



**Sara Isabel Palhas Gomes**  
Licenciada em Engenharia do Ambiente e Biológica

## **Imobilização de enzimas em matrizes de sol-gel: novos desenvolvimentos em biossensores de nitrito e glucose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Investigadora associada, FCT-UNL

Coorientadora: Doutora Célia Marisa Costa Figueiredo Silveira

Júri:

Presidente: Doutor Carlos Alberto Gomes Salgueiro  
Arguente(s): Doutora Catarina Morais Vaz Paquete  
Vogal(ais): Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Investigadora associada, FCT-UNL





**Sara Isabel Palhas Gomes**

Licenciada em Engenharia do Ambiente e  
Biológica

## **Imobilização de enzimas em matrizes de sol-gel: novos desenvolvimentos em biossensores de nitrito e glucose**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida,  
Investigadora associada, FCT-UNL

Coorientadora: Doutora Célia Marisa Costa Figueiredo Silveira

**Março, 2017**



Copyright

**“Imobilização de enzimas em matrizes de sol-gel: novos desenvolvimentos em biossensores de nitrito e glucose”**

Copyright © Sara Isabel Palhas Gomes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus agradecimentos a todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação de Mestrado.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Maria Gabriela Machado de Almeida, pela oportunidade de trabalhar sobre a sua competência, numa área de investigação que permitiu alargar os meus horizontes científicos e contribuir para o meu sucesso a nível académico.

Queria também agradecer à Doutora Célia Silveira pela sua disponibilidade, incentivo, encorajamento e apoio que demonstrou o longo de todo o trabalho, bem como os momentos de convívio.

Deixo um agradecimento especial pelo contributo e apoio, assim como toda a formação ao longo deste ano, ao Mestre Tiago Monteiro. E à Mestre Joana Sousa, obrigada pela companhia nos cafés e na descontração das pequenas pausas.

À minha família obrigada por todo o apoio e preocupação ao longo deste trabalho, algumas palavras souberam a encorajamento.

Às minhas companheiras desde sempre e para sempre, Patrícia Brás e D'Janina Silva, obrigado por estes longos anos de amizade, pelas tardes de cafés, e por todo o apoio ao longo deste trabalho.

Às companheiras de Mestrado Ana Nogueira, Sofia, Rita, e Ana Gameiro, obrigado pelo companheirismo nestes dois anos.

Ao meu Pai e à minha Mãe um grande obrigado por todo o apoio incondicional que sempre me deram durante toda a vida, por nunca me terem deixado desistir, e por estarem sempre lá mesmo nos meus momentos de revolta... sem vocês não teria conseguido.

A todos vós, o meu muito obrigado por tudo!



## Resumo

Os trabalhos apresentados nesta dissertação têm como ponto comum a imobilização de enzimas numa matriz de sol-gel à base de silicato de sódio.

Na primeira parte, foi continuada o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para nitritos baseado na redutase de nitrito multihémica (ccNiR) extraída de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC27774. Em concreto, foi realizada uma otimização mais fina dos parâmetros analíticos deste biossensor (desenvolvido no nosso grupo de investigação), através da variação da composição do eletrólito suporte e da incubação prévia da ccNiR em compostos anfifílicos (os surfactantes DDM e SDS) ou hidrofílicos (o polímero, PEG 400). Enquanto que com o PEG 400 se obteve um aumento da resposta catalítica (sensibilidade de  $0,78 \text{ AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$  e intervalo de linearidade de 0,5 a  $31 \mu\text{M}$ ), os dois detergentes não contribuíram para uma melhoria da resposta analítica.

