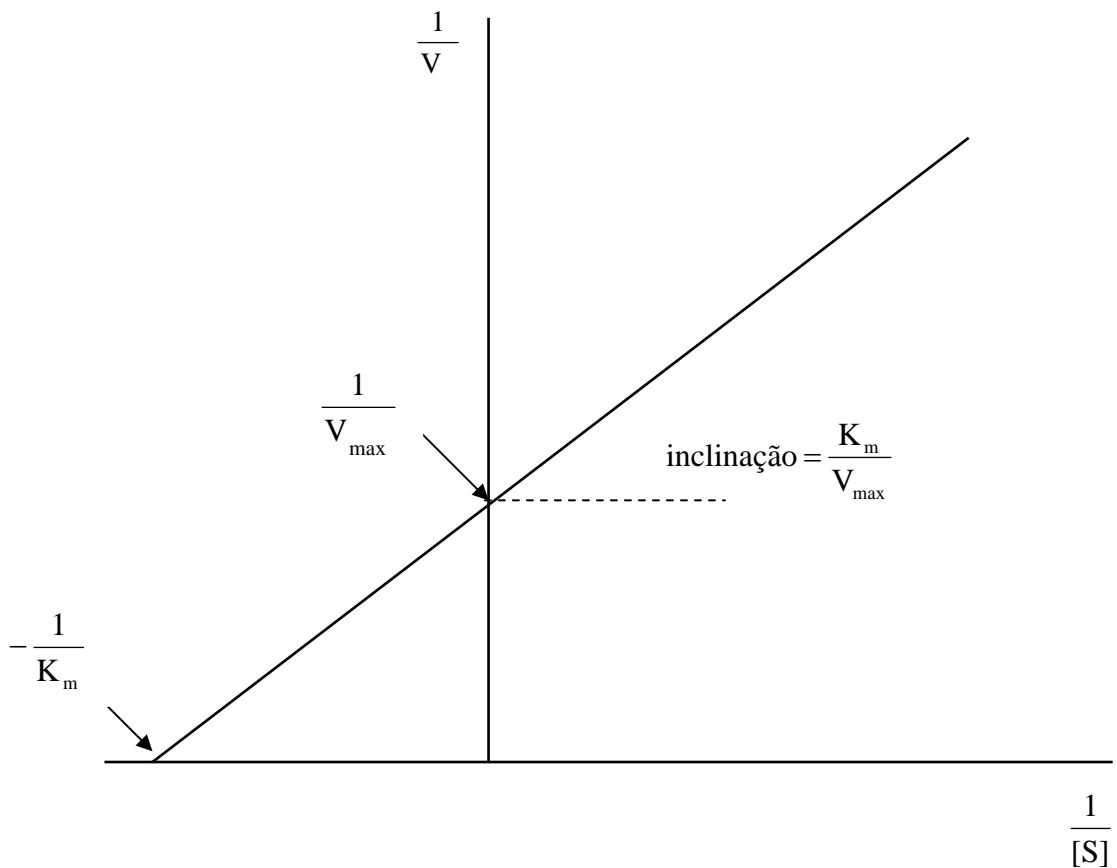
Isto mostra que  $K_m$  equivale à concentração do substrato  $[S]$  quando  $V$  é a metade de  $V_{\max}$ , podendo ser a constante de Michaelis-Menten interpretada como o inverso da afinidade da enzima pelo substrato: quanto menor for seu valor, maior será a afinidade da enzima.<sup>11</sup>

Como a determinação dos valores de  $K_m$  e  $V_{\max}$  são obtidos experimentalmente, a equação de Michaelis-Menten (3.13) pode ser linearizada tomando-se seu recíproco:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3.17)$$

O gráfico de  $1/V_{\max}$  em função de  $1/K_m$  será então uma reta com seu coeficiente angular correspondendo ao valor de  $K_m/V_{\max}$ , o coeficiente linear igual a  $1/V_{\max}$  e o intercepto da reta no eixo das abscissas corresponde ao valor de  $-1/K_m$ , como é

ilustrado na Figura 3.5. O gráfico dos recíprocos de  $V_{\max}$  e  $K_m$  conhecido como representação de Lineweaver-Burk permite uma determinação mais precisa de  $V_{\max}$  relativamente à equação 3.13.



**Figura 3.5** - Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.

Os parâmetros  $K_m$  e  $V_{\max}$  normalmente são utilizados na análise da atividade da enzima. Este procedimento é particularmente importante quando o biocatalisador é imobilizado em um suporte insolúvel. Neste caso, uma alteração na razão  $K_m/V_{\max}$  pode indicar possíveis alterações na atividade da enzima resultante do processo de imobilização.

### 3.3 – As enzimas glicose oxidase (GOx) e Peroxidase (HRP)

Os testes de glicemia sanguínea necessitam de catalisadores envolvidos na reação de oxidação da molécula de glicose, visto que, o monitoramento do diabetes, se dá pela medida da taxa desse açúcar no sangue. Neste caso, as enzimas glicose oxidase e peroxidase são os biocatalisadores mais utilizados.

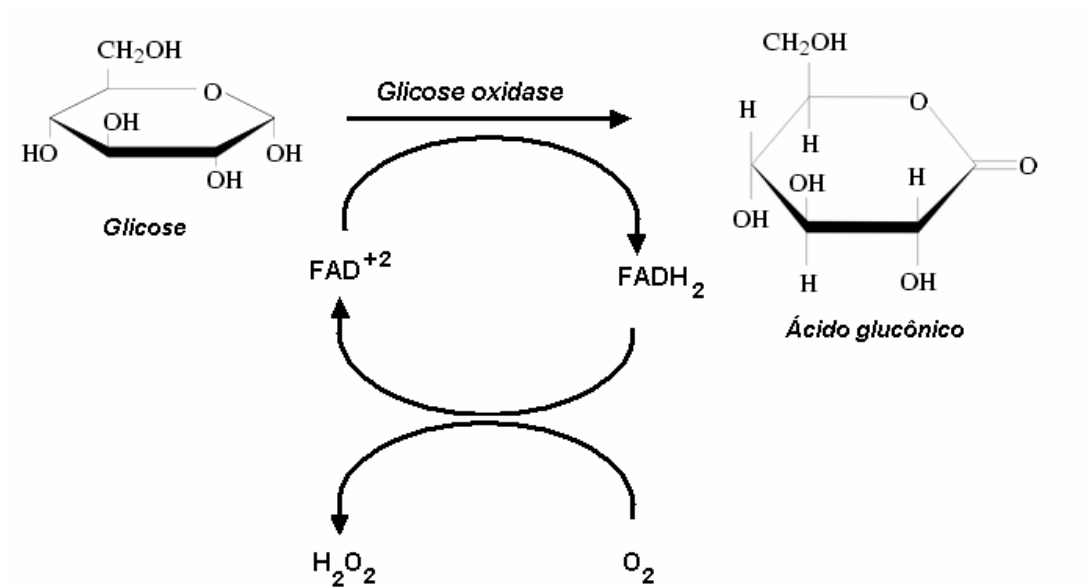
A glicose oxidase (GOx, EC 1.1.3.4) é uma enzima da classe das oxi-redutases que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- $\delta$ -lactone, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio.<sup>12</sup>

A atividade da glicose oxidase, 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>13,14</sup>

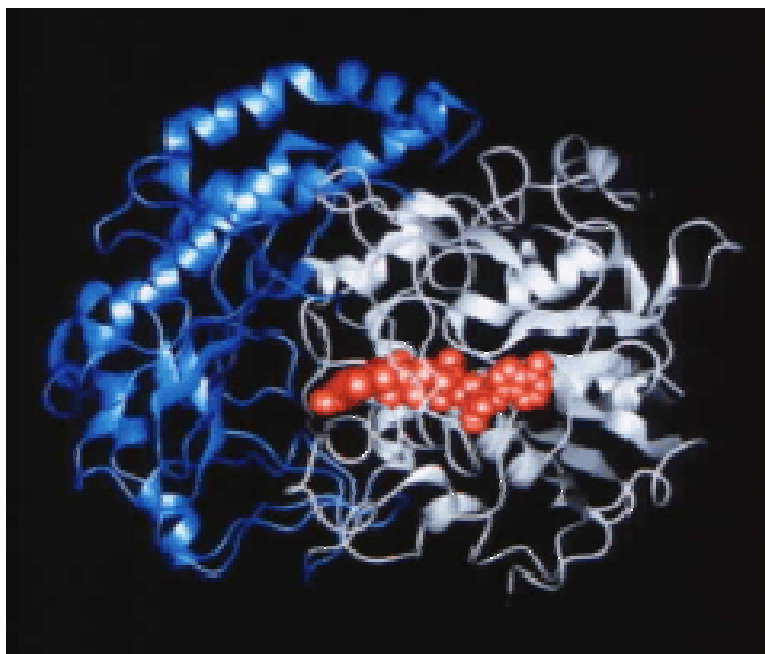
Como parte ativa da GOx, existe uma molécula orgânica complexa (coenzima), a flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O FAD é um componente comum nas reações biológicas de oxi-redução. As reações redox envolvem um ganho ou uma perda de elétrons por uma molécula. Na GOx, o FAD trabalha comoceptor inicial de elétrons e é reduzido a FADH<sub>2</sub>. O FADH<sub>2</sub> é então oxidado pelo oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) que possui um potencial mais elevado de redução. O O<sub>2</sub> gasoso é então reduzido a peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação de oxidação de uma molécula de glicose pela GOx é ilustrado na Figura 3.6.

A estrutura terciária da GOx desempenha um papel essencial em sua atividade biocatalítica. Simulações computacionais baseados em modelos mecânico-quânticos ilustram o que seria a estrutura terciária desta proteína. A Figura 3.7 representa a simulação computacional da molécula de GOx através de um modelo de

fitas. Observa-se em vermelho o sítio ativo desta enzima, no qual o FAD está contido.



**Figura 3.6** - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.

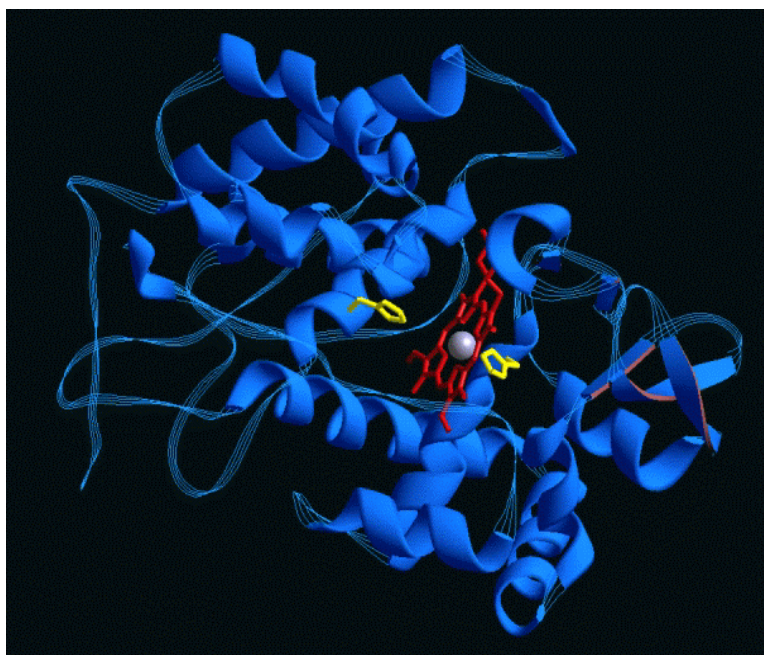


**Figura 3.7** - Estrutura de fitas representando a enzima glicose oxidase. O FAD está representado pela região vermelha.

Devido à sua alta especificidade, a glicose oxidase, juntamente com a peroxidase (HRP), são usadas como elementos biocatalíticos para se medir os níveis de açúcar no sangue, seja através de testes colorimétricos ou sensoriais.<sup>15,16</sup>

A peroxidase é uma outra enzima da classe das oxi-redutases e está envolvida na oxidação do peróxido de hidrogênio resultante da oxidação da glicose a ácido glucônico.<sup>17</sup>

A peroxidase (E.C. 1.11.1.7) tem sido utilizada em métodos eletroquímicos de análise de oxigênio uma vez que a reação redox promovida por esta enzima pode causar alteração de pH (potenciometria) ou gerar uma corrente elétrica (amperometria). A Figura 3.8 ilustra a molécula de peroxidase em sua representação de fitas.



**Figura 3.8** - Estrutura de fitas representando a enzima peroxidase. No centro está representado seu sítio ativo.

Embora as enzimas reduzam significativamente a barreira energética de uma reação, sua utilização na forma pura muitas das vezes inviabiliza o processo dado seu elevado custo. Neste caso, a opção pode ser a imobilização da enzima em suportes insolúveis, o que possibilita sua reutilização várias vezes. A reutilização de biocatalisadores reduz em muito o custo do processo.

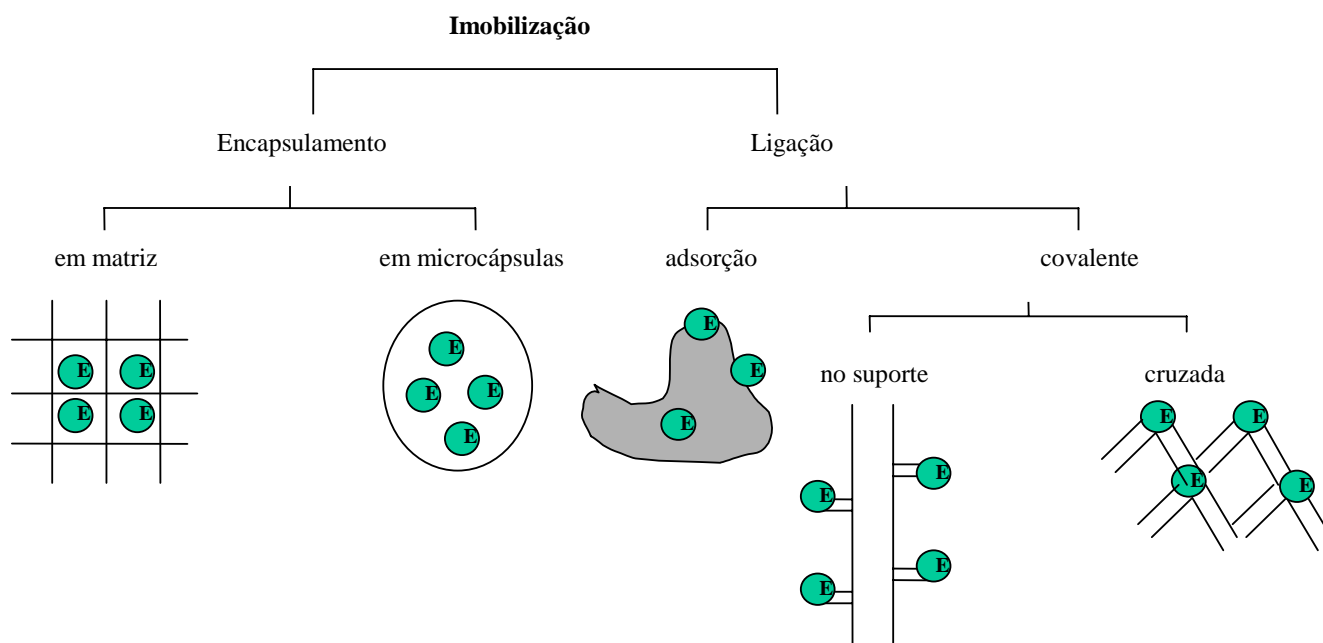
Em pouco mais de meio século de pesquisas e desenvolvimento de processos tecnológicos, inúmeras técnicas foram desenvolvidas para a imobilização de enzimas. A finalidade de um processo de imobilização é reduzir o custo da enzima viabilizando o processo tecnológico e muitas das vezes aumentar a estabilidade frente a flutuações de temperatura no processo. As principais técnicas de imobilização de enzimas são abordadas nos tópicos a seguir.

### **3.4 - Técnicas de imobilização de enzimas**

Pelo seu alto poder catalítico e especificidade, as enzimas têm sido usadas na fabricação de biossensores. Neste caso, a enzima pura deve ser imobilizada na superfície do eletrodo, mantendo sua atividade catalítica. Além de permitir a difusão de substratos e produtos para dentro e para fora da interface biocatalítica, a enzima imobilizada pode ser reutilizada, o que diminui o custo consideravelmente.

O suporte ideal para a imobilização de enzimas deve ser insolúvel em água, se ligar facilmente à enzima e ser inerte quimicamente. Os métodos mais comuns para imobilização de enzimas se dão através de encapsulamento (em matrizes ou microcápsulas poliméricas) ou através de ligações físicas ou químicas da enzima ao suporte.<sup>18,19</sup> A Figura 3.9 ilustra a classificação dos principais métodos de imobilização de enzimas. A seleção do método de imobilização dependerá essencialmente do suporte a ser utilizado na confecção do biossensor





**Figura 3.9** - Principais métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas.

### 3.4.1 - O encapsulamento

A imobilização de uma enzima via encapsulamento consiste em confinar a enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema é criada uma membrana seletiva que impede que as enzimas se difundam através da membrana polimérica, enquanto que moléculas pequenas (substratos e produtos) se difundem facilmente.<sup>20</sup>

A vantagem deste método é que a enzima não reage quimicamente com o suporte, não comprometendo assim seu sítio ativo. Porém, a difusão dos elementos através da membrana pode ser um problema, visto que a velocidade de difusão pode comprometer o tempo de resposta do biossensor. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos com baixo peso molecular, pois

estes compostos se difundem mais facilmente pela membrana seletiva se aproximando com mais facilidade do sítio ativo enzimático.<sup>20</sup>

O método de encapsulamento tem sido utilizado na imobilização da enzima lipase em polissulfonato de sódio (PSS) para utilização como catalisadores na esterificação do ácido láurico.<sup>18</sup> Filmes de poli(vinilálcool) (PVA) complexados com ácido bórico se mostraram eficazes no encapsulamento da enzima colesterol oxidase em biossensores de colesterol.<sup>21</sup>

### 3.4.2 – Adsorção

A adsorção de uma enzima é um dos métodos mais utilizados devido a sua simplicidade. A enzima é imobilizada em um suporte sólido, onde estão envolvidas ligações de baixa energia (ligações de hidrogênio, iônicas ou forças de van der Waals).<sup>22</sup>

A literatura, exibe vários exemplos de processos biotecnológicos que utilizam enzimas imobilizadas por adsorção em suportes orgânicos e inorgânicos. Polímeros como náilon 6 são utilizados para imobilização do microorganismo *Candida rugosa*. Foi demonstrado que este sistema pode ser utilizado para catalisar a síntese de ésteres derivados do ácido propiônico em n-hexano.<sup>23</sup> Biossensores amperométricos para monitoramento de pesticidas baseado na simples adsorção da enzima acetilcolinesterase em eletrodos impressos (screen-printed electrodes) também são citados na literatura.<sup>24</sup> Tais biossensores se mostraram tão eficientes quanto àqueles preparados por outros métodos de imobilização.

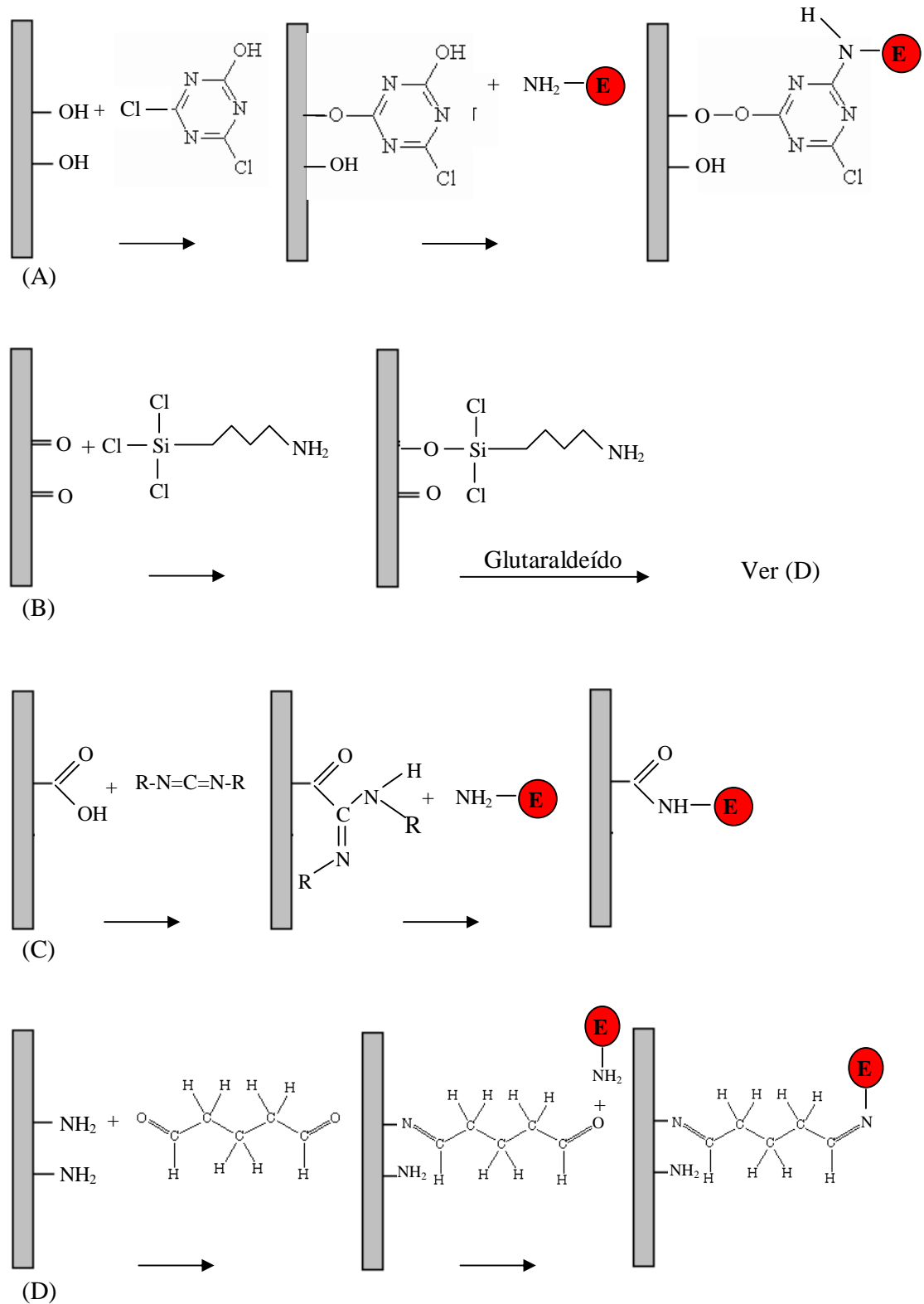
Apesar da simplicidade, a adsorção de proteínas para o projeto de biossensores pode levar a uma sua baixa estabilidade operacional, uma vez que o

biocatalisador pode ser lixiviado no eletrodo, comprometendo assim, o bom funcionamento do biossensor.

### 3.4.3 - Ligação covalente

A imobilização covalente de uma enzima a um suporte sintético envolve a ligação efetiva entre a enzima e o suporte através da ativação prévia de grupos reativos da matriz.<sup>25,26</sup> Desta forma, os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados, boa estabilidade mecânica e elevada área superficial. A ativação do suporte, na maioria das vezes consiste em silanização, reações com carboiminas, carbonimidias e glutaraldeído. As enzimas são ligadas na matriz através de grupos funcionais presentes em seus aminoácidos. Os principais aminoácidos usados para ligação covalente de uma enzima são a lisina, tirosina, cisteína e histidina.<sup>27</sup> A Figura 3.10 ilustra o processo de ativação de suportes para a imobilização covalente de enzimas.<sup>27</sup>

Deve-se ter o cuidado para não se comprometer o sítio ativo da enzima ao se efetivar a ligação, pois isto levaria à inativação da proteína. O emprego do método de ligação covalente para o preparo de biossensores pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que a enzima é ligada irreversivelmente à matriz.



**Figura 3.10** - Ativação de suportes para imobilização covalente de enzimas: Complexação com cloreto cianúrico (A), silanização (B), reação com carbodiimina (C), glutaraldeído (D). Figura reproduzida da referência 27 com permissão do autor.

#### **3.4.4 - Ligação covalente cruzada**

Na imobilização de uma enzima por ligação covalente cruzada, as enzimas são adsorvidas no suporte e em seguida são reticuladas pela utilização de agentes bi ou multifuncionais (glutaraldeído ou reagentes do gênero).<sup>18</sup> As ligações de enzimas por este método são irreversíveis, apresentando uma elevada resistência a variações de pH e temperatura, propiciando suportes de alta atividade e resistência à desnaturação. A desvantagem desta técnica se dá devido à sensibilidade de algumas enzimas à reação de reticulação.

#### **3.5 – Considerações finais**

A elevada eficiência catalítica e a especificidade fazem das enzimas sistemas ideais para o preparo de biossensores, uma vez que estas são características desejáveis deste tipo de dispositivo.

A velocidade de uma reação catalisada enzimaticamente pode ser determinada experimentalmente através da equação de Michaelis- Menten, uma generalização de enzimas que catalisam a reação de um único substrato (enzimas Michaelianas).

A glicose oxidase (GOx) e a peroxidase (HRP) são enzimas que catalisam reações redox de oxidação da molécula de glicose e do peróxido de hidrogênio, respectivamente. Tais enzimas são amplamente utilizadas para a determinação de glicose no sangue.

No desenvolvimento de biossensores a enzima deve ser purificada e então imobilizada por métodos físicos ou químicos. A escolha do melhor método de imobilização está diretamente ligado à performance de um biossensor. Quanto maior for a atividade enzimática após a imobilização, maior será a estabilidade e a

sensibilidade do biossensor. A seleção do suporte para imobilização do biocatalisador constitui tarefa importante no desenvolvimento de um biossensor.

Observa-se na literatura que os polímeros sintéticos constituem a classe mais importante de materiais utilizados no desenvolvimento de suportes para a imobilização de enzimas. Essa observação é oriunda do fato de que os polímeros são ricos em grupos funcionais que podem ser convenientemente ativados para o processo de imobilização.

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

### 3.6 – Referências

- [1] Lehninger, L.A. *Bioquímica 1*. Edgard Blücher, 1976
- [2] Stryer, L.; Berg, M.J.; Tymoczko, L.J. *Bioquímica*. Guanabara Koogan, 2002.
- [3] Lima et. al. Obtenção e utilização da enzima polifenoloxidase extraída de polpa de pinha (*annona squamosa* l.) madura no melhoramento do sabor do cacau (*theobroma cacao* l.). *Revista Brasileira de Fruticultura* **23** (3), p. 709-713, 2001.
- [4] Lima, E.D.P.A.; Pastore, G.M.; Lima, C.A.A. Purificação da enzima polifenoloxidase (pfo) de polpa de pinha (*annona squamosa* l.) madura<sup>1</sup>. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, (21) (1), p. 90-104, 2001.
- [5] <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/chromatography.html>: Acesso em 29/03/2006.
- [6] Wylen, G.V. *Fundamentos de termodinâmica* Edgard Blücher, 2003.

- [7] Furico Junior, A. *Enzimas e suas aplicações: cinética enzimática*. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina–Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2001.
- [8] E, Fischer. Einfluss der configuration auf die wirkung derenzyme. *Ber. Dt. Chem. Ges.* **27**, p.2985-2993, 1894.
- [9] Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **44** (2), p. 98-104, 1958.
- [10] Kieling, D.D. *Enzimas: Aspectos gerais*. Santa Catarina, Universidade Federal de Santa Catarina–Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, 2002.
- [11] Rosatto, S.S. *Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada*. Campinas, Universidade de Campinas–Instituto de Química, 2000. (Tese de Doutorado).
- [12] Wilson, R.; Turner, A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. *Biosensors and Bioelectronics*, **7** (3), p. 165-185, 1992.
- [13] Taqueda, M. E.; Converti, A.; Vitolo, M.; Pessoa Junior, A. Purification of glucose Oxidase from *Aspergillus niger* byLiquid-Liquid Cationic Reversed Micelles Extraction. *Biotechnology Progress* **21**, p. 868-874, 2005.
- [14] Mirón, J.; González, 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* **31**, p. 615–620, 2002.
- [15] Trinder, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, **6**, p. 24-27, 1969.

- [16] Suzuki, H.; Kumagai, A. A disposable biosensor employing a glucose-sensitive biochemomechanical gel. *Biosensors and Bioelectronics*, **18** (10), p. 1289-1297, 2003.
- [17] <http://en.wikipedia.org/wiki/Peroxidase>: Acesso em 23/03/2006.
- [18] Vecchia, R.D.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, **27**, (4), p. 623-630, 2004.
- [19] Arroyo, M. Inmovilización de enzimas. Fundamento, métodos y aplicaciones. *Acta Pharmaceutica*, **39**, (2), p. 23-39, 1998.
- [20] Villeneuve, P.; Muderhwa, J.M.; Graille, J.; Haas, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **9**, (4), p. 113-148, 2000.
- [21] Martins, M.; França, E. J.; Soares, D.A.W.; de Queiroz, A.A.A. Experimental and theoretical studies of cholesterol nanobiosensors. In: Congresso Brasileiro de Engenharia de Ciências dos Materiais, Foz do Iguaçu, 2006. *Submetido*.
- [22] Gerard, M.; Malhotra, B.D. Application of polyaniline as enzyme based biosensor. *Current Applied Physics*, **5**, p. 174-177, 2005.
- [23] Carta, G.; Gainer, J.L; Benton, A.H: Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, p. 1004-1009, 1991.
- [24] Bonnet, C.; Andreescu, S.; Marty, J.L. Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes. *Analytica Chimica Acta*, **481** (2), p. 209-211, 2003.



- [25] 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. *Analytica Chimica Acta*, **478**, p. 67-75, 2003.
- [26] 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. *Journal of Membrane Science*, **208**, p. 361-374, 2002.
- [27] Fernandes, E.G.R. *Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose*. Itajubá, Universidade Federal de Itajubá – Instituto de Ciências Exatas, 2005. (Dissertação de Mestrado).

## Capítulo 4 – Macromoléculas com arquitetura dendrítica

---

Macromoléculas com arquitetura dendrítica têm representado o mais recente avanço da química nanoscópica. O emprego de tais materiais para o projeto de sistemas nanotecnológicos tem atraído a atenção da comunidade científica pelo fato desses materiais apresentarem propriedades não convencionais quando comparado aos polímeros lineares ou ramificados, como a capacidade de mimetizar proteínas, elevada área superficial e um grande número de grupos funcionais na periferia da macromolécula. Estes grupos funcionais podem ser convenientemente ativados para a imobilização de enzimas, biocatalisadores essenciais para o desenvolvimento de biossensores.

### 4.1 – Histórico sobre o desenvolvimento dos dendrímeros

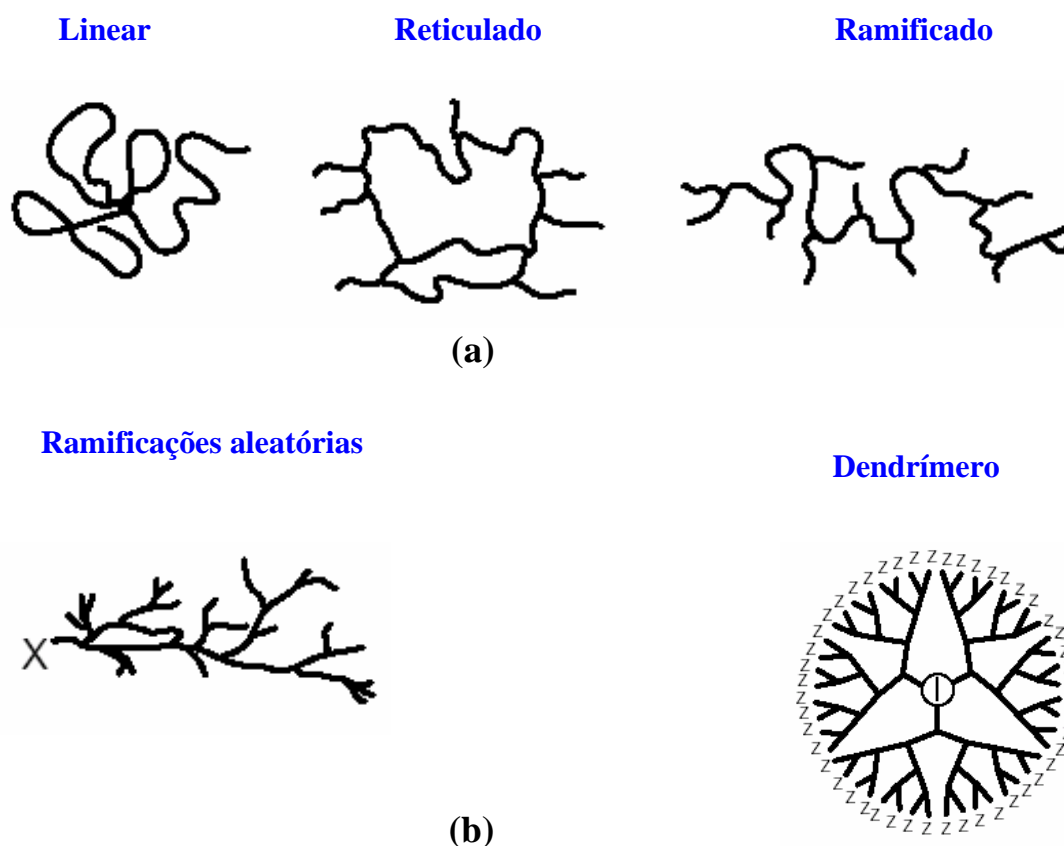
Dendrímeros são macromoléculas sintéticas monodispersas, com elevado peso molecular, elevada área superficial e que apresentam uma enormidade de grupos reativos em sua periferia. A estrutura química de um dendrímero é bem definida possuindo elevado grau de ramificação e de simetria.<sup>1,2</sup>

O termo dendrímero origina-se no grego, com *dendrons* significando árvore. Essas moléculas também são conhecidas como “moléculas em cascata”, starburst ou ainda como “arboróis”. Elas são geralmente formadas por um núcleo central multifuncional, no qual as ramificações (dendrons) estão ligadas.

O conceito de síntese de polímeros altamente ramificados foi primeiramente introduzido por F. Vogtle em 1978, que aplicou este conceito na síntese de aminas com baixo peso molecular.<sup>3</sup> Em 1984, Tomália e outros relataram a síntese de dendrímeros de poli(amidoamina), os quais, possuíam arquitetura semelhante à estrutura de uma árvore. Tal polímero foi denominado então dendrímero.<sup>4</sup> Paralela e

independentemente, Newcome e seu grupo reportaram síntese de macromoléculas similares àquelas obtidas por Tomália.<sup>5</sup>

A uniformidade molecular dos dendrímeros, a sua superfície multifuncional, bem como a presença de cavidades internas, fazem dessas macromoléculas sistemas interessantes para uma gama de aplicações.<sup>6-8</sup> A Figura 4.1 ilustra a estrutura de um dendrímero em comparação com os polímeros clássicos. Nota-se que os dendrímeros possuem uma estrutura bem definida com um alto grau de simetria, a presença de um núcleo central bem como a presença de grupos funcionais periféricos.



**Figura 4.1** - Estruturas poliméricas clássicas (a) comparativamente a estruturas dendríticas (b).

## 4.2 – A síntese de macromoléculas dendríticas

A preparação de dendrímeros pode ser efetuada de duas maneiras diferentes, seguindo uma rota divergente ou convergente de síntese.<sup>1,7,9</sup> Os métodos divergente e convergente de síntese dendrítica são mostrados na Figura 4.2.

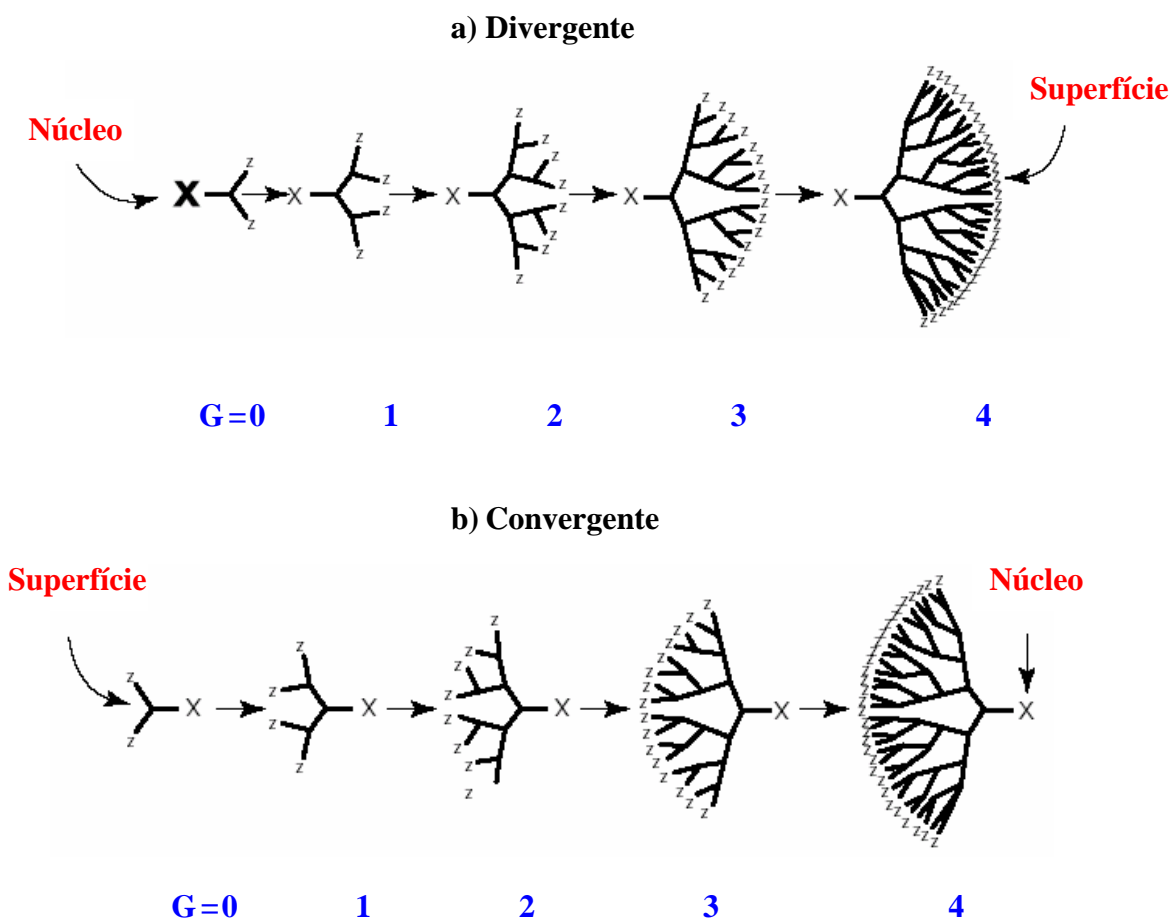
No método divergente, o dendrímero cresce para fora a partir de uma molécula multifuncional (núcleo). A molécula do núcleo reage com a molécula do monômero que contém um grupo reativo e dois grupos não reativos, dando origem a um dendrímero de geração 0 (G0). A superfície da molécula é então ativada para reações com mais monômeros. O número de grupos funcionais na superfície da macromolécula determina a geração do dendrímero.

Apesar de o método divergente ter se mostrado bem sucedido para a produção em larga escala de dendrímeros, algumas dificuldades são ainda encontradas. Pode haver ocorrência de reações laterais, ou ainda, as reações dos grupos externos podem não se completar, levando à formação de uma estrutura defeituosa, acarretando dificuldades na purificação do produto final.

O método convergente de síntese dendrítica foi desenvolvido para minimizar os problemas encontrados na síntese divergente.<sup>10</sup> Na aproximação convergente, o dendrímero é construído gradativamente, partindo dos grupos da extremidade e progredindo para dentro. Quando se chega ao crescimento das ramificações (dendrons) desejadas é feita a união do dendron com a molécula multifuncional do núcleo.

O método de síntese convergente para a obtenção de dendrímeros tem diversas vantagens. É relativamente fácil purificar o produto desejado e a ocorrência dos defeitos na estrutura final é minimizada. Porém, a rota de síntese convergente não permite a formação de elevadas gerações de dendrímeros, pois pode haver a

ocorrência de problemas estéricos nas reações dos dendrons com a molécula do núcleo. Dessa forma, para a produção de dendrímeros em larga escala, o método divergente é ainda preferido.



**Figura 4.2** - Técnicas de síntese de dendrímeros: método divergente (a), método convergente (b). O número de gerações é representado por G.

O dendrímero mais conhecido e explorado na literatura desde os trabalhos de D. Tomalia e Newcome é o poli(amidoamina) (PAMAM). Devido às suas características biomiméticas, ou seja, sua estrutura imita a estrutura de proteínas

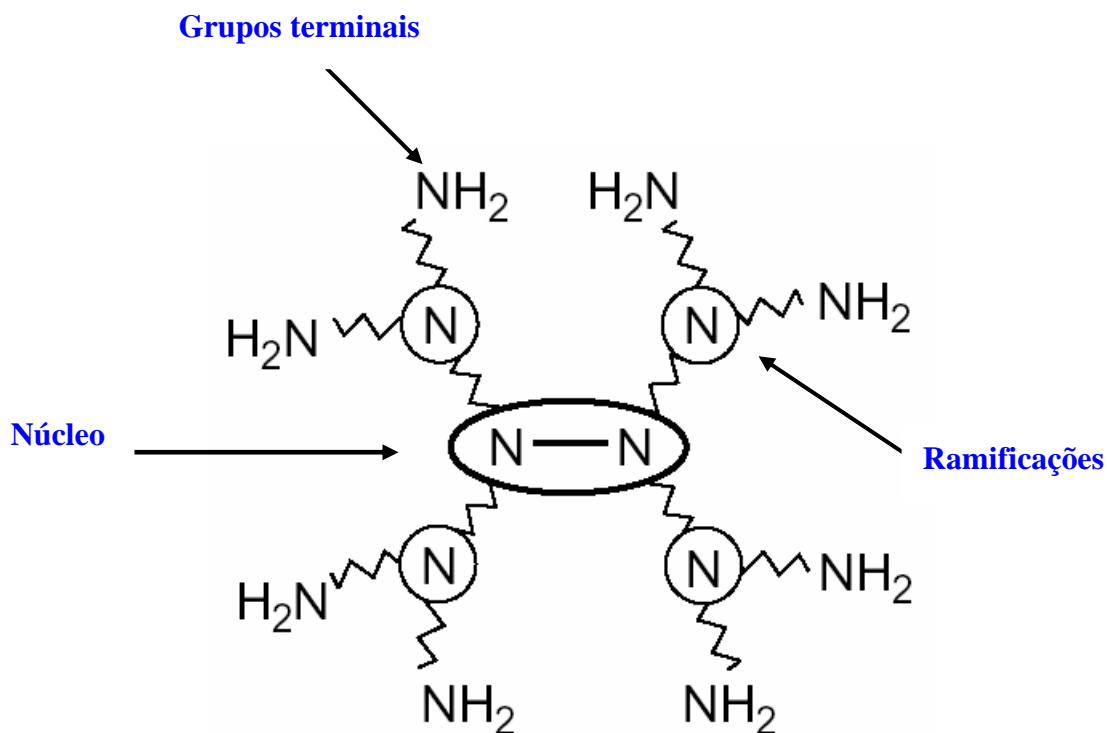
globulares, a utilização deste material na medicina tem sido investigada pela literatura.<sup>8,11</sup>

### 4.3 – O dendrímero PAMAM

O dendrímero (PAMAM) é um dos sistemas mais estudados atualmente com relação à sua aplicação na biotecnologia.<sup>8,11</sup> Devido à elevada densidade de grupos funcionais do tipo  $\text{NH}_2$  na periferia da macromolécula, o PAMAM parece ser um sistema ideal para o projeto de heterojunções contendo enzimas oxi-redutoras.<sup>12,13</sup> Neste sentido, o dendrímero PAMAM pode ser usado para a imobilização covalente de enzimas em biossensores através de ligações covalentes entre seus amino grupos periféricos e os grupamentos amina presentes nas enzimas.