A remoção de  $\text{O}_2$  dissolvido é um aspeto importante para o funcionamento de biossensores eletroquímicos baseados em redutases (caso da ccNiR), nomeadamente quando se pretende desenvolver testes rápidos para utilização em célula aberta. Neste sentido, procurou imobilizar-se o sistema de remoção de  $\text{O}_2$  composto pelas enzimas glucose-oxidase (GOx) e catalase, usando uma matriz de sol-gel de silicato de sódio. Refira-se que este método é bastante mais rápido que os protocolos convencionais e menos agressivo para as moléculas biológicas. A imobilização das duas enzimas foi efetuada separadamente ou em conjunto, segundo diferentes configurações. O sistema PGE/catalase/sol-gel com GOx e glucose em solução, mostrou ser o mais eficaz para a remoção de  $\text{O}_2$ , tendo sido incorporado à *posteriori* no biossensor de nitrito.

Por fim, as experiências realizadas neste contexto foram aproveitadas para o desenvolvimento de um biossensor de glucose baseado na imobilização da enzima GOx com a mesma matriz de sol-gel. Ao reagir com a glucose, a GOx consome o  $\text{O}_2$  dissolvido, levando a um decréscimo da corrente de redução de  $\text{O}_2$  proporcional à sua concentração. A sensibilidade deste biossensor para a glucose varia entre  $2,66 - 6,69 \text{ mAM}^{-1}\text{cm}^{-2}$  e o intervalo de linearidade entre 1,2 a 8 mM.

**Palavras-Chave:** transferência eletrónica direta, ccNiR, surfactantes, sol-gel, biossensor de nitrito, biossensor de glucose



## Abstract

The works presented herein has in common the immobilization of enzymes in a sol-gel matrix based on sodium silicate.

The first part is dedicated to the construction of an electrochemical biosensor for nitrite, based on the cytochrome c nitrite reductase (ccNiR) extracted from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC27774. A fine-tuning of the analytical parameters of this biosensor (developed in our research group) was performed through the variation of the composition of the supporting electrolyte and the incubation of ccNiR in amphiphilic (the surfactants DDM and SDS) or hydrophilic (the polymer, PEG 400) compounds. While with the PEG 400 polymer the catalytic response was increased (sensitivity of  $0.78 \text{ AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$  and linearity range of 0.5 to 31  $\mu\text{M}$ ), the two detergents did not contribute to an improvement in the analytical response.

The removal of dissolved  $\text{O}_2$  is an important aspect for the operation of electrochemical biosensors based on reductase enzymes (the ccNiR's case), namely when the goal is to develop point-of-care tests to use in air open cells. In this regard, the  $\text{O}_2$  removal system composed by glucose oxidase (GOx) and catalase was immobilized using a sodium silicate based sol-gel matrix. It should be noted that this method is much faster than conventional protocols and less aggressive for the biological molecules. The two enzymes were immobilized separately or mixed together, according to different configurations. The PGE/catalase/sol-gel system with GOx and glucose in solution proved to be the most effective for  $\text{O}_2$  removal, so the system was later incorporated into the nitrite biosensor.

Finally, the experiments performed in this context were used for the development of a glucose biosensor based on the immobilization of the enzyme GOx of *Aspergillus niger* in the same sol-gel matrix. Upon reacting with glucose, GOx consumes the dissolved  $\text{O}_2$ , leading to a decrease of the  $\text{O}_2$  reduction currents, that are proportional to its concentration. The sensitivity of this biosensor to glucose varied between 2.66 - 6.69  $\text{mAM}^{-1}\text{cm}^{-2}$  and the linear range between 1.2 to 8 mM.