Dendrímeros de poli(amidoamina) foram os primeiros dendrímeros a serem sintetizados.<sup>2</sup> O dendrímero PAMAM é constituído de um núcleo de amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou etilenodiamina ( $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$ ), ligado a ramificações de grupamentos amida ( $\text{R}-\text{CONH}_2$ ) e amina ( $\text{R}-\text{NH}_2$ ). A Figura 4.3 ilustra a estrutura química de um dendrímero PAMAM de 1º geração com um núcleo de etilenodiamina.

A síntese do PAMAM é realizada na presença de metanol, onde a amônia reage com acrilato de metila e então etilenodiamina é acrescentado. Na extremidade de cada ramificação existe um grupo amina livre que pode reagir com os dois monômeros provenientes do acrilato de metila e com duas moléculas de etilenodiamina. Cada seqüência completa da reação resulta em uma nova geração do PAMAM.



**Figura 4.3** - Estrutura de um dendrímero PAMAM de 1<sup>o</sup> geração (G1).

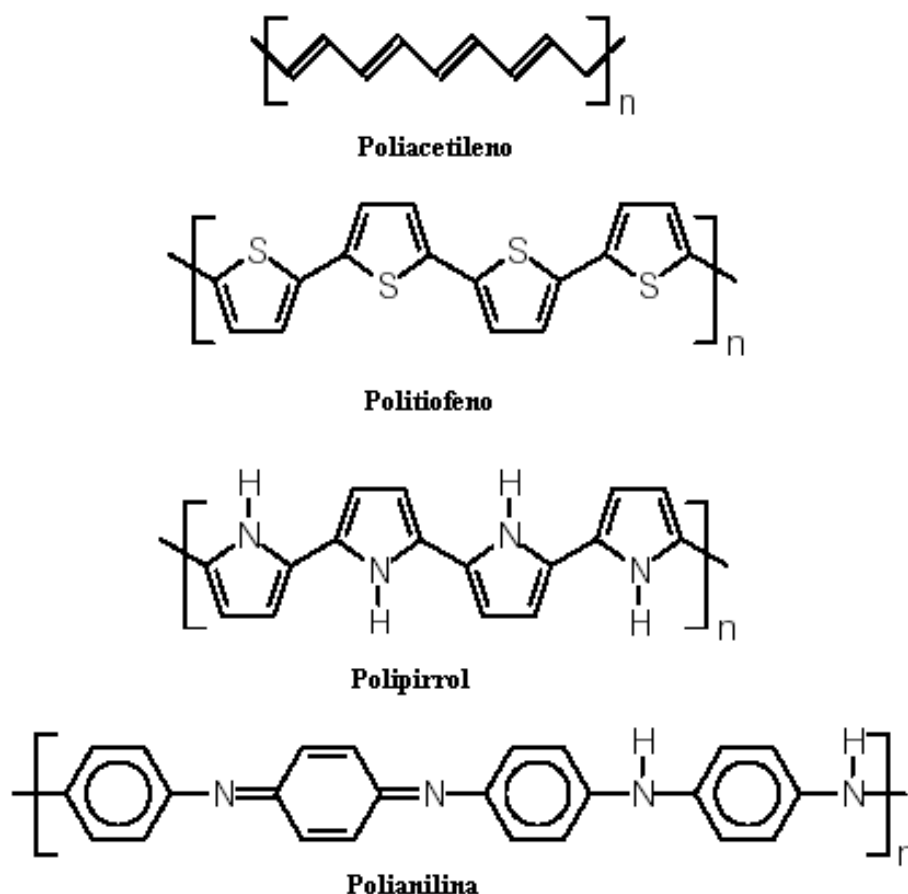
#### 4.4 – Características elétricas do dendrímero PAMAM

É fato bem conhecido na literatura que polímeros são de maneira geral isolantes. Isto significa que existe um grande espaçamento entre a banda de valência e a banda de condução (alto band gap) desses materiais.<sup>14</sup>

Também é fato bem conhecido que os polímeros conjugados, tais como o poliacetileno, politiofeno, polipirrol e polianilina (Figura 4.4) possuem uma característica elétrica semelhante a dos metais, sendo por isso denominados metais orgânicos.<sup>15</sup>

Os polímeros condutores são formados por cadeias que apresentam estruturas conjugadas, ou seja, alternância de ligações simples e duplas.<sup>15-17</sup> Nestes materiais as bandas de energia são associadas aos orbitais moleculares de fronteira HOMO e

LUMO. Estas siglas são usadas para designar em uma molécula o orbital molecular mais alto ocupado (HOMO - highest occupied molecular orbital) e o orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO - lowest unoccupied molecular orbital). Dessa forma, o HOMO representa para os materiais orgânicos, o que a banda de valência representa para os semicondutores inorgânicos. A mesma analogia pode ser feita para o LUMO e a banda de condução. A diferença de energia entre estes dois orbitais está associada com a excitabilidade da molécula e conseqüentemente com suas propriedades de condução elétrica.<sup>18</sup>



**Figura 4.4** - Estrutura química de alguns polímeros intrinsecamente condutores.



Como pode ser observado na Figura 4.3, o dendrímero PAMAM não possui conjugação em sua estrutura. Entretanto, relata-se na literatura que a condução em estruturas dendríticas ocorre entre regiões com alta densidade eletrônica presentes próximas do núcleo, chamadas de regiões doadoras de elétrons para regiões com baixa densidade eletrônica chamadas de receptoras. O processo de condução eletrônica em macromoléculas dendríticas, ocorrerá portanto, por meio do acoplamento eletrônico ( $A$ ) entre as regiões doadoras ( $V_{Di}$ ) e aceitadoras de elétrons ( $V_{Aj}$ ) existentes na macromolécula  $A$  distância entre estas duas regiões é descrita pela função de Grenn ( $G$ ), sendo um tanto maior quanto maior a geração do dendrímero, de acordo com a relação abaixo:<sup>19-21</sup>

$$A = \sum_{ij} V_{Di} G_{ij} V_{jA} \quad (4.1)$$

sendo a relação entre  $G$  e o Hamiltoniano ( $H$ ) do sistema dado por  $G(E - H) = 1$ .

Neste caso, a relação entre o número de unidades repetitivas entre sítios doadores e receptores de elétrons ( $N$ ) é dada por:

$$A \propto \varepsilon^N \quad (4.2)$$

sendo  $\varepsilon$  um fator dependente da energia para cada unidade repetitiva na macromolécula. Dessa forma um dendrímero de baixas gerações será menos resistivo em comparação com um dendrímero de altas gerações.

#### 4.5 – Considerações finais

Desde a síntese do primeiro dendrímero, estes sistemas, têm sido estudados por apresentarem propriedades distintas relativo aos polímeros convencionais. Tais propriedades fazem dos dendrímeros sistemas interessantes para várias aplicações em medicina e biotecnologia.

A síntese de um dendrímero se dá basicamente através de dois métodos, a saber: o método divergente e o método convergente, sendo que no segundo, a ocorrência de defeitos na estrutura da macromolécula é minimizada.

O dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM) é a primeira geração de dendrímeros bem caracterizada e comercializada citado pela literatura. A presença de grupos periféricos faz do PAMAM um sistema interessante para imobilização de enzimas. Espera-se que a atividade enzimática seja preservada devido à semelhança entre sua estrutura e a estrutura dendrítica.

O sinal de um biossensor depende do fluxo de elétrons entre o bioconjugado enzima/suporte e a superfície do eletrodo. Sabe-se que a condutividade em dendrímeros é dependente de sua geração. Neste sentido, o número de grupos periféricos e conseqüentemente o número de ramificações poderão ser significativos na performance do biossensor perante um analito especificado.

Uma característica importante do dendrímero PAMAM é sua capacidade formadora de filmes finos. Entretanto, os filmes finos não são mecanicamente estáveis, o que torna necessário utilizar-se uma matriz com propriedades elétricas e mecânicas que a caracterizam adequada para receber o bioconjugado PAMAM-GOx-HRP.

Devido às suas propriedades elétricas e ópticas é de interesse de nosso grupo de pesquisa os filmes finos de óxidos de índio e estanho (ITO). Tais sistemas são objeto de estudo do capítulo cinco dessa dissertação.

#### **4.6 – Referências**

- [1] Klajnert, B.; Bryszewska, N. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, **48** (1), p. 199-208, 2001.

- [2] Inoue, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Progress in Polymer Science*, **25** p. 453-571, 2000.
- [3] Buhleier, E.; Wehner, W.; Vogtle, F. Synthesis of Molecular Cavity Topologies, *Synthesis*, p. 155-158, 1978.
- [4] Tomalia et al. A new class of polymers; Starbursts-dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, **17** (1), p. 117-132.
- [5] Newcome et. al. Cascade molecules: A new approach to micelles A [27]-arborol. *Journal of Organic Chemistry*, **50** (11), p. 2003-2006, 1985.
- [6] Patri, A.K.; Majoros I.J.; Baker J.R. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* **6**, p. 466-471, 2002.
- [7] Aulenta F.; Hayes W.; Rannard S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal* **39**, p. 1741-1771, 2003.
- [8] Svenson, S.; Tomalia, D.A. Dendrimers in biomedical applications – reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**, p. 2106-2129, 2005.
- [9] Yates, C.R.; Hayes, W. Synthesis and applications of hyperbranched polymers. *European Polymer Journal* **40**, p. 1257-1281, 2004.
- [10] Fréchet, 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* **112**, p. 7638-7647, 1990.
- [11] Esfand, R.; Tomalia, D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Research Focus Reviews* **6** (8), p. 427-436, 2001.

- [12] Snejdarkova et. al. Acetylcholinesterase sensors based on gold electrodes modified with dendrimer and polyaniline: A comparative research. *Analytica Chimica Acta* **514**, p. 79-88, 2004.
- [13] Liu et. al. A hydrogen peroxide biosensor based on nano-Au/PAMAM 2004.
- [14] Sze, S.M. *Physics of Semiconductor Devices*. New York: John Wiley and Sons, 1969.
- [15] Faez et. Al. Polímeros condutores. *Química Nova na Escola*, **11**, p. 13-18, 2000.
- [16] Kaiser, A.B. Electronic transport properties of conducting polymers and carbon nanotubes. *Reports on Progress in Physics*, **64**, p. 1-49, 2001.
- [17] Faria, R.M.; Oliveira Jr, O.N. Exploiting the electrical properties of thin films of semiconducting polymers. *Brazilian Journal of Physics*, **29** (2), p. 360-370, 1999.
- [18] *The Workshop on Conductive Polymers*. Disponível em: <http://www.osti.gov/accomplishments/pdf/DE87006299/DE87006299.pdf>. Acesso em 06/10/2005.
- [19] Risser, S.M.; Beratan, D. N.; Onuchicz, J.N. Electronic coupling in starburst dendrimers: connectivity, disorder, and finite size effects in macromolecular bethe lattices. *Journal of Physical Chemistry*, **97**, p. 4523-4527, 1993.
- [20] Vieira, N.C.S.; Fernandes, E.G.R.; Soares, D.A.W.; de Queiroz, A. A. A in: 8º Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia, 2005, Vol. 1, 109.
- [21] Vieira, N.C.S.; Grassi, M.; SOARES, D.A.W.; de Queiroz, A. A. A in: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, São Pedro, 2005, 155.

## Capítulo 5 – O óxido de índio dopado com estanho (ITO)

---

### 5.1 – Propriedades dos filmes de ITO

Filmes finos de óxido de índio ( $\text{In}_2\text{O}_3$ ) são transparentes à radiação eletromagnética na região visível e exibem uma boa condutividade elétrica. Juntamente com o óxido de estanho ( $\text{SnO}_2$ ), um outro óxido transparente e com boas propriedades elétricas, estes materiais encontram várias aplicações tecnológicas especialmente quando são usados como eletrodos.<sup>1-4</sup>

Por se tratarem de um tipo de óxido, certamente filmes de óxido de índio e óxido de estanho seriam classificados como isolantes. No entanto, as vacâncias de oxigênio presentes em suas redes cristalinas, os tornam semicondutores do tipo n. Para aumentar a condutividade, os óxidos de índio e estanho, como em qualquer semicondutor; são produzidos em estados dopados. Geralmente antimônio é incorporado na rede do óxido de estanho ( $\text{Sn}_2\text{O}_2:\text{Sb}$ ) e estanho na rede do óxido de índio ( $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ ).<sup>5,6</sup> Os íons Sb e Sn substituem os átomos de estanho e índio nas redes dos óxidos, respectivamente. Como os íons substituintes possuem um elétron a mais na camada de valência, a sua presença altera a distribuição eletrônica da banda de valência e da banda de condução, doando um elétron por átomo de impureza, fato que aumenta consideravelmente a capacidade condutora do material.

O óxido de estanho dopado com índio, mais conhecido entre a comunidade científica como ITO (indium tin oxide) é o óxido condutor transparente (TCO) mais usado e relatado na literatura.<sup>7-9</sup> Ele é constituído de uma mistura de óxido de índio e óxido de estanho, geralmente em proporções de 90% de  $\text{In}_2\text{O}_3$  e 10% de  $\text{SnO}_2$ . O ITO exibe uma baixa resistividade elétrica ( $10^{-4} - 10^{-6} \Omega \cdot \text{cm}$ ) e baixo band gap (3,3 eV), além de apresentar boa estabilidade físico-química e morfologia superficial. A

síntese de filmes finos de ITO é relativamente fácil quando comparado com a síntese do óxido de estanho, uma vez que o principal precursor desse óxido ( $\text{SnCl}_4$ ) reage com a umidade de forma exotérmica.<sup>5</sup> Neste sentido, o ITO exibe uma série de características que o torna uma das melhores opções para a confecção de eletrodos, em especial para os biossensores, uma vez que este material é inerte quimicamente.

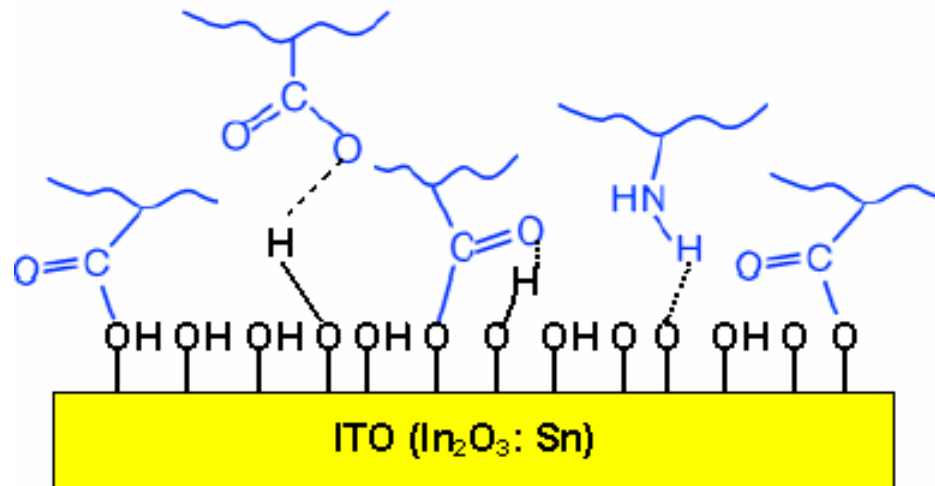
## 5.2 – Aplicações de filmes de ITO no projeto de biossensores

As excelentes propriedades do ITO, sua fácil síntese, bem como suas propriedades anfotéricas, levaram à escolha desse material como constituinte do eletrodo enzimático a ser desenvolvido neste trabalho.

O ITO é um óxido anfótero (ou anfiprótico). Tal óxido pode se comportar como ácido ou base dependendo do meio reacional.<sup>10</sup> Este fato leva a formação de hidroxilas (OH) na superfície do filme de ITO quando esta reage com umidade do ar. De acordo com Johnston, a densidade de grupos OH na superfície do ITO situa-se em torno de  $10^6$  grupos/ $\text{cm}^2$ .<sup>11</sup> Esta abundância de grupos funcionais do tipo OH na superfície do ITO permite que ele seja usado como um substrato apropriado para a imobilização de proteínas.

Trabalhos recentes indicam que as proteínas podem ser covalentemente imobilizadas na superfície do óxido através de reações de esterificação entre o grupo OH da superfície do ITO e os grupos carboxílicos presentes nas moléculas protéicas. A presença de grupos OH na superfície do ITO também facilita a adsorção dos grupos carboxílicos e/ou grupos amina através de ligações de hidrogênio. A Figura 5.1 ilustra as ligações entre grupos carboxilas e aminas com a superfície de um filme de ITO.<sup>12,13</sup>

Os grupos OH podem ainda ser ativados através de reações com cloreto cianúrico, ligando covalentemente as enzimas ao suporte de ITO, utilizando-se os grupamentos aminas presentes nas mesmas.<sup>12,13</sup>



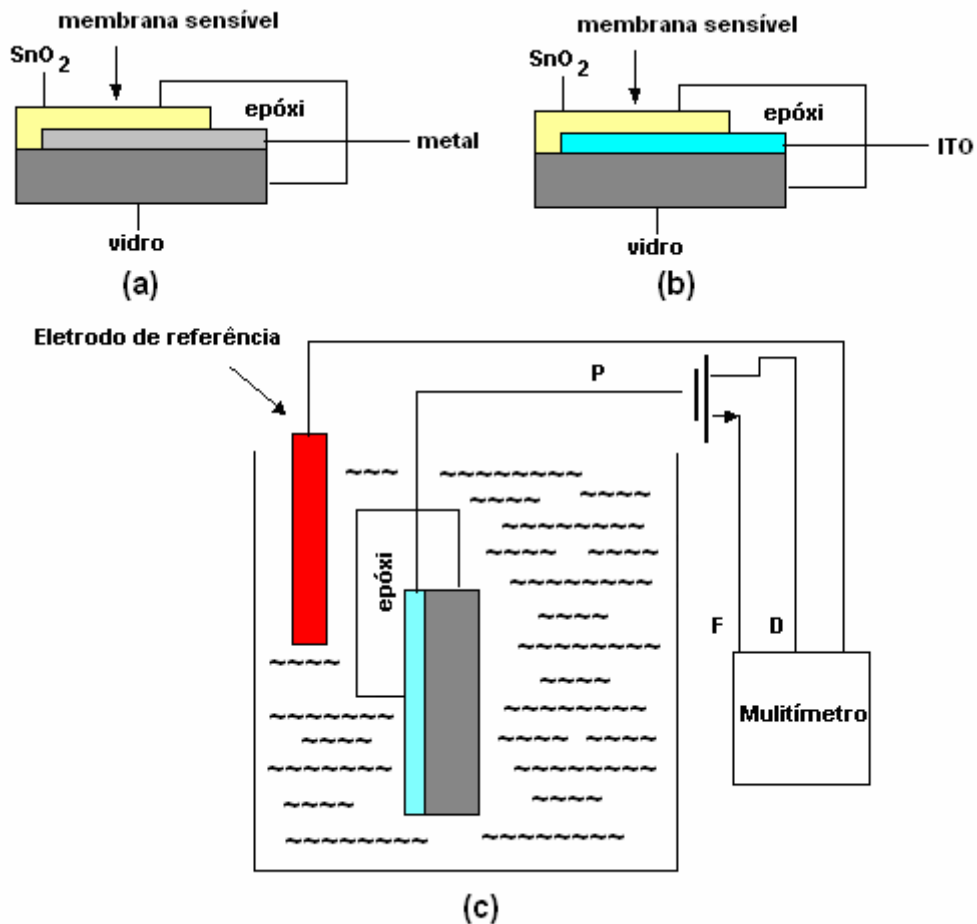
**Figura 5.1** - Superfície do ITO usada na imobilização de grupos carboxílicos e aminas.

A obtenção de biossensores de glicose baseados em filmes de ITO é citada na literatura. Esses biossensores demonstram uma elevada performance quanto à monitoração de glicose a nível clínico.<sup>14</sup>

Alguns ENFETS (transistores de efeito de campo enzimáticos) fazem uso do óxido de índio dopado com estanho. Neste caso, usa-se um MOSFET convencional com seu eletrodo porta conectado a uma membrana sensível que contém o material biológico imobilizado. Este dispositivo é chamado de EGFET (transistor de efeito de campo de porta estendida). A diferença de potencial criada na membrana sensível controla a passagem de corrente entre os eletrodos fonte e dreno do MOSFET, que

pode ser facilmente monitorada com o auxílio de um multímetro. Este sistema é bastante elegante, uma vez que o FET é separado do meio reacional, possibilitando a reutilização do MOSFET.<sup>15,16</sup>

Nos EGFETs o ITO faz parte da interface metálica da junção metal-óxido do FET atuando como um metal devido á sua alta condutividade em substituição ao alumínio.<sup>17</sup> O ITO também é usado como membrana sensível na qual as enzimas são imobilizadas.<sup>18</sup> A Figura 5.2 ilustra a utilização do ITO em EGFETs.



**Figura 5.2** - ITO usado em EGFETs: EGFET convencional (a), ITO altamente dopado substituindo o Al (b), ITO como parte da membrana sensível (c). P, F e D representam, respectivamente, os eletrodos porta, fonte e dreno de um MOSFET convencional.



### 5.3 – Preparação de filmes de ITO

Filmes finos de ITO têm sido preparados por diversas técnicas de deposição. Destacam-se a deposição química a partir do vapor (CVD), a evaporação a vácuo, o bombardeamento iônico (*sputtering*) e o processo sol-gel.<sup>20-24</sup>

De todas as técnicas citadas anteriormente, o CVD apresenta diversas vantagens, como a simplicidade da técnica, baixo custo e baixa temperatura de deposição. Porém, filmes depositados a partir do processo CVD são geralmente inferiores quanto à uniformidade estrutural e às propriedades eletroópticas quando comparados com filmes depositados por técnicas modernas como o *sputtering*.

O bom controle dos parâmetros de deposição que o CVD oferece, como controle da temperatura do substrato, temperatura de tratamento térmico e espessura do filme minimiza os defeitos estruturais como alta porosidade e irregularidades superficiais comumente observados nos filmes de ITO e melhoram suas propriedades elétricas.<sup>20,21</sup>

A técnica de deposição química a partir da fase vapor, consiste no crescimento do filme por meio de uma reação química que ocorre na superfície do substrato.<sup>26</sup> Para isto, uma solução contendo íons do óxido a ser formado é vaporizada sobre um substrato pré-aquecido. Geralmente são utilizados cloreto de índio ( $\text{InCl}_3$ ) e cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$  ou  $\text{SnCl}_4$ ) como precursores para a fabricação de ITO via CVD, podendo também ser usados o nitrato de índio  $\text{In}(\text{NO}_3)_3$  ou o sulfato de índio ( $\text{In}_2(\text{SO}_4)_3$ ).<sup>20,27,28</sup>

No caso de síntese de filmes de ITO usando cloreto de índio e estanho, após a formação do ITO, ocorre a liberação de ácido clorídrico de acordo com as reações:



Estudos da literatura apontam que variáveis como a temperatura do substrato e tratamento térmico dos filmes depositados, o percentual do dopante, bem como a velocidade vaporização, exercem um papel importante nas propriedades eletroópticas do filme.<sup>29,30</sup> Neste sentido, o controle de tais parâmetros deve ser otimizado para que se obtenha filmes de ITO com boas propriedades de condução elétrica, propriedade de extrema importância no projeto de biossensores.

#### 5.4 – Considerações finais

O óxido de índio dopado com estanho (ITO) é um semicondutor tipo n que apresenta excelentes propriedades eletroópticas para o projeto de biossensores.

A síntese via deposição química a partir da fase vapor (CVD) é uma técnica alternativa simples e barata para a obtenção de filmes de ITO com as propriedades adequadas para o preparo de biossensores de glicose.

As propriedades de condução deste material e a presença de grupos superficiais tipo OH faz do ITO um sistema interessante e promissor para o projeto de biossensores. Os grupos hidroxilas podem ser convenientemente ativados para a imobilização do material de interesse biológico, principalmente enzimas, constituinte essencial de um biossensor.

## 5.5 – Referências

- [1] Losurdo et. al. Interrelation between nanostructure and optical properties of oxide thin films by spectroscopic ellipsometry. *Surface and Coatings Technology*, **151**, p. 2-8, 2002.
- [2] Toneva, A.; Mihailova, T.; Sueva, D.; Georgiev, S. Homogeneous CVD  $\alpha$ -Si:H thin film based position sensitive photodetector. *Vacuum*, **47** (10), p. 1207-1209, 1996.
- [3] Sicanugrist et. al. Amorphous silicon oxide and its application to metal/n-i-p/ITO type a-Si solar cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, **34**, p. 415-422, 1994.
- [4] Granqvist, C. G.; Hultaker, A. Transparent and conducting ITO films: new developments and applications. *Thin Solid Films*, **411** (1) p.1-5, 2002.
- [5] Cardoso, W.S.; Longo, C.; De Paoli, M.A. Preparação de eletrodos ópticamente transparentes. *Química Nova*, **28** (2), p. 345-349, 2005.
- [6] Legnani, C.; Mattoso, I.G.; Cruz, L.R.O. Microestrutura de filmes de  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$  depositados por pulverização catódica com rádio-frequência: influência nas propriedades elétricas e óticas. *Revista Brasileira de aplicações de Vácuo*, **24** (1), p. 53-57, 2005.
- [7] Penza et. al. Characterization of transparent and conductive electrodes of indium tin oxide thin films by sequential reactive evaporation. *Thin Solid Films* **349** (1-2), p. 71-77, 1999.
- [8] Adurodija et. al. Highly conducting indium tin oxide (ITO) thin Films deposited by pulsed laser ablation. *Thin Solid Films*, **350** (1-2), p. 79-84, 1999.
- [9] Sun, X.W.; Huang, H. C.; Kwok, H. S. On the initial growth of indium tin oxide on glass. *Applied Physics Letters*, **68** (19), p. 2663-2665, 1996.

- [10] [http://en.wikipedia.org/wiki/Indium\\_oxide](http://en.wikipedia.org/wiki/Indium_oxide): Acesso em 22/05/2006.
- [11] Johnston, L. J. *Photochemistry in Organised & Constrained Media*. VCH Publishers. 1991.
- [12] Fang, A.; Ng, H.T.; Su, X.; Li, S.F.Y. Soft-lithography mediated submicrometer patterning of self-assembled monolayer of hemoglobin on ITO surfaces. *Langmuir*, **16**, p. 5221- 5226, 2000.
- [13] Fang, A., Ng, H.T., Li, S.F.Y., 2001. Anchoring of self-assembled hemoglobin molecules on bare indium-tin oxide surfaces. *Langmuir* **17**, 4360-4366.
- [14] Chi et. al. Study on extended gate field effect transistor with tin oxide sensing membrane. *Materials Chemistry and Physics*, **6** (1), p. 19-23, 2000.
- [15] Chen et. al. Portable urea biosensor based on the extended-gate field effect transistor *Sensors and Actuators B: Chemical*, **91** (1-3), p180-186, 2003.
- [16] Yin et. al. Separate structure extended gate H<sup>+</sup>-ion sensitive field effect transistor on a glass substrate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **71**, (1-2) p. 109-111. 2000.
- [17] Yin et. al. Study of indium tin oxide thin film for separate extended gate ISFET. *Materials Chemistry and Physics*, **70**, p. 12-16, 2001.
- [18] Sawada, Y.; Kobayashi, C.; Seki, S.; Funakubo, H. Highly-conducting indium-tin-oxide transparent films fabricated by spray CVD using ethanol solution of indium (III) chloride and tin (II) chloride. *Thin Solid Films* **409** (1), p. 46-50, 2002.
- [19] Maruyama, T.; Fukui, K. Indium tin oxide thin films prepared by chemical vapor deposition. *Journal of Applied Physics* **70** (7), p. 3848-3851, 1991.
- [20] Nakao et. al. Characterization of indium tin oxide film and practical ITO film by electron microscopy. *Thin Solid Films* **370** (1), p. 155-162, 2000.

- [21] Guillén, C.; Herrero, J. Influence of oxygen in the deposition and annealing atmosphere on the characteristics of ITO thin films prepared by sputtering at room temperature. *Vacuum*, **80**, (6), p. 615-620, 2006.
- [22] Kim, S.S.; Choi, S.Y.; Park, C.G.; Jin, J.W. Transparent conductive ITO thin films through the sol-gel process using metal salts. *Thin Solid Films* **347** (1-2), p. 155-160, 1999.
- [23] Zhou et. al. Preparation of indium tin oxide films and doped tin oxide films by an ultrasonic spray CVD process. *Applied Surface Science* **172**, p. 245-252, 2001.
- [24] Tatsch, P.J. Deposição de filmes. Disponível em: <http://www.ces.unicamp.br/cursos/fee107/download/cap11.pdf>. Acesso em 22/04/2006.
- [25] Tomonaga, H.; Morimoto, T. Indium-tin oxide coatings via chemical solution deposition. *Thin Solid Films* **392** (2), p. 243-248, 2001.
- [26] Gomes, J.P. Characterization of indium-doped zinc oxide films deposited by pyrolytic spray with different indium compounds as dopants. *Thin Solid Films* **293** (1-2), p. 117-123, 1997.
- [27] Hichou, A.E. Effect of substrate temperature on electrical, structural, optical and cathodoluminescent properties of  $\text{In}_2\text{O}_3$ -Sn thin films prepared by spray pyrolysis. *Thin Solid Films* **458** (1-2), p. 263-258, 2004.
- [28] Nisha, M.; Anusha, S.; Antony, A.; Manoj, R.; Jayaraj, M.K. Effect of substrate temperature on the growth of ITO thin films. *Applied Surface Science*, **252** (5) p.1430-1435, 2005.

## Capítulo 6 -Objetivos

---

Com base no exposto até o momento, este trabalho tem como objetivo principal a obtenção de um biossensor amperométrico para análise de glicose baseado em dendrímeros PAMAM contendo enzimas imobilizadas. O bioconjugado PAMAM-GOx-HRP será imobilizado em eletrodos de óxido de índio dopado com estanho (ITO), devido às características elétricas desse material.

È necessário conhecer as propriedades físico-químicas do biossensor, uma vez que tais propriedades exercem influência direta no sinal do mesmo. Para tal, são apontados os seguintes objetivos específicos:

- síntese e caracterização físico-química do dendrímero PAMAM;
- síntese de filmes finos de ITO através da técnica CVD, seguido de sua caracterização eletroóptica e estudo de sua viabilidade na utilização como eletrodo;
- avaliação da performance do biossensor quanto à monitoração de glicose, através de curvas de corrente em função do tempo e corrente em função da concentração de glicose. Os ensaios realizados neste trabalho serão efetuados em condições *in vitro*.

## Capítulo 7 – Materiais e métodos

---

### 7.1 – Síntese e caracterização do eletrodo: filmes finos de ITO

Neste trabalho foram preparados filmes de ITO pela técnica CVD. Para a preparação dos filmes foram usados como precursores os sais sulfato de índio ( $\text{In}_2(\text{SO}_4)_3$ ) e cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_4$ ) (ambos fornecidos pela Merck com grau de pureza de 99,9%). Neste sentido, uma solução metanólica a 0,1 M foi utilizada neste trabalho para a deposição dos filmes finos de ITO.<sup>1,2</sup>

Vidro óptico (Micro Slide Glass) foi usado como matriz para a deposição dos filmes de ITO. As lâminas de vidro foram inicialmente lavadas com detergente e água deionizada e em seguida lavadas com acetona e secas em dessecador sob vácuo à temperatura ambiente (25 °C).

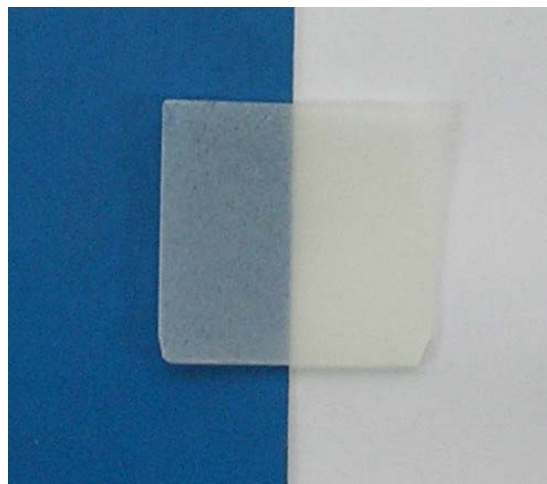
Para a deposição do filme de ITO as lâminas de vidro foram inicialmente equilibradas termicamente a 250 °C e pressão atmosférica (1 atm). Após o equilíbrio térmico a solução metanólica de  $\text{In}_2(\text{SO}_4)_3$  e  $\text{SnCl}_4$  a 0,1 M foi borrifada sobre a lâmina de vidro aquecida com o auxílio de um spray comercial. A transferência de massa para a lâmina foi de aproximadamente 150  $\mu\text{g}$ /borrifada.

Após 30 deposições em intervalos de 10 em 10 minutos, o filme de ITO sofreu tratamento térmico a 600 °C por 90 minutos à pressão atmosférica (1 atm). Após o tratamento térmico os filmes foram resfriados à velocidade de 10 °C/min até a temperatura ambiente e armazenados em dessecador sob vácuo à temperatura de 25 °C. A Figura em 7.1 mostra a micrografia de um dos filmes de ITO obtidos neste trabalho.

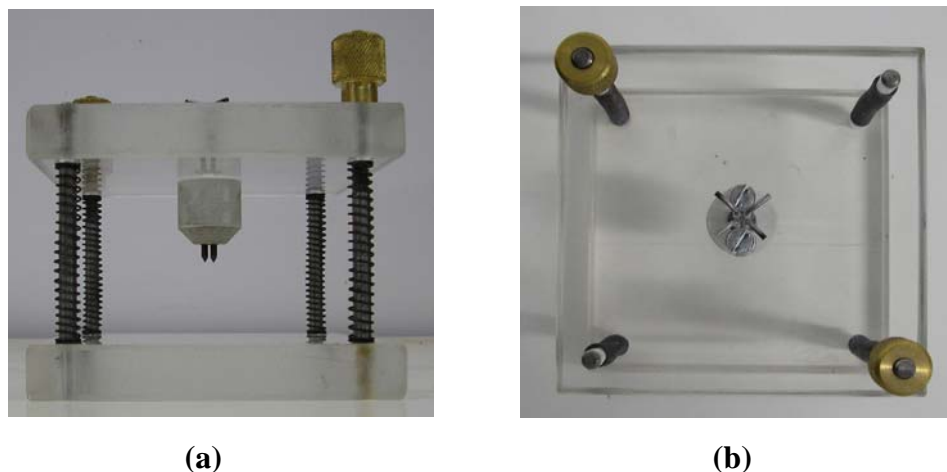
Os filmes de ITO obtido foram caracterizados quanto às suas propriedades óticas por espectroscopia UV/Vis (Varian 634) e microestruturalmente por

microscopia eletrônica de varredura (MEV, Phillips XL 30) e difratometria de RX (XRD, Phillips,  $\text{CuK}\alpha$   $\lambda=1,5418$  angstroms).

A caracterização elétrica dos filmes de ITO foi efetuada pela técnica de quatro pontos utilizando um suporte especialmente desenvolvido para esta finalidade (Figura 7.2). As medidas elétricas foram obtidas com o auxílio de uma fonte de tensão Keithley (K-237).



**Figura 7.1** - Fotografia do filme de ITO depositado em vidro obtido neste trabalho.



**Figura 7.2** - Aparato experimental usado na caracterização por 4 pontos dos filmes de ITO depositados em vidro: vista de perfil (a); a mesma montagem vista por cima (b).



## 7.2 – Obtenção do biossensor de glicose

A obtenção do biossensor de glicose se deu em três etapas a saber: síntese e caracterização do dendrímero poli(amidoamina), obtenção do bioconjugado e sua imobilização na superfície do ITO e imobilização das enzimas no dendrímero PAMAM. Obtendo-se biossensor do tipo bienzimático ITO/PAMAM-GO<sub>x</sub>-HRP (Figura 7.3).

### 7.2.1 – Síntese e caracterização do dendrímero PAMAM

Neste trabalho, o dendrímero PAMAM foi sintetizado via rota divergente utilizando a reação de adição de Michael em meio metanólico onde a amina primária etilenodiamina (EDA) reage com acrilato de metila em uma primeira etapa para formar um núcleo de um tetraéster (tetra-acrilato de metila).

Após sucessivas reações do núcleo inicialmente formado, dendrímeros de gerações G0 e G4 foram obtidos. Os dendrímeros obtidos foram purificados cromatograficamente em colunas de gel sephadex LH-20 utilizando-se etanol como eluente. O rendimento do processo de síntese foi de 58%.

Após a purificação, os dendrímeros obtidos foram caracterizados por espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear de prótons (<sup>1</sup>H-NMR) e cromatografia de permeação em gel (GPC).

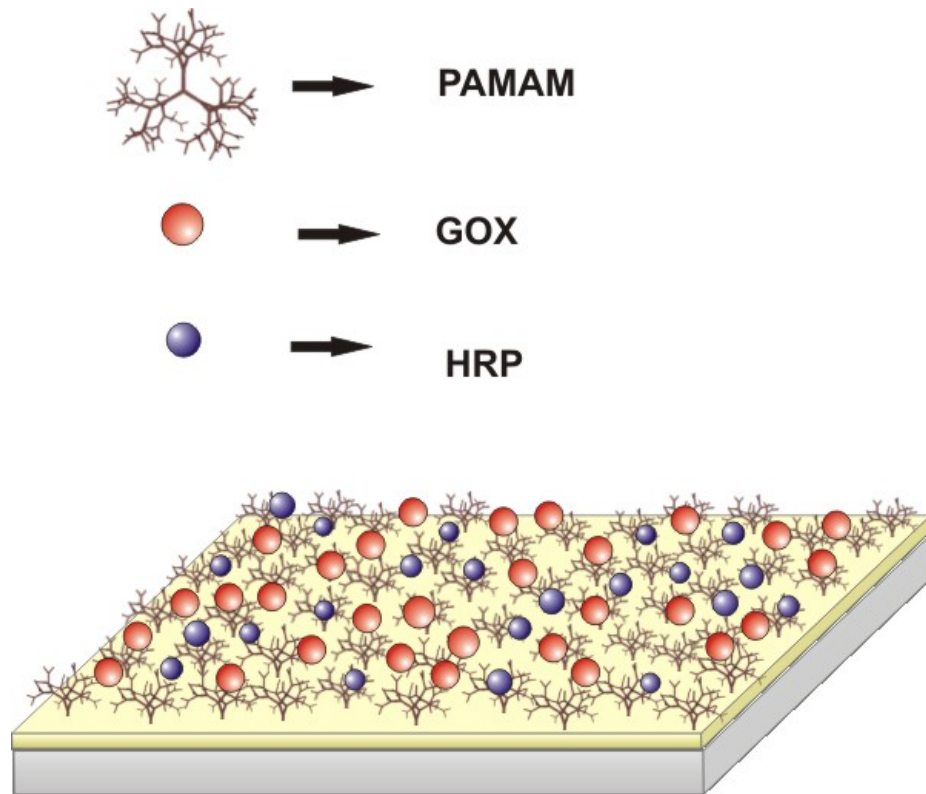
Espectroscopia UV/VIS (Varian 634) e medidas I(V) foram utilizadas para investigação das propriedades eletroópticas dos dendrímeros obtidos. Para análise dos orbitais de fronteira (HOMO-LUMO) bem como da distribuição de cargas na molécula do dendrímero, simulações computacionais por modelagem molecular foram realizadas nas duas primeiras gerações do PAMAM (G0 e G1).

### 7.2.2 – Imobilização das enzimas

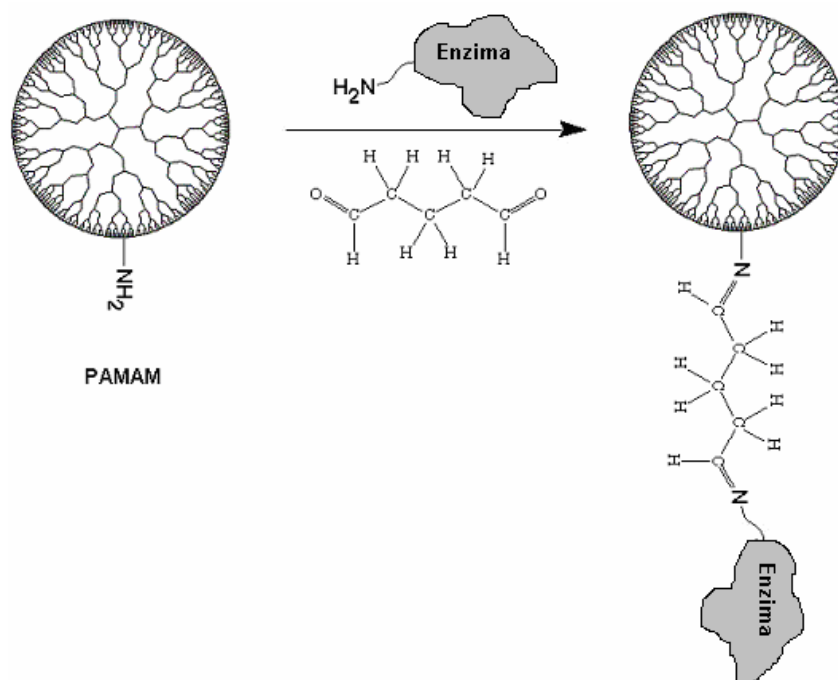
O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, aumentar a estabilidade, reduzir custos e aumentar, em alguns casos, a atividade enzimática. Esses fatores dependem principalmente da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização. O glutaraldeído, em função de suas propriedades bifuncionais, tem sido um dos reagentes mais empregados na imobilização de enzimas devido à formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte sólido, conferindo à enzima maior estabilidade.<sup>3</sup>

O dendrímero PAMAM pode ser considerado um suporte ideal para imobilização de enzimas, devido ao grande percentual de grupos amina disponíveis em sua estrutura química, particularmente na periferia da macromolécula. O principal problema durante o processo de imobilização de uma enzima pode ser a perda parcial ou total da atividade, que pode ser atribuída a diversos fatores, como propriedades da própria enzima, do suporte, dos reagentes utilizados e das condições experimentais.