**Keywords:** Direct electron transfer, ccNiR, surfactants, sol-gel, nitrite biosensor, glucose biosensor



# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>xv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Biossensores</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Vantagens .....	2
1.1.2 Biossensores enzimáticos amperométricos .....	2
1.1.3 Gerações de biossensores amperométricos .....	2
1.1.4 Imobilização de enzimas .....	4
1.1.4.1 Surfactantes .....	4
1.1.4.2 Filmes de sol-gel .....	7
<b>1.2 Biossensores de nitrito</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Ocorrência/Importância/Riscos – Nitratos e Nitritos.....	11
1.2.2 Regulamentação .....	12
1.2.3 Estado de Arte.....	12
1.2.4 NIR's .....	16
<b>1.3 Biossensores de Glucose</b> .....	<b>18</b>
1.3.1 Importância .....	18
1.3.2 Monitorização da glucose .....	18
1.3.3 Enzima GOx .....	18
1.3.4 Estado de Arte.....	19
<b>1.4 Sistema de remoção de oxigénio</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Reagentes e proteínas</b> .....	<b>24</b>
2.1.1 Preparação das soluções .....	24
<b>2.2 Quantificação da enzima ccNiR</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Eletroquímica</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Célula eletroquímica .....	25
2.3.2 Eletrólito suporte .....	25
<b>2.4 Preparação do eléctrodo de trabalho</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 Limpeza .....	26
2.4.2 Imobilização das enzimas.....	26
o n-dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo (DDM) e n-dodecil-sulfato de sódio (SDS) .....	26
<b>2.5 Atividade dos bioelétrodos</b> .....	<b>28</b>
2.5.1 Resposta ao nitrito .....	28
2.5.2 Resposta à glucose .....	28
<b>2.6 Cálculo dos parâmetros analíticos e cinéticos dos biossensores</b> .....	<b>28</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Otimização do biossensor de nitrito</b> .....	<b>30</b>

3.1.1 Eletrólito suporte .....	30
3.1.2 Incubação em compostos anfífilos ou hidrofóbicos .....	33
3.1.3 Imobilização em Sol-gel .....	37
3.1.4 Remoção do O <sub>2</sub> dissolvido.....	38
<b>3.2 Imobilização do sistema de remoção de O<sub>2</sub>.....</b>	<b>40</b>
3.2.1 Imobilização da GOx.....	41
3.2.2 Imobilização da catalase .....	44
3.2.3 Co-imobilização da GOx e Cat .....	46
<b>3.3 Biossensor de nitrito com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> incorporado.....</b>	<b>47</b>
<b>3.4 Biossensor de glucose .....</b>	<b>48</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>54</b>
<b>6. Anexos .....</b>	<b>68</b>

## Índice de Figuras

- Figura 1.1** - Esquema geral do funcionamento de um biossensor [Justino et al., 2013]. ..... 1
- Figura 1.2** - Representação esquemática de um biossensor; A) de primeira geração; B) de segunda geração; C) de terceira geração [Gali, 2009]. ..... 4
- Figura 1.3** - Exemplos de algumas estruturas típicas de uma micela: A) micela esférica normal; B) micela esférica invertida; C) micela lamelar; D) vesiculo [Adaptado de Tadros, 2005].... 5
- Figura 1.4** - Representações esquemáticas de surfactantes nas diferentes formas, a cabeça está representada em círculos vermelhos, e as caudas hidrofóbicas estão a azul. A) micelas esféricas, B) hemimielas, C) bicamada na superfície do eletrodo e D) multicamada na superfície do eletrodo [adaptado de Silveira, 2011]. ..... 6
- Figura 1.5** - Estruturas química dos surfactantes. A) n-dodecil-sulfato de sódio (SDS) (CMC=8,1 mM). B) n-dodecil-  $\beta$ -D-maltosídeo (DDM) (CMC=0,18 mM). ..... 7
- Figura 1.6** - Esquema ilustrativo dos possíveis produtos no processo sol-gel [adaptado de Catauro, 2012]. ..... 9
- Figura 1.7** - Esquema das diferentes abordagens da imobilização de enzimas em sol-gel. a) Aprisionamento da enzima na matriz de sol-gel; b) Ligação da enzima à superfície de um precursor organicamente modificado; c) Método de sanduiche; d) Configuração em bicamada (reproduzida com modificações) [adaptado de Tripathi *et al.*, 2006]. ..... 10
- Figura 1.8** - Estruturas químicas dos componentes do sol-gel utilizado nesta tese. A) Silicato de sódio; B) Polietilenoglicol. .... 10
- Figura 1.9** - Estrutura da redutase do nitrito de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* com as suas sub-unidades [Rodrigues *et al.*, 2006]. ..... 17
- Figura 1.10** - Diagrama esquemático das reações da GOx. .... 19
- Figura 1.11** - Esquema do sistema de remoção de O<sub>2</sub> GOx-Catalase [Plumeré *et al.*, 2012]... 23
- Figura 2.1** - Célula eletroquímica com o sistema convencional de 3 eletrodos, usada neste trabalho. .... 25
- Figura 3.1** - Voltamograma cíclico do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR (41,8 pmol), na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM desarejado com árgon; velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. ..... 30
- Figura 3.2** - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR (41,8 pmol) obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 176,4  $\mu$ M). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,057x-1^{-9}$ ;  $r^2=0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com os diferentes eletrólitos testados ( $\blacktriangle$ - Tris-HCl 50 mM em KCl 100 mM;  $\blacklozenge$ - Tris-HCl 100 mM em KCl 100 mM;  $\bullet$  -