Neste trabalho, o glutaraldeído foi utilizado no processo de imobilização, pois possui propriedades bifuncionais que ativam os grupos amina. A Figura 7.4 ilustra uma sugestão da reação obtida entre PAMAM, glutaraldeído e as enzimas glicose oxidase e peroxidase.



**Figura 7.3** - Representação do biossensor obtido: ITO/PAMAM-GOx-HRP.



**Figura 7.4** - Ilustração do processo de imobilização enzimática adotado neste trabalho.

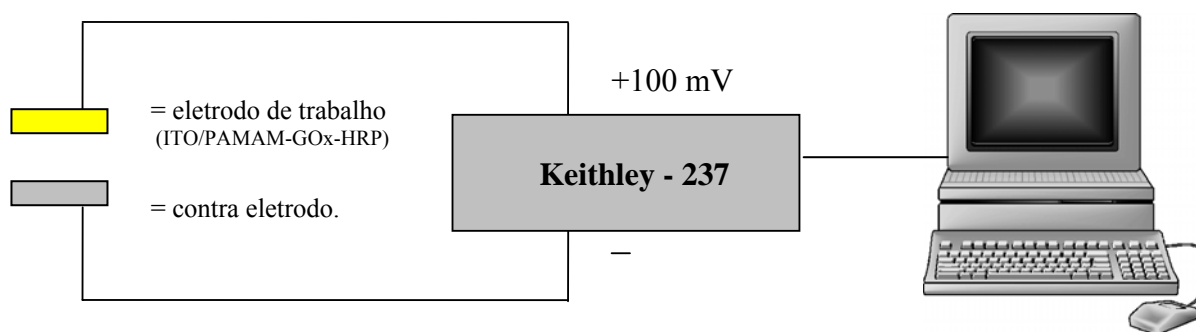
### 7.2.3 – Análise da performance do biossensor

Um biossensor é um dispositivo constituído de um elemento bioseletivo (enzima) e um transdutor capaz de converter uma reação bioquímica em um sinal elétrico. Nos biossensores a enzima está acoplada ao elemento transdutor através de uma heterojunção do tipo polímero-metal ou do tipo polímero-semicondutor. Assim, a resposta do biossensor depende do sinal elétrico resultante da reação bioquímica na interface da heterojunção.

Neste trabalho, o sinal do biossensor obtido ITO/PAMAM-GO<sub>x</sub>-HRP foi analisado em termos da medida da corrente gerada pela oxidação da glicose e peróxido de hidrogênio na interface PAMAM/ITO em concentrações de glicose a nível clínico. Uma tensão de 100 mV foi aplicada entre o eletrodo de trabalho.

A oxidação do peróxido de hidrogênio (devido à ação da enzima peroxidase) resultante da oxidação da molécula de glicose (pela ação da enzima glicose oxidase) gera um pico de corrente quando a reação é máxima, ou seja, quando todo peróxido de hidrogênio estiver oxidado. Neste sentido, a corrente máxima gerada na em função do tempo foi tomada como referência para construção de uma curva de calibração da corrente máxima gerada em cada concentração de glicose medida.

As medidas foram realizadas com o auxílio de um eletrômetro Keithley 237. A Figura 7.5 ilustra o esquema da configuração usada para medida do sinal do biossensor ITO/PAMAM-GO<sub>x</sub>-HRP.



**Figura 7.5** - Esquema da configuração usada para medição do sinal do biossensor ITO/PAMAM-GOx-HRP.

### 7.3 – Fundamentos das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho

#### 7.3.1 – Caracterização espectroscópica: UV-Vis, FTIR e $^1\text{H-NMR}$

O uso da interação de radiações eletromagnéticas com a matéria é uma elegante fonte de informação para a física e química experimental molecular. O levantamento de dados acerca das propriedades de absorção, transmissão, ou reflexão por parte de materiais utilizando-se de tal técnica, denomina-se espectroscopia.

A espectroscopia UV/Vis utiliza energia dos fótons na região do visível e ultravioleta do espectro eletromagnético. Nesta faixa de energia, as moléculas sofrem transições eletrônicas e moleculares. Através do máximo de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ), se é possível determinar a diferença de energia entre os orbitais moleculares de fronteira HOMO e LUMO do material a ser analisado bem como a concentração de substâncias.<sup>4</sup>

A espectroscopia no infravermelho é um outro tipo de espectroscopia de absorção. Como as demais técnicas de absorção, ela serve para identificar composição de um material. Esse tipo de espectroscopia baseia-se no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração que são

específicas. Dessa forma cada ligação presente na molécula absorve em um comprimento de onda. Correspondente às vibrações fundamentais da molécula. Uma técnica de análise mais rápida e eficaz para se colher informações de absorção no infravermelho, é a espectroscopia no infravermelho usando transformada de Fourier (FTIR). Em vez de se coletar os dados variando-se a frequência da radiação infravermelha (IR), a radiação IR com todos os comprimentos de onda da faixa usada é guiada através de um interferômetro tipo Michelson. Depois de passar pela amostra o sinal medido gera um interferograma. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resulta-se em um espectro idêntico ao da espectroscopia IR dispersiva convencional.<sup>5</sup>

Devida à abundância com que átomos de hidrogênio aparecem nos materiais orgânicos, a chamada ressonância magnética nuclear de prótons ou de hidrogênio (<sup>1</sup>HNMR) é muito usada na caracterização desses materiais. A técnica se baseia no fato do núcleo do átomo de hidrogênio possuir momento magnético diferente de zero. Os momentos magnéticos dos átomos podem se orientar em campos magnéticos sendo, esta orientação, dependente da energia dos núcleos bem como do campo magnético externo. Dessa forma, uma dada amostra vai apresentar absorção em vários valores de frequência. Cada valor correspondente a um certo tipo de átomo ao qual está ligado o hidrogênio.<sup>6</sup>

Além disso, na NMR, os átomos de hidrogênio podem interagir entre si dependendo da distância em que eles se encontram do material. Este fato é usado para estimar as distâncias entre dois elementos com os quais o hidrogênio se encontra ligado.<sup>6</sup>

### 7.3.2 – Caracterização elétrica

A caracterização elétrica de filmes finos quando realizada pelo método de duas pontas, trata-se de uma condutividade/resistividade através da superfície e não do corpo do material. Neste caso, a resistência de superfície  $R_s$  é definida como a relação entre uma tensão (V) e a corrente ( $I_s$ ) que flui entre os eletrodos configurados na Figura 7.6 de acordo com:<sup>7,8</sup>

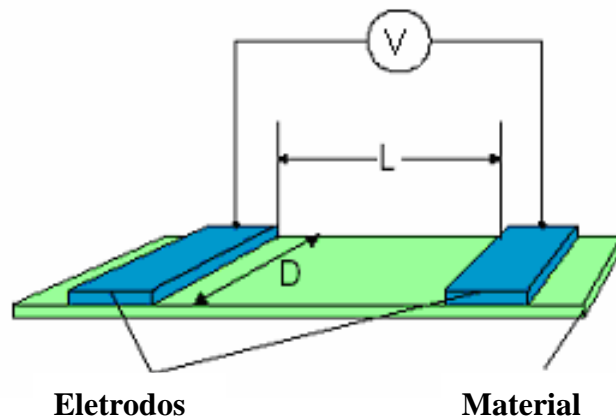
$$R_s = \frac{V}{I_s} \quad (7.1)$$

Já a resistividade superficial  $\rho_s$  é definida por:

$$\rho_s = \frac{D}{L} R_s . \quad (7.2)$$

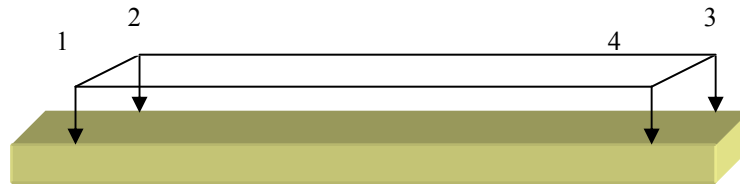
Logo,

$$\rho_s = \frac{D}{L} \cdot \frac{V}{I_s} \quad (7.3)$$



**Figura 7.6** - Montagem básica para medição da resistividade/condutividade superficial de um material.<sup>6</sup>

Um método interessante para obtenção da resistividade de filmes finos foi proposto por van der Pauw em 1958.<sup>9</sup> Trata-se do método dos quatro pontos. Quatro contatos são feitos na amostra, como ilustrado na Figura 7.7:



**Figura 7.7** - Configuração para caracterização 4 pontos.

Quando uma corrente ( $I_{12}$ ) flui pelos os contatos 1 e 2 a voltagem entre os contatos 3 e 4 ( $V_{34}$ ) pode ser monitorada. Alternado-se as medidas de corrente e de tensão entre os contatos, a resistividade é calculada como segue:

$$\rho = \frac{\pi \cdot d}{\ln 2} \left[ \frac{R_{12,34} + R_{23,41}}{2} \right] f \quad (7.4)$$

sendo  $d$  o comprimento da amostra e  $f$  uma função dependente da razão  $R_{12,34}/R_{23,41}$ .

A variação de  $f$  com os valores da resistência é a seguinte:

$$\frac{Q-1}{Q+1} = \frac{f}{\ln 2} \operatorname{arccosh} \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{\ln 2}{f} \right) \right], \text{ sendo } Q = \frac{R_{12,34}}{R_{23,41}} \quad (7.5)$$

A principal vantagem desta técnica é que apenas a espessura da amostra deve ser conhecida para o cálculo de sua resistividade.

Quando se deseja calcular a condutividade de corpo de um material usa-se o método das duas pontas. O método de caracterização elétrica de duas pontas é bastante comum e relativamente fácil de ser usado. Conhecendo-se as dimensões do material, torna-se fácil realizar a medida de sua resistividade e/ou condutividade. A



corrente  $I$  que passa através da amostra é monitorada quando se aplica uma diferença de potencial  $V$  entre seus extremos.<sup>10</sup> Dessa forma, a resistividade elétrica  $\rho$  é dada por:

$$R = \rho \frac{L}{A} \quad (7.6)$$

sendo  $R=V/I$  a resistência do material,  $L$  o comprimento da amostra e  $A$  a área de secção transversal.

Podemos também tratar da resistividade em termos da densidade de corrente  $\mathbf{j}$  e o campo elétrico  $\mathbf{E}$ , ambos sendo grandezas vetoriais. A densidade de corrente se define como:

$$\mathbf{j} = \frac{I}{A} \quad (7.7)$$

O campo elétrico é definido por:

$$E = \frac{V}{L} \quad (7.8)$$

Combinando as equações (7.6), (7.7) e (7.8) e usando  $R=V/I$ , obtemos:

$$\rho = \frac{E}{\mathbf{j}} \quad (7.9)$$

A condutividade elétrica  $\sigma$  de um material, é o inverso da sua resistividade, logo:

$$\sigma = \frac{\mathbf{j}}{E} \quad (7.10)$$

Para as equações descritas anteriormente, o material é considerado como sendo isotrópico (as propriedades elétricas são as mesmas em todas as direções), de secção reta uniforme e sujeito a um campo elétrico também uniforme. Só assim as equações anteriores são válidas.

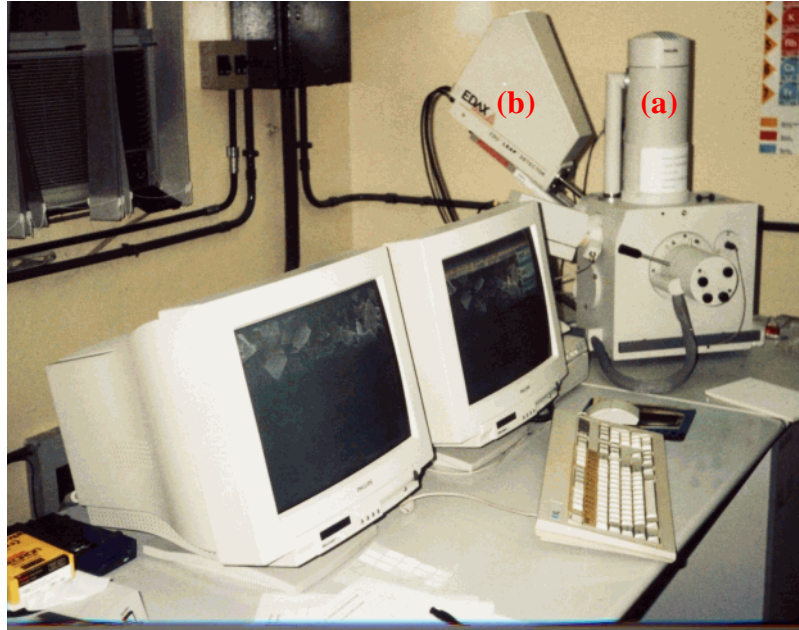
### 7.3.3 – Caracterização microestrutural: MEV e DRX

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica de caracterização que permite realizar a análise microestrutural de materiais sólidos. A imagem obtida em um microscópio eletrônico de varredura pode ser ampliada em até 300.000 vezes.

A técnica consiste na incidência de um feixe de elétrons de alta energia que varre a superfície da amostra. Na interação dos elétrons com a superfície da amostra, parte do feixe eletrônico sofre reflexão. Este sinal é coletado por um detector que o converte em uma imagem ERE (imagem de elétrons retroespalhados). Na interação, ainda ocorre a emissão de elétrons pela amostra (elétrons secundários), produzindo a imagem ES (imagem de elétrons secundários).<sup>12</sup>

O feixe eletrônico é controlado mediante uma diferença de potencial variável existente entre dois eletrodos. A voltagem variável permite a variação da aceleração dos elétrons, conseguindo assim, imagens mais ou menos profundas da amostra.

Ainda na interação do feixe de elétrons com a amostra, os elétrons mais externos dos átomos e os íons constituintes são excitados, mudando de níveis energéticos. Ao retornarem para seu nível energético inicial, eles liberam a energia adquirida, sendo emitida em comprimento de onda no espectro de raios-X. Um detector instalado na câmara de vácuo do MEV mede a energia associada ao decaimento energético. Como os elétrons de um determinado átomo possuem diferentes energias, é possível então determinar quais os elementos químicos estão presentes na amostra. Essa técnica é conhecida como espectroscopia de energia dispersiva (EDS), sendo um acessório essencial na caracterização da composição química de materiais. A Figura 7.8 mostra o microscópio MEV utilizado neste trabalho



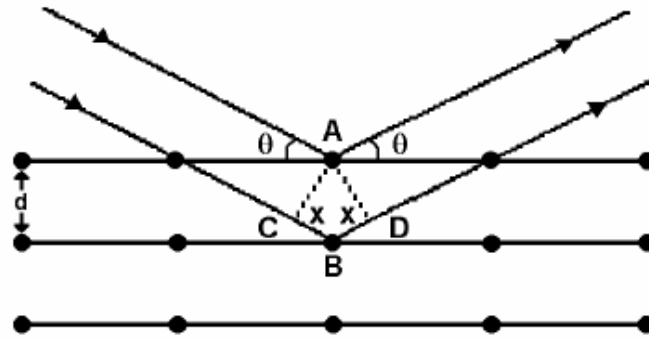
**Figura 7.8** - Aparelhagem utilizada para caracterização morfológica: Microscópio MEV (a) e EDS (b) (IPEN/USP).

A difratometria de raios-X (DRX) é uma técnica que permite a investigação da estrutura de um sólido. Esta técnica se baseia na difração que um feixe de raios-X sofre na interação com planos cristalográficos do material. A difração ocorre quando há interferência construtiva entre duas ou mais radiações eletromagnéticas, obedecendo à lei de Bragg:<sup>12</sup>

$$n\lambda = 2d\sin\theta, \quad (7.11)$$

sendo  $n$  um número inteiro de comprimentos de onda  $\lambda$  da radiação incidente,  $d$  a distância interplanar e  $\theta$  o ângulo de incidência dos raios-X com os planos cristalinos, conforme ilustra a Figura 7.9.

A difratometria de raios-X é usada principalmente para determinação da estrutura cristalina e orientação cristalográfica de um sólido a partir das posições angulares dos picos de difração gerados.



**Figura 7.9** - Condição para ocorrência da difração de raios-X.

#### 7.4 – Referências

- [1] Sawada, Y.; Kobayashi, C.; Seki, S.; Funakubo, H. Highly-conducting indium-tin-oxide transparent films fabricated by spray CVD using ethanol solution of indium (III) chloride and tin (II) chloride. *Thin Solid Films* **409** (1), p. 46-50, 2002.
- [2] Penza et. al. Characterization of transparent and conductive electrodes of indium tin oxide thin films by sequential reactive evaporation. *Thin Solid Films* **349** (1-2), p. 71-77, 1999.
- [3] Amando, J. Técnicas espectroscópicas em biofísica. *Caderno de física da UEFS*, **03** (01), p. 21-29, 2004.
- [4] De Queiroz, A.A.A.; Vargas, R.R.; Higa, O.Z.; Ribeiro, R.R.; Vitolo, M. Lactamide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, **85**, p. 767-777, 2002.
- [5] [http://en.wikipedia.org/wiki/UV/VIS\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/UV/VIS_spectroscopy). Acesso em 15/05/2006.
- [6] [http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared\\_spectroscopy](http://en.wikipedia.org/wiki/Infrared_spectroscopy). Acesso em 15/05/2006.

- [7] Maryniak, W.A.; Uehara, T.; Noras, M.A. Surface Resistivity and Surface *Application Note*, **1005**, p. 1-4, 2003.
- [8] Paasi, J. Surface resistance or surface resistivity? *Research Note*, p. 1-1, 2002.
- [9] van der Pauw, L. J. A Method of Measuring the Resistivity and Hall Coefficient on Lamellae of Arbitrary Shape. *Philips Technical Review*, **20**, p. 220-224, 1959.
- [10] Giroto, E.M.; Santos, I.A.; Medidas de resistividade elétrica *dc* em sólidos: como efetuá-las corretamente. *Química Nova*, **25**, (4), p. 639-647, 2002.
- [11] MALISKA, A. M. Microscopia eletrônica de Varredura e Microanálise. Disponível em: [http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-EV/MEV\\_Apostila.pdf](http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-EV/MEV_Apostila.pdf). Acesso em 15/05/2006.
- [12] Callister Jr., W.D. *Ciência e Engenharia de Materiais: uma Introdução*. LTC Editora. 2000.
- [13] [http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular\\_modeling](http://en.wikipedia.org/wiki/Molecular_modeling) Acesso em 15/05/2006.

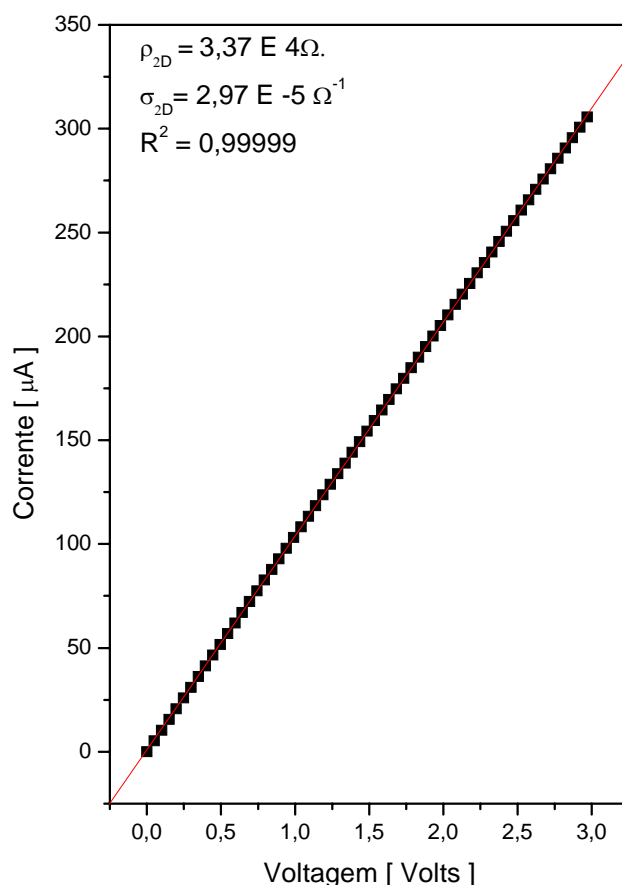
## Capítulo 8 – Resultados e discussão

### 8.1 – Caracterização dos filmes de ITO

#### 8.1.1 - Estudo da condutividade elétrica

A condutividade do eletrodo no qual as enzimas são depositadas é de fundamental importância no projeto de biossensores. Dessa forma, as características I(V) do filme de ITO constituem informação essencial para a resposta do biossensor.

A Figura 8.1 mostra o comportamento da corrente I em função da diferença de potencial V aplicada para o filme de óxido de índio dopado com 11,5% de estanho (ITO) depositado em vidro.



**Figura 8.1** - Comportamento I(V) do filme de ITO depositado em vidro obtido neste trabalho. Temperatura: 25 °C.

A resistividade 2D encontrada, (calculada a partir da equação 7.3) é  $\rho_{2D} = 3,37.10^4 \Omega$ . Já a resistividade calculada a partir do método de quatro pontos encontrada foi de  $\rho = 2,3.10^{-4} \pm 0,00002 \Omega.cm$ . Uma vez que óxidos são em geral materiais isolantes, a baixa resistividade elétrica encontrada em filmes de ITO é atribuída à alta concentração de portadores de carga e à localização do nível de Fermi acima da banda de condução. A presença de buracos duplamente carregados quando há falta de oxigênio, juntamente com a presença do íon substituinte  $Sn^{+4}$  leva a formação de um semicondutor degenerado.

De acordo com Fan e Goodenough,<sup>1,2</sup> a banda de condução (Bc) do  $In_2O_3$ , é formada principalmente por elétrons 5s provenientes do índio e a banda de valência é devida à presença de elétrons 2p provindos do oxigênio duplamente carregado ( $O^{2-}$ ). A falta de oxigênio origina estados doadores abaixo da banda de condução liberando dois elétrons por vacância de oxigênio, de acordo com a equação:

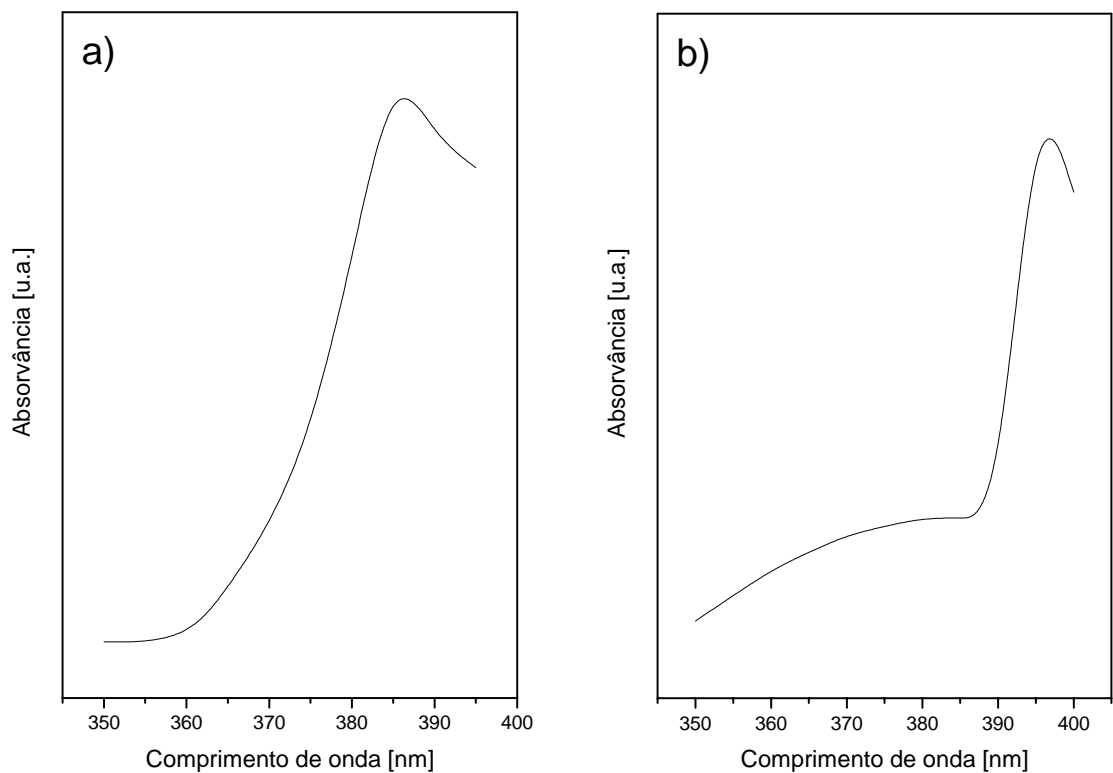


Estados doadores também são formados abaixo da banda de condução 5s ou 5p pela substituição do íon  $In^{+3}$  pelo íon  $Sn^{+4}$ . Estes dois efeitos contribuem para aumentar o número de portadores de carga e conseqüentemente a condução do ITO, como é observado na Figura 8.1.

### 8.1.2 – Caracterização espectroscópica (UV-Vis)

A espectroscópica UV-Vis pode ser utilizada na estimativa do band gap de filmes finos transparentes, tais como filmes de ITO. O band gap, diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução, nos fornece informação acerca da classificação do material como condutor, isolante ou semicondutor.

Os espectros de absorção UV-Vis dos filmes de óxido de índio ( $\text{In}_2\text{O}_3$ ) puro e óxido de índio dopado com 11,5% de estanho ( $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$ ), obtidos neste trabalho são mostrados na Figura 8.2 (a e b), respectivamente. Observa-se um máximo de absorção em 386 nm (Figura 8.2 a) no espectro do óxido de índio e 396 nm (Figura 8.2 b) no espectro do óxido de índio dopado com 11,5% de estanho.



**Figura 8.2** - Espectros de absorção UV-Vis para o óxido de índio (a) e para o ITO (b).

A energia associada ao band gap  $E_g$  é obtida do espectro de absorbância e calculada pela equação:<sup>3</sup>

$$E_g = \frac{hc}{\lambda_{\max}}, \quad (8.2)$$



sendo  $h$  a constante de Planck,  $c$  a velocidade da luz e  $\lambda_{\max}$  o comprimento de onda de máxima observância no espectro. A tabela 3 mostra as propriedades eletroópticas dos filmes finos obtidos.

**Tabela 2** - Propriedades eletroópticas dos filmes de  $\text{In}_2\text{O}_3$  e  $\text{In}_2\text{O}_3:\text{Sn}$  obtidos. Os resultados estão de acordo com a literatura.<sup>1-5</sup>

| <i>Material</i>                                 | <i>% Sn<sup>+4</sup></i> | <i>Band Gap</i> | <i><math>\rho</math> (<math>\Omega\text{cm}</math>)</i> |
|---|--------------------------|-----------------|---|
| <i><math>\text{In}_2\text{O}_3</math></i>       | <i>0</i>                 | <i>3,21</i>     | <i><math>5,6 \cdot 10^{-4}</math></i>                   |
| <i><math>\text{In}_2\text{O}_3</math> (ITO)</i> | <i>11,5</i>              | <i>3,13</i>     | <i><math>2,3 \cdot 10^{-4}</math></i>                   |

O baixo band gap, típico de materiais semicondutores, deve-se ao fato de a falta de oxigênio na rede do óxido de índio criar estados doadores abaixo da banda de condução, como já exposto no item 8.1.1. No caso do ITO, além da falta de oxigênio, a substituição do íon  $\text{In}^{+3}$  pelo íon  $\text{Sn}^{+4}$  na rede também poderia originar estados doadores, o que explicaria a diminuição da energia band gap em 0,08 eV.

### 8.1.3 - Análise Microestrutural (MEV, DRX)

A morfologia de filmes finos de ITO desempenha papel importante nas propriedades elétricas do filme. Uma porosidade elevada levaria o material a apresentar efeitos capacitivos, fato que comprometeria em muito as propriedades elétricas do filme formado. Além disso, um material poroso para a imobilização do conjugado PAMAM/GOx-HRP levaria as enzimas a uma retenção dentro dos poros do material. Isto causaria a necessidade de um certo tempo para a difusão do analito para dentro do filme e um tempo para a difusão dos produtos da reação catalisada

enzimaticamente para fora do filme de ITO, o que comprometeria o tempo de resposta do biossensor.

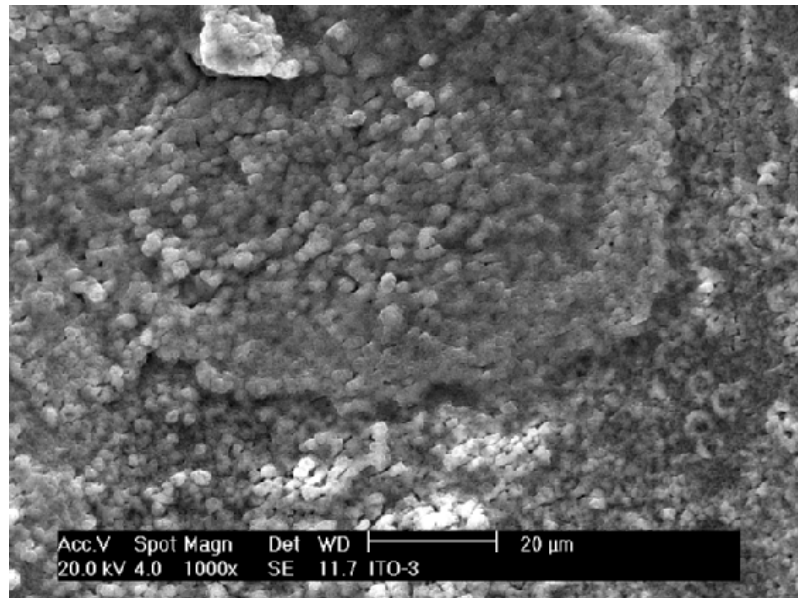
Na Figura 8.3 é apresentada a imagem típica de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes de ITO depositados em substrato de vidro. A imagem revela a formação de material com contorno de grão bem definido, revelando a natureza policristalina do material formado. O tamanho médio dos grãos é da ordem de  $400 \cdot 10^{-9}$ , o que evidencia a estrutura nanométrica do material obtido.

A estrutura cristalina de um sólido se refere ao conjunto de propriedades que irão resultar na forma como estão espacialmente ordenados os átomos ou moléculas que o constituem. Levantamento de dados acerca da estrutura cristalina de filmes de ITO se torna importante, pois é esperado, que o estanho atue apenas com dopante do material, não afetando assim a rede cristalina do óxido de índio. O  $\text{SnO}_2$  e o  $\text{In}_2\text{O}_3$  são materiais com distintas propriedades, sendo o primeiro mais resistivo. A princípio, a presença de estanho na rede do óxido de índio aumenta sua condutividade. Porém, uma alta concentração de estanho, altera as propriedades elétricas e ópticas dos filmes de ITO.

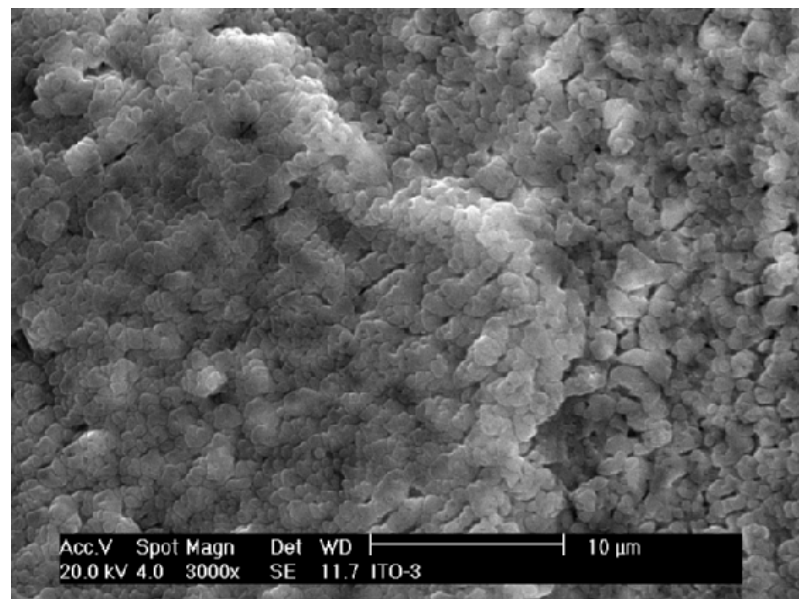
O difratograma de raios-X dos filmes de ITO depositados em substrato de vidro é apresentado na Figura 8.4. Em azul tem-se o difratograma do óxido de índio puro depositado em vidro e em verde está representado o difratograma do óxido de índio dopado com 11,5 % de estanho. Na Figura 8.4 os picos apresentados são referentes ao pó de óxido de índio para efeito de comparação.

O difratograma indica que os filmes de ITO são policristalinos e cristalizam e em uma estrutura cúbica de bixbyita do  $\text{In}_2\text{O}_3$  (ilustrada na Figura em 8.4).<sup>6</sup> A presença dos picos (222) e (400) típicos de uma estrutura cúbica, estão fortemente evidenciados no difratograma.<sup>6,7</sup> Observa-se que não há formação de óxido estanho

( $\text{SnO}_2$ ) já que, em nenhum ângulo, a lei de Bragg foi satisfeita para esse material. A orientação preferida de crescimento dos filmes de ITO de acordo com o difratograma é o plano (222), sendo esta orientação dependente da temperatura de deposição.<sup>6-8</sup>

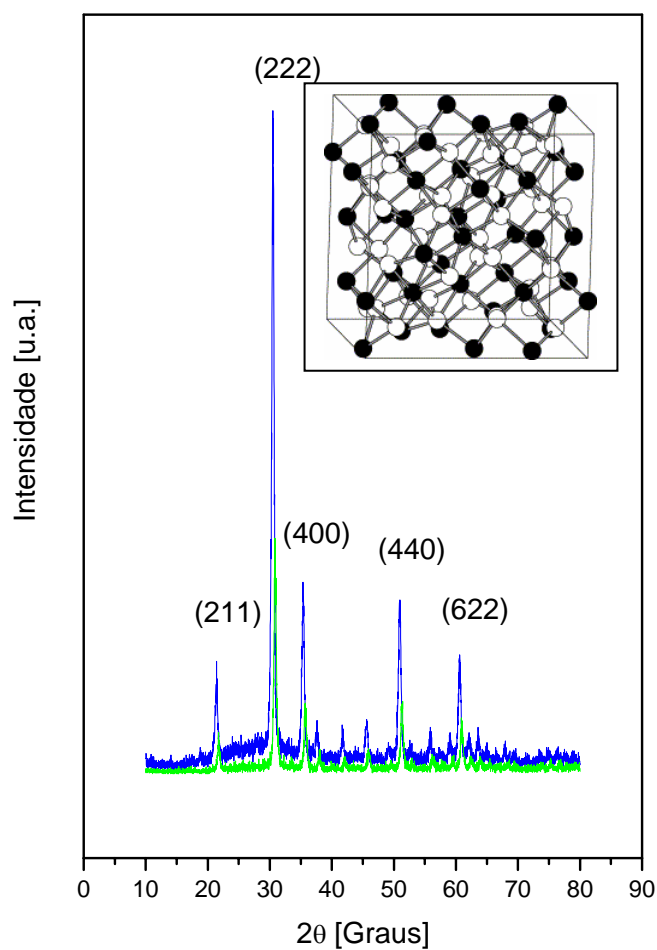


(a)



(b)

**Figura 8.3** - Imagem típica de MEV da superfície dos filmes de ITO depositados em substrato de vidro: (a) ampliação de 1000 vezes e (b) 3000 vezes.



**Figura 8.4** - Difratoograma de raios-X de um dos filmes obtido. Em Azul In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e verde In<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Sn. No fundo está representação de uma estrutura cúbica de bixbyita. A esferas negras representam os átomos de índio e as brancas os átomos de oxigênio.

## 8.2 - Caracterização do dendrímero PAMAM

### 8.2.1 – Cromatografia de permeação em gel

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 não apresentam as propriedades mecânicas desejáveis para a área médica enquanto que os de peso molecular muito elevado são muito pouco solúveis e geralmente, não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular. Esta técnica de separação foi introduzida por Moore em 1964 para a determinação da distribuição de pesos moleculares de um polímero.<sup>9</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  $V_o$  e o volume do poro acessível no gel, ou seja:

$$V_R = V_o + K_D V_i \quad (8.3)$$

sendo  $V_i$  o volume interno total do poro e  $K_D$  é o coeficiente de partição entre  $V_i$  e a porção acessível para um dado soluto.

Quando  $K_D = 0$  (moléculas grandes)  $V_R = V_o$ , 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. Esta técnica está limitada a moléculas onde  $V_R \leq V_o$  ou,  $V_R \geq V_o + V_i$ .

Uma vez que o peso molecular de um polímero determinado por GPC não representa o seu valor absoluto sendo neste caso, um valor obtido com base em uma curva de calibração de polímeros de conhecidos pesos moleculares, podemos escrever:

$$\log[\eta]_s M_s = \log[\eta]_u M_u \quad (8.4)$$

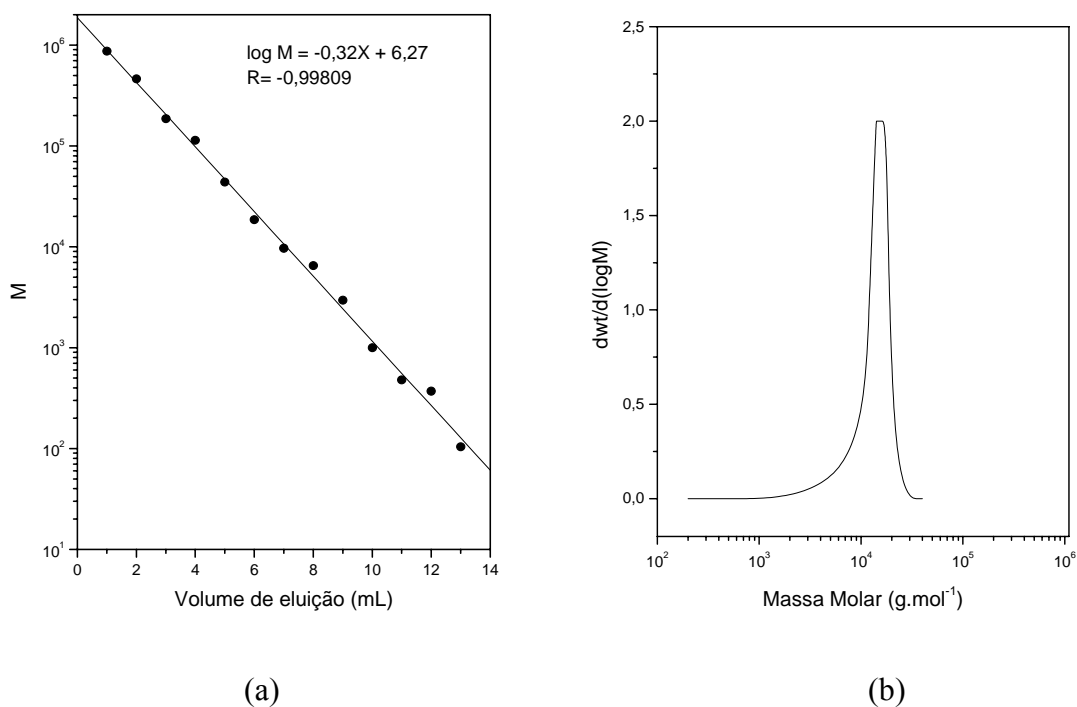
sendo  $[\eta]$  e  $M$  a viscosidade intrínseca e a massa molar do polímero, respectivamente. Os índices  $s$  e  $u$  representam, respectivamente, o padrão e a amostra em análise.

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>10</sup>

$$\log M_u = \frac{1}{1 + v_u} \cdot \log \left[ \frac{K_s}{K_u} \right] + \frac{1 + v_s}{1 + v_u} \log M_s \quad (8.5)$$

Freqüentemente as curvas de calibração são construídas a partir de poliestireno (PS) ou poli(etileno glicol) (PEG) sendo conhecidos o peso molecular 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

A Figura 8.5 mostra a análise por GPC do dendrímero PAMAM de geração 4 (G4) obtido neste trabalho. A presença de um pico bem definido confirma a pureza do dendrímero obtido. Ao mesmo tempo, podem ser observados na Figura 8.5 uma distribuição de peso molecular monomodal e um baixo índice de dispersão no peso molecular ( $M_w/M_n = 1,15$ ); o que confirma a estrutura dendrítica da macromolécula PAMAM G4.



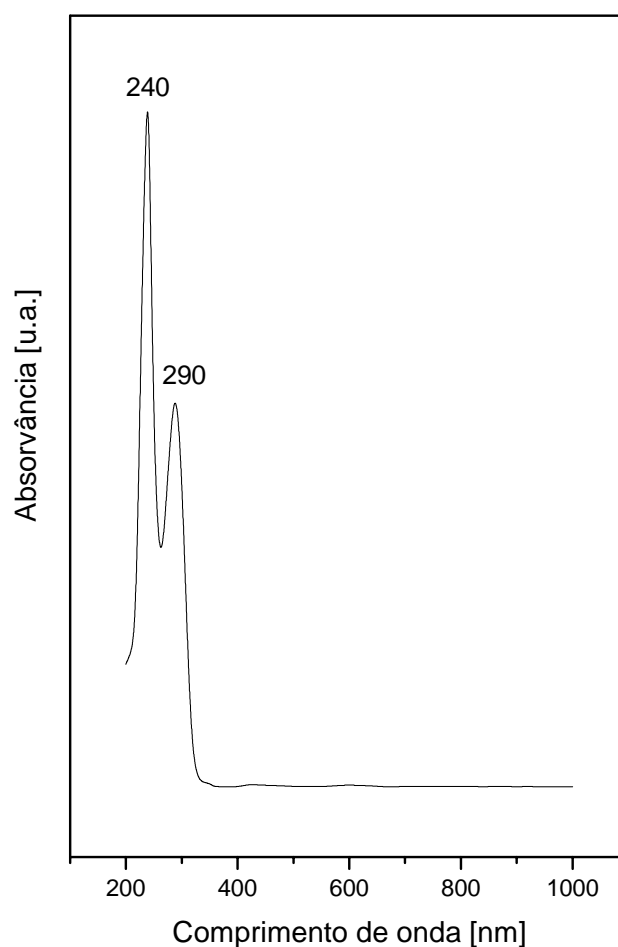
**Figura 8.5** - Curva de calibração (a) e análise por GPC (b) do PAMAM G4 obtido neste trabalho.