- PB 100 mM). As linhas contínuas representam as simulações de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática..... 31
- Figura 3.3** - Representação esquemática do mecanismo da reação do biossensor de nitrito baseado na resposta eletroquímica direta da ccNiR [Silveira, 2011]..... 32
- Figura 3.4** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+surfactante, na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. Linha verde – DDM; linha laranja - SDS e linha azul – controlo (sem surfactantes). ..... 33
- Figura 3.5** - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 301,3 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,0465x-0,0187$ ;  $r^2=0,998$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com os diferentes surfactantes testados (▲- DDM; ◆- SDS). As linhas contínuas representam as simulações de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática..... 34
- Figura 3.6** - A) Voltamogramas cíclicos com o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 462,9 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,0573x-2^{-8}$ ;  $r^2=0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400 em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a - 0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. A linha contínua representa a simulação de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática..... 36
- Figura 3.7** - Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a - 0,8 V vs Ag/AgCl. A linha contínua representa a simulação de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática. .... 37
- Figura 3.8** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em 100 mM KCl, desarejado com árgon ou com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> em solução. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. Linha preenchida – Uso de árgon para remoção de oxigénio; linha tracejada – uso do sistema bienzimático para remoção do oxigénio..... 39
- Figura 3.9** - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 – 342,2 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> em solução. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,0313x+2^{-7}$ ;  $r^2=0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a - 0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. .... 39
- Figura 3.10** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, com a Cat e glucose em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) -PGE/GOx/Sol-gel – linha a; Adição de 2000

- UmL<sup>-1</sup> de Cat – linha b; Adição de 80mM de glucose –linha c; B) – Adição de glucose – linha c; 10 minutos – linha d; 30 minutos – linha e. .... 41
- Figura 3.11** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/Sol-Gel, com a glucose e Cat em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) – PGE/GOx/sol-gel - linha a; Adição de 80mM de glucose – linha b; Adição de 2000 UmL<sup>-1</sup> de Cat – linha c; B) – Adição de Cat – linha c; após 15 minutos – linha d; após 60 minutos – linha e..... 43
- Figura 3.12** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/sol-gel, com adição de GOx e glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. PGE/sol-gel - linha a; Adição de 15UmL<sup>-1</sup> de GOx – linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c. .... 44
- Figura 3.13** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/Cat/sol-gel, com a GOx e glucose em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. PGE/Cat/sol-gel – linha a; Adição de GOx 15UmL<sup>-1</sup> – linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c; após 60 minutos – linha d. .... 44
- Figura 3.14** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/Cat/sol-gel. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. PGE/Cat/sol-gel - linha a; após 15 minutos – linha b; após 30 minutos – linha c; após 60 minutos – linha d. .... 45
- Figura 3.15** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/sol-gel+GOx+Cat, com adição de glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. PGE//sol-gel+GOx+Cat – linha a; Adição de 80mM de glucose à solução – linha b; após 60 minutos – linha c. .... 46
- Figura 3.16** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+GOx/sol-gel, com adição de glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) PGE/ccNiR/GOx/sol-gel – linha a; Adição de 80mM de glucose – linha b; após 60 minutos – linha c. B) Na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4 µM). .... 47
- Figura 3.17** - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+Cat/sol-gel, com adição de GOx e glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) PGE/ccNiR+Cat/sol-gel – linha a; Adição de 15 UmL<sup>-1</sup> de GOx –linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c; B) Adição de glucose – linha c; após 45 minutos de ensaios –linha d; C) Na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4 µM). .... 48
- Figura 3.18** - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, obtidos na presença de concentrações crescentes de glucose (0,2 – 45,6 mM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=6^{-7}x-8^{-6}$ ;  $r^2=0,993$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de glucose. Correntes catalíticas medidas no pico catódico dos voltamogramas. .... 49
- Figura 3.19** - Variação da corrente catalítica em função da concentração de glucose adicionada ao sistema PGE/GOx/sol-gel. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>; Correntes catalíticas medidas no pico catódico dos voltamogramas. .... 50