### 8.2.2 – Caracterização espectroscópica (FTIR, UV-Vis, $^1\text{H-NMR}$ )

As observações ópticas estão relacionadas à transição eletrônica que ocorre por absorção de fótons por parte do material. Um espectro de absorção será, portanto, composto por um conjunto de bandas associadas às diversas transições vibracionais e rotacionais possíveis dos dois estados eletrônicos envolvidos na transição e dependerá das regras de seleção espectroscópicas válidas para cada caso.

Na Figura 8.6 é mostrado o espectro de absorção na região UV-Vis característico de dendrímero PAMAM de geração 4. O espectro exibiu dois máximos de absorção; 240 nm e 290 nm. A absorção máxima em 240 nm está associada a transições  $\pi-\pi^*$ , separação entre a diferença de energia entre os orbitais moleculares de fronteira HOMO (orbital molecular mais alto ocupado) e LUMO (orbital

molecular mais baixo desocupado) da molécula de PAMAM G4. A banda de absorção em 290 nm corresponde à diferença de energia HOMO-LUMO de grupos carbonila (grupo funcional constituído de um átomo de carbono e um átomo de oxigênio) provenientes dos grupamentos amida da molécula de PAMAM.<sup>11</sup>

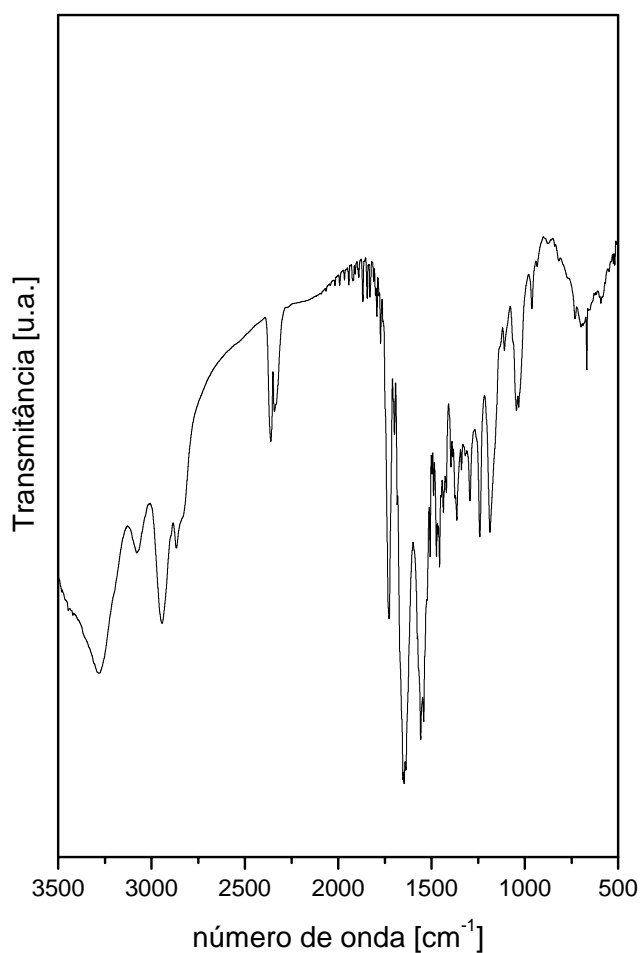


**Figura 8.6** - Espectro UV-Vis do dendrímero PAMAM (G4).

A Figura 8.7 apresenta o espectro FTIR para o dendrímero PAMAM G4 entre 3500 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas de absorção em 3282  $\text{cm}^{-1}$  e 1647  $\text{cm}^{-1}$  caracterizam as



freqüências vibracionais características das aminas primárias existentes na periferia do dendrímero PAMAM. A banda de absorção a  $3070\text{ cm}^{-1}$  é característico da banda de amida II e é representativa do processo de síntese dendrítica divergente. As bandas de absorção a  $2862\text{ cm}^{-1}$  e  $2935\text{ cm}^{-1}$  representam as vibrações do grupo  $\text{CH}_2$ , antissimétrico e simétrico, respectivamente.

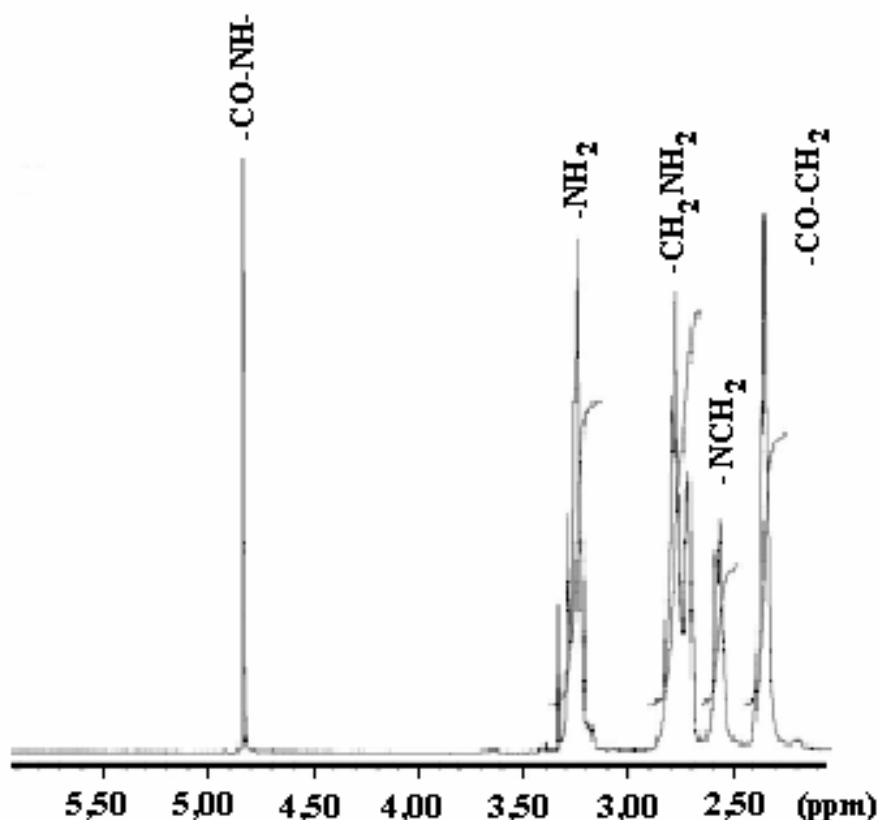


**Figura 8.7** - Espectro FTIR do dendrímero PAMAM (G4).

A análise de estruturas dendríticas continua sendo um problema relativamente complexo uma vez que grandes números de possíveis erros estruturais podem estar

presentes no polímero. O maior problema na síntese de dendrímeros PAMAM via rota de síntese de Michael envolve o aparecimento de estruturas não simétricas bem como as reações secundárias de ciclização intramoleculares devido à presença de muitos grupos funcionais na periferia do dendrímero.

Na Figura 8.8 é mostrado o espectro de ressonância magnética nuclear de prótons ( $^1\text{H-NMR}$ ) do dendrímero PAMAM G4 em  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Os picos de aminas primárias, secundárias e terciárias bem como os picos correspondentes a carbonila do monômero metacrilato de metila, característicos de um dendrímero PAMAM G4 sintetizado via reação de Michael, são claramente observadas no espectro e estão em boa concordância com os dados observados na literatura.<sup>12</sup>



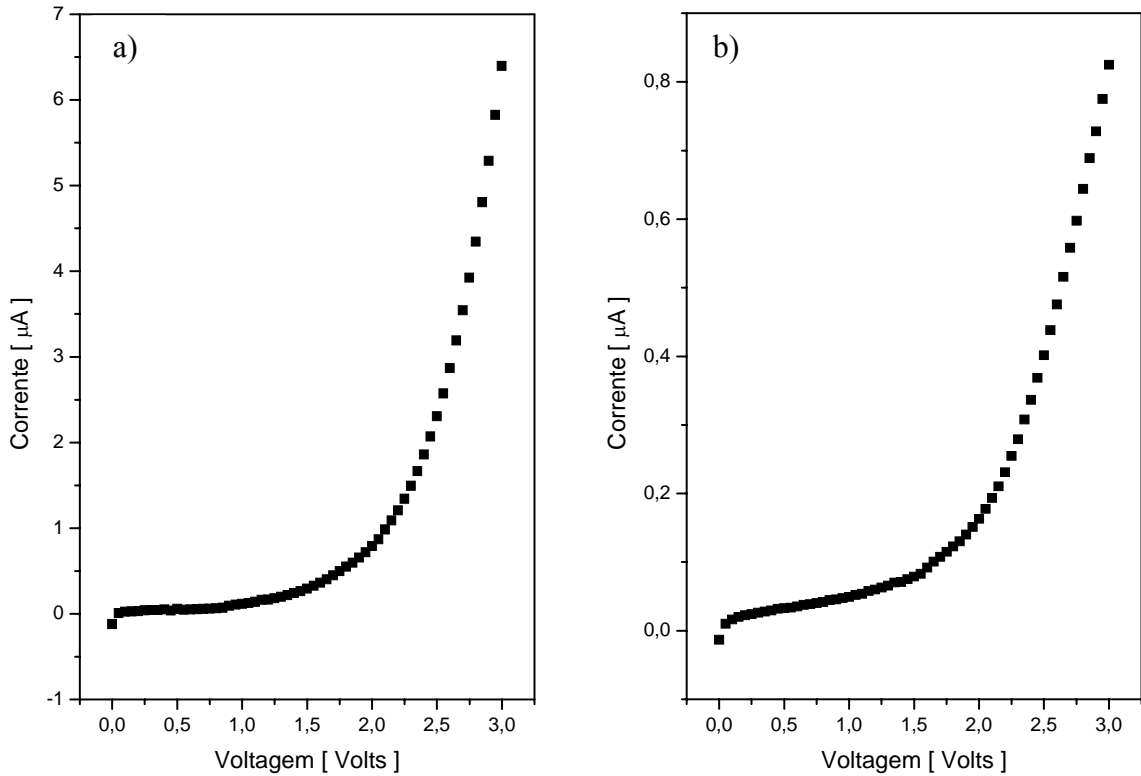
**Figura 8.8** - Espectro  $^1\text{H-NMR}$  do dendrímero PAMAM G4 em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### 8.2.3 - Estudo da condutividade elétrica

O sinal do biossensor proposto corresponde à geração de uma corrente devido à oxidação da molécula de glicose e peróxido de hidrogênio, pela ação das enzimas glicose oxidase e peroxidase, respectivamente. Estas enzimas, por sua vez, encontram-se imobilizadas no dendrímero PAMAM (G4). Dessa forma, o sinal (corrente) do biossensor, depende do fluxo de elétrons através da estrutura dendrítica.

O monitoramento da corrente em função da tensão aplicada em um material, auxilia na elucidação de suas propriedades elétricas. Na caracterização elétrica torna-se necessário um contato ôhmico com a amostra, uma vez que o contato direto do eletrodo com amostra pode gerar efeitos capacitivos, o que pode levar a resultados inexatos. Neste sentido, o dendrímero PAMAM foi depositado em eletrodos metálicos (Al) de baixa resistividade por evaporação do solvente.

O comportamento elétrico da heterojunção PAMAM/Al é apresentado na Figura 8.9. Em (a) tem-se o comportamento elétrico para um dendrímero PAMAM de geração 0 (G0) e em (b), é apresentado o comportamento elétrico do dendrímero PAMAM de geração 4 (G4). Observa-se a existência de uma barreira de potencial a ser vencida para que o processo de condução se inicie, sendo um dendrímero de menor geração (G0), menos resistivo que um dendrímero de elevadas gerações (G4).



**Figura 8.9** - Comportamento elétrico  $I(V)$  da heterojunção PAMAM/Al: PAMAM G0 (a) e PAMAM G1 (b).

A baixa condutividade observada na curva  $I(V)$  da Figura 8.9 (b) pode estar associada ao elevado número de geração do dendrímero (G4). Como descrito no capítulo 4, o processo de condução eletrônica em macromoléculas dendríticas ocorre por meio do acoplamento eletrônico ( $A$ ) entre as regiões doadoras ( $V_{Di}$ ) eceptoras de elétrons ( $V_{Aj}$ ) existentes na macromolécula, convenientemente descritas pela função de Green ( $G$ ):<sup>13-15</sup>

$$A = \sum_{ij} V_{Di} G_{ij} V_{jA} \quad (8.3)$$

O número de gerações faz com que a função de Green decaia, confinando as funções de onda do elétron no núcleo do dendrímero. Esse fato faz do dendrímero

PAMAM de altas gerações se apresentar menos condutivo na interface com o metal. Assim, a densidade de estados eletrônicos e o número de gerações são inversamente proporcionais, o que justificaria a baixa condutividade elétrica observada. A Figura 8.10 ilustra a condutividade elétrica do dendrímero PAMAM G4 em função da temperatura segundo o modelo de Arrhenius (a) e Mott (b).

A dependência entre a condutividade e a temperatura para o PAMAM pode ser descrita pelo modelo de Arrhenius, através de:<sup>16,17</sup>

$$\sigma = \sigma_0 e^{-\frac{E_a}{K_B T}} \quad (8.4)$$

sendo  $K_B$  a constante de Boltzmann e  $E_a$  a energia de ativação para o processo de condução.

A energia de ativação,  $E_a = -d \ln \sigma / d(K_B T)^{-1}$ , calculada segundo o modelo de Arrhenius é igual a  $75,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$  ( $7,8 \text{ eV}$ ). Neste caso, admitindo-se o modelo de condução por saltos (*hopping*), os portadores de carga no PAMAM G4 encontram uma barreira de potencial elevada, em concordância com os resultados previstos pela função de Green (Equação 8.3).

A análise da condutividade do PAMAM G4 em função da temperatura pode também ser analisada pelo modelo de Mott, descrito pela equação:<sup>15,16</sup>

$$\sigma = \sigma_0 \exp \left[ - \left( \frac{T_M}{T} \right)^\gamma \right] \quad (8.5)$$

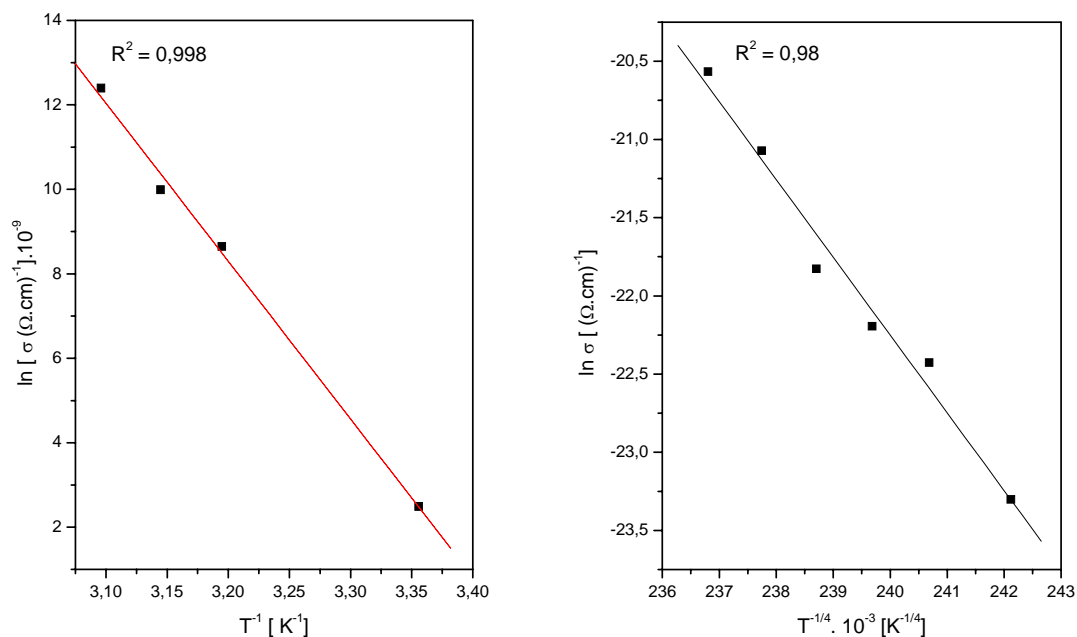
sendo  $\gamma=1/4$ . A constante associada ao decaimento exponencial dos estados localizados e a densidade de estados no nível de Fermi (temperatura de Mott) é dada por:

$$T_M = 16/K_B N(E_F) L^3 \quad (8.6)$$

sendo  $\sigma_0$  a condutividade para  $T \rightarrow \infty$ ,  $T$  a temperatura absoluta,  $\gamma$  um coeficiente numérico cujo valor para um sistema com 3 dimensões é  $4^{-1}$ ,  $K_a$  constante de Boltzmann,  $N(E_F)$  a densidade de estados no nível de Fermi e  $L$  o comprimento da localização eletrônica.

A temperatura de Mott ( $T_M$ ) calculada a partir da Equação (9.5) é de 4,72 K. O valor obtido para  $T_M$  indica uma resistência ao tunelamento dos elétrons do núcleo do dendrímero à sua superfície. O número de estados no nível de Fermi ( $N$ ) estimado é de aproximadamente  $4,23 \cdot 10^{17}$ . Uma vez que a barreira coulombiana ( $B_C$ ) associado ao mecanismo de condução é proporcional à densidade de estados no nível de Fermi ( $B_C \propto N(E_F)$ ), o valor obtido neste trabalho está em boa concordância com a dependência da resistividade do dendrímero e o seu número de gerações.

Observa-se ainda que a condutividade elétrica do PAMAM aumenta linearmente com o aumento da temperatura para intervalos de 291 a 323 K sugerindo que o mecanismo de condução é termicamente ativado. Os resultados obtidos indicam também que as propriedades condutoras do PAMAM dependem significativamente de seu número de gerações.



**Figura 8.10** - Dependência da condutividade do PAMAM G4 com  $T^{-1/2}$  (a) e  $T^{-1/4}$  (b). Intervalo de temperatura estudado: 291-323 K a 1 atm.

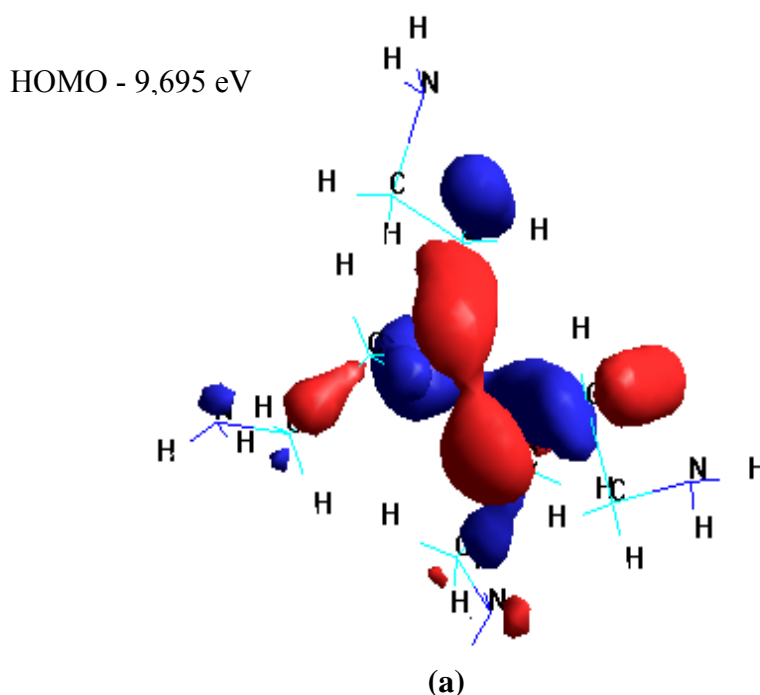
### 8.2.3 – Modelagem Molecular

Como já citado, a performance do biossensor é dependente do fluxo de elétrons do dendrímero para o eletrodo de ITO. Neste caso, a estrutura molecular do dendrímero pode exercer uma influência significativa no fluxo eletrônico. A fim de compreender as propriedades elétricas do dendrímero PAMAM, a modelagem molecular ao nível dos orbitais moleculares de fronteira, bem como a distribuição de cargas ao longo da molécula podem ajudar a desvendar as propriedades de transporte nesse tipo de material.

As Figuras 8.11 e 8.12 representam a distribuição espacial dos orbitais de fronteira (HOMO-LUMO) e suas energias para uma dendrímero PAMAM G0 e G1, respectivamente. Em azul, está representado a parte negativa da função de onda e em vermelho a parte positiva. A diferença de energia entre os orbitais de fronteira

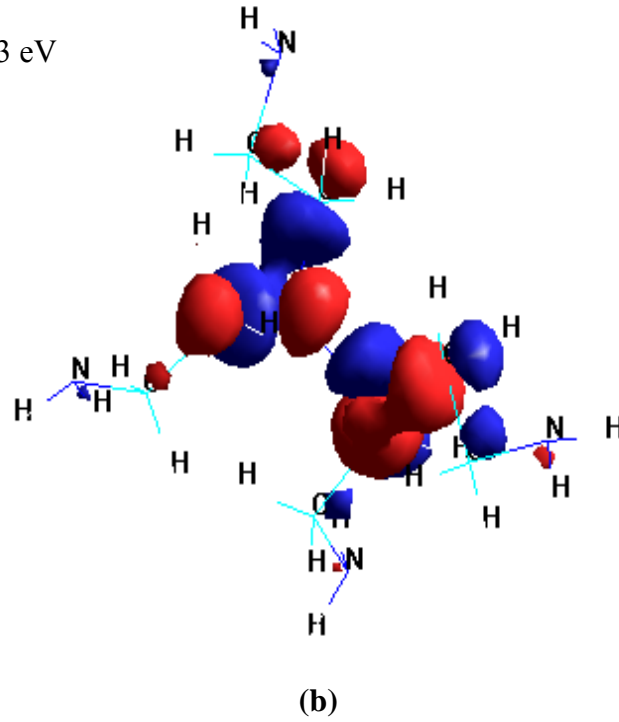
(HOMO-LUMO) pode contribuir para a compreensão das propriedades elétricas de um material. Em uma primeira aproximação, esta diferença de energia representa para moléculas orgânicas, o que o band gap representa para semicondutores inorgânicos, correspondendo o HOMO à banda de valência e o orbital LUMO à banda de condução.