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Descrição e parâmetros analíticos de biossensores baseados na redutase de nitrito citocromo <i>c</i> (MET – Transferência eletrônica mediada; DET – transferência eletrônica direta; N.D.- não determinado). .....	14
<b>Tabela 1.2</b> - Descrição e parâmetros analíticos de alguns biossensores eletroquímicos de glucose apresentados nos últimos quatro anos na literatura, utilizando a enzima GOx para determinação de glucose. ....	20
<b>Tabela 3.1</b> - Parâmetros analíticos e valores dos parâmetros cinéticos, do biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR com os diferentes eletrólitos de suporte testados. ....	32
<b>Tabela 3.2</b> - Parâmetros analíticos e valores dos parâmetros cinéticos, do biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+matriz de imobilização, e controlo baseado no sistema PGE/ccNiR+água. ....	35



## Lista de Abreviaturas

Ø – diâmetro  
ADN - ácido desoxirribonucleico  
ATCC – do inglês *American Type Culture Collection*  
BSA – do inglês *bovine serum albumin*  
Cat – enzima catalase  
ccNiR- citocromo-c redutase de nitrito  
cd1NiR(s) - redutase(s) do nitrito citocromo-cd1  
CuNiR - redutase do nitrito de cobre  
CMC – Concentração Micelar Crítica, do inglês *Critical Micelar Concentrations*  
DDM - n-dodecil-β-D-maltosídeo, do inglês *n-dodecyl-β-D-maltoside*  
DET - transferência eletrônica direta, do inglês *direct electron transfer*  
dH2O - água desionizada  
EC – Eletro-Químico – Químico, do inglês *ElectroChemical – Chemical*  
GOx – enzima glucose-oxidase  
K<sub>M</sub> - constante de Michaelis-Menten  
K<sub>M</sub><sup>app</sup> - constante de Michaelis-Menten aparente  
MET - transferência eletrônica mediada, do inglês *mediated electronic transfer*  
n – número de ensaios  
n.a. - não aplicável  
NiR(s) - redutase(s) do nitrito  
NO – óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*  
NrfA - sub-unidade A do citocromo c redutase do nitrito  
NrfH - sub-unidade H do citocromo c redutase do nitrito  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
PB – tampão fosfato, do inglês *phosphate buffer*  
PEG - polietilenoglicol  
PGE - eletrodo de trabalho de grafite pirolítica, do inglês *pyrolytic graphite electrode*  
Pt - contra-elétrodo de platina  
R<sup>2</sup> - coeficiente de correlação  
RNA – ácido ribonucleico  
SDS – n-dodecil-sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*  
SPE – Impressão em tela de eletrodos, do inglês *Screen-Printing Electrodes*  
Tris - Tris(hidroximetil)aminometano  
U – unidade de atividade enzimática  
UV/Vis - Ultra-Violeta/Visível



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Biossensores

A simplificação dos métodos analíticos e portabilidade da instrumentação são objetivos comuns a todas as áreas da química analítica. Assim, ao longo dos anos tem-se tornado disponíveis no mercado um maior número de dispositivos – denominados de biossensores - que permitem a redução do tamanho da amostra, têm um custo relativamente baixo, são versáteis, seletivos e economizam os tempos de análise [Turner *et al.*, 1987; Bănică, 2012].

Um biossensor – Figura 1.1 – é um dispositivo integrado que compreende um elemento de reconhecimento biológico (bioreceptor) associado a um transdutor físico-químico. Estes dispositivos fazem a detecção quantitativa ou semi-quantitativa de um analito. O bioreceptor interatua com o analito produzindo um sinal biológico que é reconhecido pelo elemento de transdução e convertido num sinal elétrico mensurável (valores numéricos). Os elementos biológicos dos biossensores podem ser tecidos, microrganismos, organelos, enzimas, recetores celulares, DNA, RNA e anticorpos [Thévenot *et al.*, 1999].

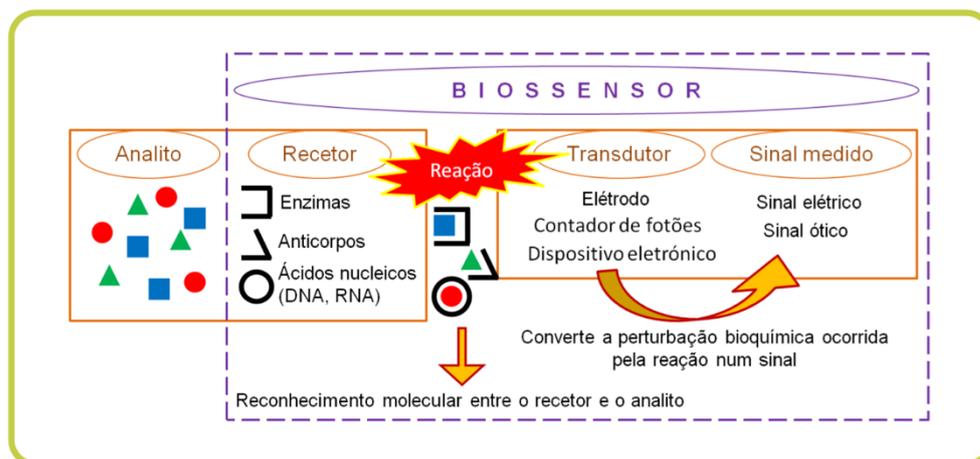


Figura 1.1- Esquema geral do funcionamento de um biossensor [Justino *et al.*, 2013].

Num biossensor, o transdutor é o componente que tem o papel mais importante no processo de detecção de sinal. Os elementos de detecção podem ser eletroquímicos, piezoelétricos, térmicos, magnéticos, óticos, etc [Thévenot *et al.*, 1999].

No presente trabalho, o método de transdução do biossensor desenvolvido é eletroquímico (e por isso mesmo lhe será dado destaque particular), sendo que os métodos eletroquímicos, e em especial a voltametria, será abordada no anexo A. De acordo com o transdutor utilizado os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como amperométricos, potenciométricos, impedimétricos e condutimétricos. [Thévenot *et al.*, 2001].

Os biossensores constituem um campo interdisciplinar, e os avanços ocorrem a partir de diversas disciplinas tais como, a microeletrónica, microcomputadores e biotecnologia. Algumas propriedades mais pertinentes e características do desempenho de um biossensor, são: a sensibilidade, a linearidade, o limite de detecção, a seletividade, e o tempo de vida [Lojou e Bianco, 2006; Buerk, 1993].

### 1.1.1 Vantagens

O primeiro biossensor, desenvolvido em 1962 por Clark e Lyons, utilizava a enzima glucose-oxidase (GOx) como recetor biológico para detetar os níveis de glucose no sangue. Este dispositivo foi assim o principal impulsionador da investigação na área dos biossensores, tendo-se tornado bastante relevante devido ao elevado impacto económico e epidemiológico da diabetes, que será abordado na secção 1.3 [Clark e Lyons, 1982].