O band gap para o dendrímero de geração 0 é menor que o gap do dendrímero de geração 1, 7,772 eV e 7,981 eV, respectivamente. Este resultado teórico está em boa concordância com os resultados experimentais obtidos neste trabalho, evidenciando que dendrímeros de baixas gerações possuem uma maior condutividade, em virtude do seu baixo gap relativamente a dendrímeros de gerações mais altas.



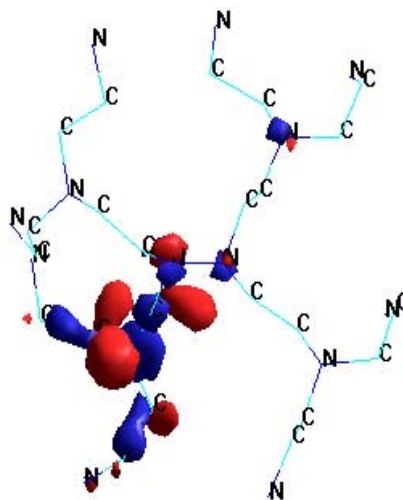


LUMO - 1,923 eV

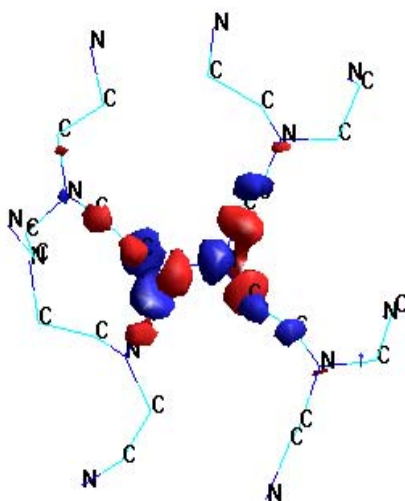


**Figura 8.11** - Distribuição espacial dos orbitais de fronteira do PAMAM G0: HOMO (a) e LUMO (b).

HOMO -9,555 eV

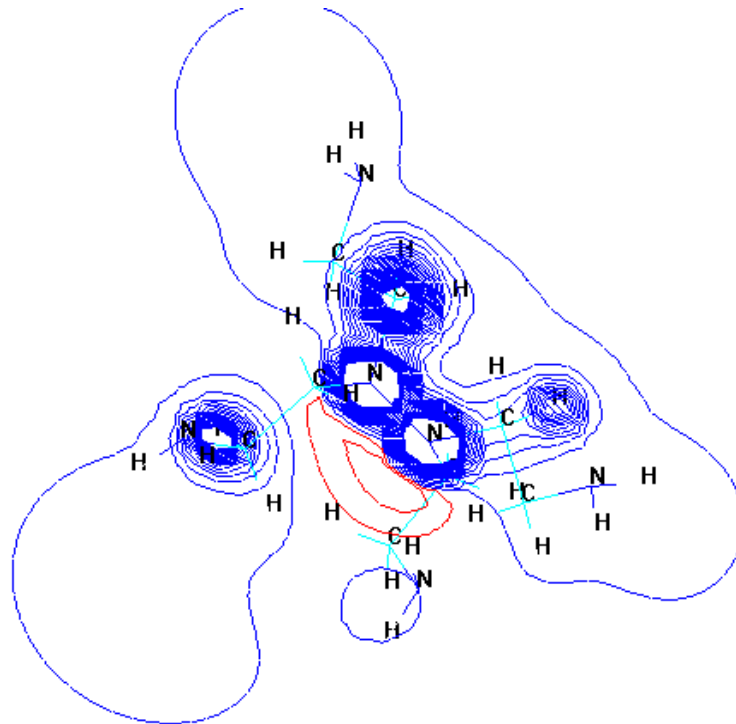


LUMO 1,574 eV

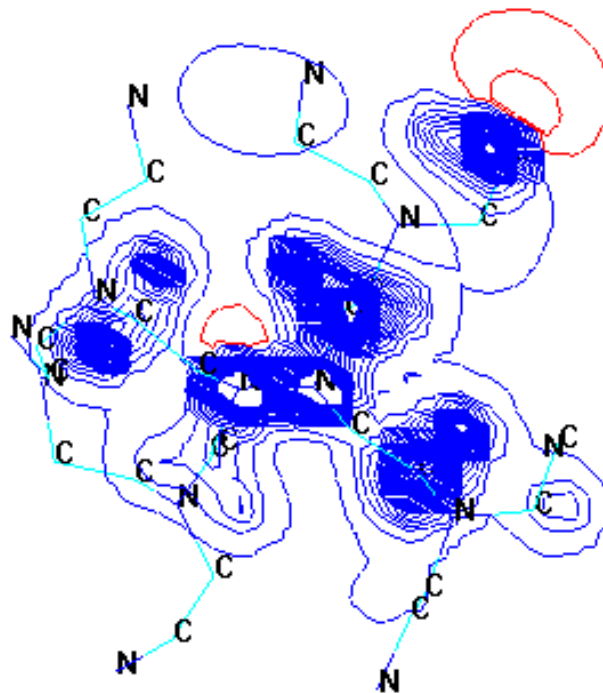


**Figura 8.12** - Distribuição espacial dos orbitais de fronteira do PAMAM G1: HOMO (a) e LUMO (b).

O potencial eletrostático exprime a medida do nível de energia potencial associada a partículas carregadas. Os potenciais eletrostáticos, para o dendrímero PAMAM G0 e G1 são mostrados nas Figuras 8.11 e 8.12, respectivamente. Existe uma maior concentração de cargas na região do núcleo do dendrímero. A concentração de carga no núcleo do dendrímero aumenta com o número de geração do dendrímero, o que evidencia que há uma barreira potencial elevada para a transferência eletrônica do núcleo à superfície do dendrímero, sendo esta barreira tanto maior quanto maior for a geração do dendrímero PAMAM. Esta observação está de acordo com a diferença de energia entre os orbitais de fronteira HOMO-LUMO como explicado anteriormente e com os resultados experimentais referentes à condutividade observados na Figura 8.9 da seção 8.2.3.



**Figura 8.13** - Potencial eletrostático para o PAMAM G0.

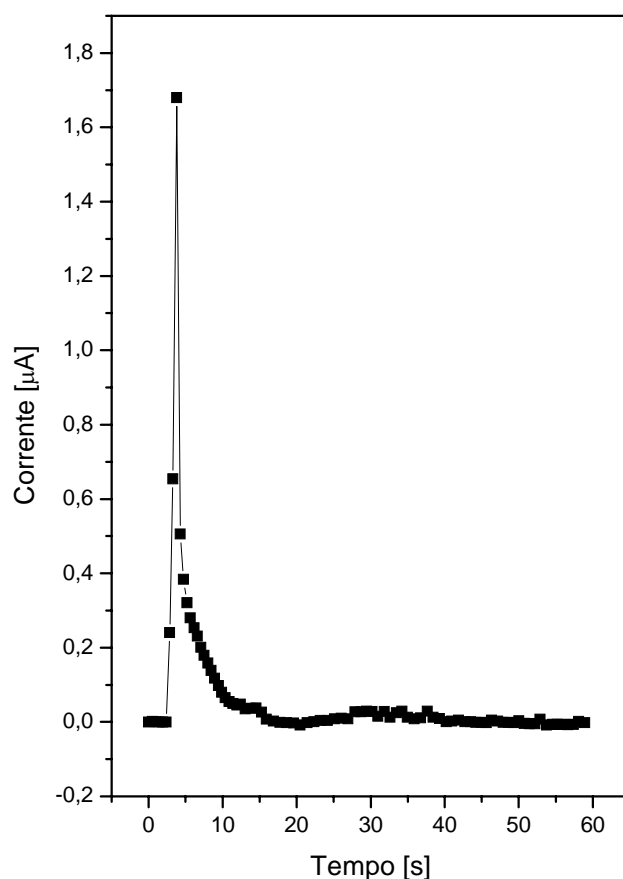


**Figura 8.14** - Potencial eletrostático para o PAMAM G1.

### 8.3 - Performance do Biossensor

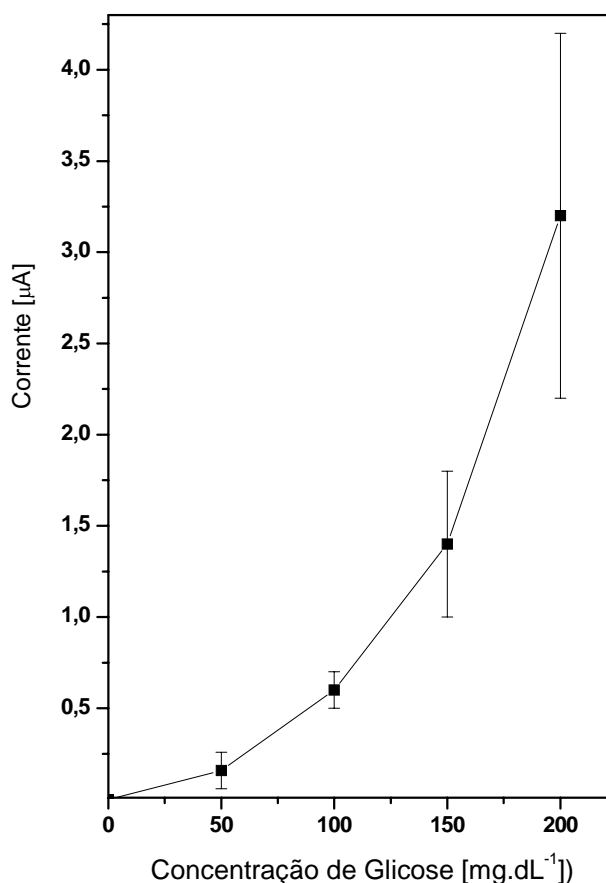
Sendo um biossensor um dispositivo quantificador de substâncias, é esperado que todo dispositivo biossensor apresente boa sensibilidade frente ao analito a ser determinado. Além de sensível, é esperado também que um biossensor seja relativamente rápido quanto à monitoração do analito.

Uma análise *in vitro* do comportamento do biossensor obtido neste trabalho foi realizada frente à concentração de glicose. A Figura 8.15 mostra a resposta do biossensor ITO/PAMAM-GOx-HRP desenvolvido para uma solução de glicose a uma concentração de 100 mg.dL<sup>-1</sup>.

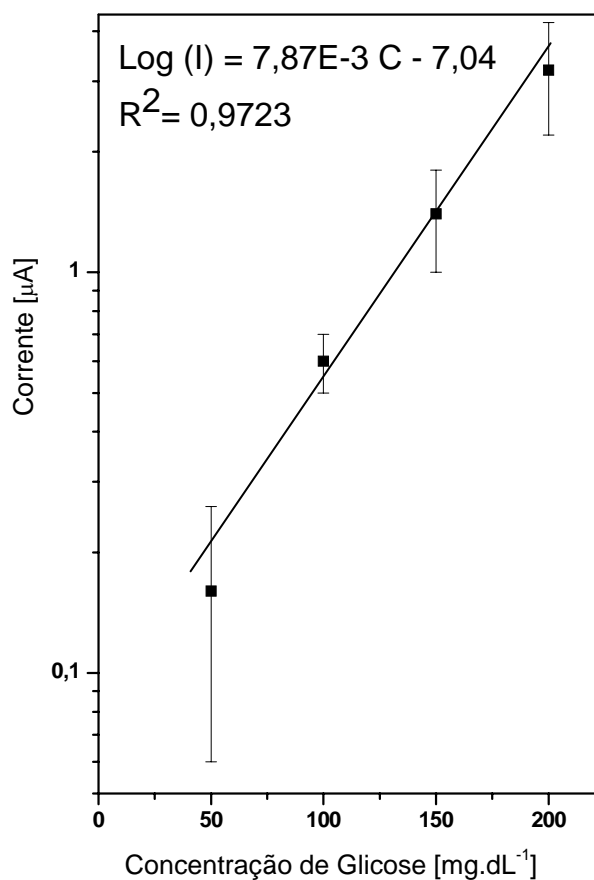


**Figura 8.15** - Resposta do biossensor amperométrico ITO/PAMAM-GOx-HRP em função do tempo. Concentração de glicose 100 mg.dL<sup>-1</sup>.

Foi utilizado como parâmetro de resposta do biossensor a intensidade máxima da corrente produzida no eletrodo ITO/PAMAM-GOx-HRP pela reação catalisada enzimaticamente. Observa-se em 8.15 que a resposta do biossensor é aproximadamente 5 segundos. A resposta do biossensor ITO/PAMAM-GOx-HRP frente a diferentes concentrações de glicose é mostrado na Figura 8.16. Na Figura 8.17 é apresentada a linearização do mesmo sinal.



**Figura 8.16** - Resposta do biossensor ITO/PAMAM-GOx-HRP em função da concentração de glicose a um potencial anódico de 100 mV aplicado no eletrodo de trabalho.



**Figura 8.17** - Linearização da resposta do biossensor ITO/PAMAM-GOx-HRP em função da concentração de glicose a um potencial anódico de 100 mV aplicado no eletrodo de trabalho. Os resultados obtidos correspondem a três medidas.

Observa-se que a intensidade da corrente elétrica aumenta com o aumento de concentração de glicose em escala logarítmica. Este aumento exponencial poderia estar associado ao processo de difusão eletrônica através do dendrímero PAMAM G4 usado para a imobilização das enzimas GOX e HRP. Tal material oferece, a princípio, uma barreira de potencial para a difusão eletrônica, sendo o sinal do biossensor, dependente de tal situação.

A Figura 8.16 indica que o biossensor ITO/PAMAM-GO<sub>x</sub>-HRP é adequado para análise de glicose a nível clínico. A concentração de glicose pode ser determinada a partir da equação:

$$\text{Log (I)} = 7,87\text{E-}3 \text{ C} - 7,04$$

Sendo I a corrente máxima e C a concentração de glicose.

#### 8.4 – Referências

- [1] Fan, J.C.C.; Goodenough, J.B. X-ray photoemission spectroscopy studies of Sn-doped indium-oxide films. *Journal of Applied Physics*, **18** (8), p. 3524-3531, 1977.
- [2] Han, H.; Adams, D.; Mayer, J.W.; Alford, T.L. Characterization of the physical and electrical properties of indium tin oxide on polyethylene naphthalate. *Journal of Applied Physics*, **98**, (83705), p. 1-8, 2005.
- [3] Cardoso, W.S.; Longo, C.; De Paoli, M.A. Preparação de Eletrodos opticamente transparentes. *Química Nova*, **28**, (2), p. 345-349, 2005.
- [4] George, J.; Menon C.S.; Electrical and optical properties of electron beam evaporated ITO thin films. *Surface and Coatings Technology*, **132**, p. 45-48, 2000.
- [5] Ngaffo, F.F. *et al.* Deposition of ITO films on SiO<sub>2</sub> substrates. *Applied Surface Science*, **248**, p. 428–432, 2005.
- [6] Hichou, A.E. Effect of substrate temperature on electrical, structural, optical and cathodoluminescent properties of In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> -Sn thin films prepared by spray pyrolysis. *Thin Solid Films* **458** (1-2), p. 263-258, 2004.

- [7] Nisha, M.; Anusha, S.; Antony, A.; Manoj, R.; Jayaraj, M.K. Effect of substrate temperature on the growth of ITO thin films. *Applied Surface Science*, **252** (5) p.1430-1435, 2005.
- [8] Ma. et al. Preparation and properties of transparent conducting indium tin oxide films deposited by reactive evaporation, *Thin Solid Films*, **263** (1), p. 105-110, 1995.
- [9] Cowie, J.M.G. Polymers: chemistry & physics of modern materials. *New York, Chapman & Hall*, p. 210-213, 1991.
- [10] 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. *Macromolecules*, (**33**), p. 315-320, 2000.
- [11] Hedden et. al. Templating of inorganic nanoparticles by PAMAM/PEG dendrimer-star polymers. *Polymer*, **43**, p. 5473–5481, 2002.
- [12] Davis, A.P.; Ma, G.; Allen, H.C. Surface vibrational sum frequency and Raman studies of PAMAM G0, G1 and acylated PAMAM G0 dendrimers. *Analytica Chimica Acta*, **496**, p.117-131, 2003.
- [13] Risser, S.M.; Beratan, D.N.; Onuchicz, J.N. Electronic coupling in starburst dendrimers: connectivity, disorder, and finite size effects in macromolecular bethe lattices. *Journal of Physical Chemistry*, **97**, p. 4523-4527, 1993.
- [14] Vieira, N.C.S.; Fernandes, E.G.R.; Soares, D.A.W. De Queiroz, A.A.A in: 8° Congresso Brasileiro de Polímeros, Águas de Lindóia, 2005, Vol. 1, 109.
- [15] Vieira, N.C.S.; Grassi, M.; Soares, D.A.W. De Queiroz, A.A.A in: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, São Pedro, 2005, 155.



- [16] Gosh. et. al. Hopping transport in HCL doped conducting polyaniline. *Physics Letters A*, **260**, p. 138-148, 1999.
- [17] Gosh, M.; Barman, A; De, S.K.; Chatterjee, S. Crossover from Mott to Efros-Shklovskii variable-range-hopping conductivity in polyaniline. *Synthetic Metals*, **97**, p. 23-29, 1998.

## Capítulo 9 - Conclusões

---

A obtenção do bioconjugado PAMAM-GOX-HRP é interessante do ponto de vista de que o dendrímero possui uma elevada densidade de grupos funcionais em sua superfície, característica ideal para a obtenção de sistemas multienzimáticos. Por outro lado, a síntese de eletrodos do tipo ITO é fundamental para a obtenção de biossensores que possuem uma performance adequada quanto à monitoração de glicose, analito este clinicamente importante.

Os resultados experimentais permitem concluir que:

- 1- Os filmes finos de ITO possuem as características elétricas adequadas para serem utilizados como biossensores de glicose;
- 2- A análise microestrutural (MEV e DRX) evidenciou que os filmes de ITO são policristalinos com grãos da ordem nanométrica. O material possui estrutura cúbica típica de bixbyta e não há influência do óxido de estanho na rede do óxido de índio, atuando os átomos de estanho apenas como substituinte;
- 3- O polímero poli(amidoamina) PAMAM sintetizado neste trabalho possui estrutura dendrítica, comprovado pelas espectroscopias NMR e FTIR, bem como pela cromatografia de permeação em gel (GPC);
- 4- As caracterizações eletroópticas do dendrímero PAMAM mostraram que existe uma barreira de potencial elevada para que se inicie o processo de condução, sendo esta barreira um tanto maior quanto maior for a geração do dendrímero (modelagem molecular e curva I(V)) indicando um alto band gap para o PAMAM G4 (UV-Vis);

- 5- Os resultados obtidos através de simulações computacionais estão em boa concordância com as caracterizações elétricas e ópticas do dendrímero PAMAM;
- 6- O sinal do biossensor ITO/PAMAM/GOX-HRP é dependente da difusão eletrônica através da estrutura dendrítica;
- 7- Por fim, o sistema ITO/PAMAM/GOX-HRP exibiu uma performance adequada quanto à sua característica de biossensor de glicose.

## Capítulo 10 - Perspectivas futuras

---

Como foi exposto anteriormente, o número de diabéticos é grande em todo o mundo. No caso de países subdesenvolvidos, como o Brasil, a metade desses doentes não sabe que sofrem da doença. Sistemas inteligentes para o monitoramento do diabetes melito ou para um trabalho de prevenção representa um elevado potencial de crescimento mercadológico. Os biossensores já têm sido usados para tal finalidade, contudo, ainda é grande o número de pessoas que ainda não têm acesso ao monitoramento do diabetes, devido ao alto custo dos dispositivos atuais. Neste sentido, espera-se que o presente trabalho possa ter despertado a necessidade do desenvolvimento de biossensores em nosso país. Porém, é reconhecido que o caminho a ser percorrido ainda é longo.

Algumas etapas não menos importantes das que aqui foram apresentadas, necessitam ser estudadas e analisadas cuidadosamente quanto ao projeto de um biossensor de glicose genuinamente nacional. Tais etapas, se não foram incluídas neste trabalho devido ao binômio de tempo e instrumentação, espera-se que as mesmas sejam estudadas em futuros trabalhos. Assim, pode-se dizer que as perspectivas futuras desse trabalho são:

- 1- Estudar as interações entre o dendrímero PAMAM e as enzimas GOx e HRP a nível molecular;
- 2- Calcular os parâmetros cinéticos das enzimas imobilizadas e verificar a influência do processo de imobilização na atividade enzimática;
- 3- Otimizar a produção de eletrodos de ITO via CVD;
- 4- Considerando-se que um biossensor envolve, além de um eletrodo enzimático também um sistema de aquisição de sinais em tempo real, é

proposto a otimização e miniaturização do circuito usado bem como a elaboração de um software para digitalização dos sinais obtidos.