Os biossensores podem ser utilizados em diversas aplicações tais como: análise ambiental em tempo real, análises bioquímicas, análise *in-vivo*, deteção de substâncias biológicas relevantes (como hormonas e drogas de abuso) e deteção de guerra química [Pearson *et al.*, 2000]. Comparativamente aos métodos analíticos mais comuns como o UV-Vis, a fluorimetria, etc, (mencionados em 1.2.3), os biossensores apresentam algumas vantagens: empregam técnicas de deteção “limpas”, isto é, não poluentes e de baixo custo sem recurso a fases de pré-tratamento de amostra demoradas ou necessidade de grandes volumes de amostra. O seu uso, na maioria dos casos, não obriga ao recurso de técnicos especializados podendo, nalguns casos, dispensar o uso de reagentes adicionais, e aparecendo tanto como dispositivos de uso contínuo ou descartáveis [Pearson *et al.*, 2000].

### 1.1.2 Biossensores enzimáticos amperométricos

A maior parte dos biossensores reportados na literatura utiliza como componentes biológicos enzimas imobilizadas (assunto que será discutido na secção 1.1.4), estando os métodos de transdução eletroquímicos (amperométricos e potenciométricos) entre os mais utilizados [Karube e Nomura, 2000; Oliveira Neto e Yamanaka, 1988].

Os biossensores amperométricos, são assim denominados devido ao seu mecanismo de transdução. A deteção baseia-se na medida da intensidade de corrente no eléctrodo de trabalho, ao qual é aplicado um potencial fixo, sendo que a corrente gerada pela reacção de oxidação ou redução eletroquímica das espécies eletroativas na superfície do eléctrodo, é proporcional à concentração dessas espécies [Thévenot *et al.*, 2001].

O comportamento de um biossensor enzimático amperométrico é determinado pelos aspetos relacionados com o processo eletródico, e também pela cinética da enzima. Torna-se por isso fundamental conjugar os conhecimentos eletroquímicos com os de cinética de enzimas imobilizadas. Em geral, o controlo da velocidade global é determinado pela cinética da reacção enzimática ou pela difusão do substrato, sendo o detetor eletroquímico considerado uma testemunha passiva da reacção enzimática [Thévenot *et al.*, 2001]. Quando comparadas aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade para o substrato. Isto deve-se às características do meio reacional e da própria molécula de substrato, tais como: tamanho, polaridade, estereoquímica, grupos funcionais e energia de ligação [Karube e Nomura, 2000; Oliveira Neto e Yamanaka, 1988].

### 1.1.3 Gerações de biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos podem ser classificados de acordo com três gerações [Borgmann *et al.*, 2011].

Os biossensores de primeira geração baseiam-se na deteção do aumento de um produto de uma reacção enzimática ou da diminuição do substrato enzimático, sendo necessário que o composto medido seja electroquimicamente ativo – Figura 1.2A. O primeiro biossensor desenvolvido foi um biossensor de primeira geração que tinha como elemento de

bioreconhecimento a GOx e no qual se monitorizava o consumo de oxigénio por esta enzima. Em alternativa, a atividade deste biossensor pode também ser seguida através da produção de peróxido de hidrogénio pela GOx [Clark e Lyons, 1982; Borgmann *et al.*, 2011]. Os biossensores de primeira geração apresentam alguns problemas: em primeiro lugar, as medições amperométricas de peróxido de hidrogénio e de oxigénio requerem um potencial de trabalho elevado, ao qual o impacto na corrente medida de interferentes presentes em amostras biológicas ou ambientais é significativo; em segundo lugar, uma vez que este tipo de biossensores são baseados em oxidases que utilizam o oxigénio como aceitador de eletrões, a sua resposta depende das concentrações de oxigénio dissolvido nas amostras, as quais podem variar, afetando a resposta analítica do biossensor [Borgmann *et al.*, 2011].

As desvantagens associadas aos biossensores de primeira geração podem ser parcialmente superadas substituindo o oxigénio por um aceitador de eletrões sintético – um mediador. O mediador transfere eletrões, gerados ou consumidos durante a reação enzimática, entre a enzima e o elétrodo. Os biossensores que se baseiam neste esquema de transferência eletrónica foram classificados como a segunda geração de biossensores – Figura 1.2B [Borgmann *et al.*, 2011]. A utilização destes mediadores é vantajosa, pois permite diminuir o potencial de deteção do biossensor, reduzindo assim a interferência causada por outros compostos que possam ser oxidados diretamente na superfície do elétrodo, e facilita a transferência eletrónica entre o componente biológico e a superfície transdutora [Chaubey e Malhotra, 2002].

Os biossensores de terceira geração – Figura 1.2C - são baseados na transferência direta de eletrões entre a enzima e a superfície do elétrodo (*DET – Direct Electron Transfer*). A ausência de um mediador (como por exemplo fenazina, safrinas, antroquinonas, etc) é a principal vantagem destes biossensores, proporcionando assim uma alta eficiência e design simples. No entanto, a transferência direta de eletrões entre enzimas redox e o elétrodo, pode ser muito lenta, devido à cadeia polipeptídica da proteína que protege o centro ativo [Silveira, 2011; Borgmann *et al.*, 2011]. A eficiência da transferência direta de eletrões, depende do distanciamento entre o centro ativo da enzima e do elétrodo, o que é afetado não só pela orientação da enzima no elétrodo, mas também pelas propriedades do material do elétrodo e a técnica de imobilização [Borgmann *et al.*, 2011].

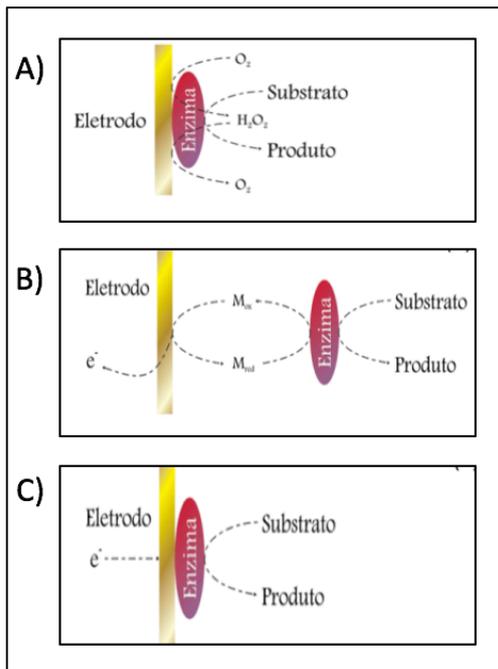


Figura 1.2 - Representação esquemática de um biossensor; A) de primeira geração; B) de segunda geração; C) de terceira geração [Gali, 2009].

#### 1.1.4 Imobilização de enzimas

Nos biossensores, o bioreceptor e o transdutor estão em contacto físico. Os agentes de reconhecimento biológico são, por isso, imobilizados na superfície do transdutor, sendo os mais usados, as enzimas. A utilização de enzimas imobilizadas, é bastante vantajosa uma vez que diminui o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo de medição e garante a estabilidade das enzimas [Karube e Nomura, 2000; Oliveira Neto e Yamanaka, 1988; Gregg and Heller, 1991]. Contudo, uma das maiores dificuldades na preparação de biossensores enzimáticos, está relacionado com a estabilidade da molécula biológica. Fora do seu ambiente natural, a enzima tende a desnaturar-se, perdendo a sua atividade enzimática, afetando assim o desempenho do biossensor [Scouten *et al.*, 1995]. Este obstáculo pode ser ultrapassado através da imobilização adequada da biomolécula na superfície do transdutor, garantindo que esta mantém as suas propriedades.

Os métodos físico-químicos mais comumente utilizados na imobilização de enzimas em transdutores eletroquímicos são: adsorção física, encapsulamento em géis poliméricos, formação de ligações intermoleculares cruzadas, entre outros [Krajewska, 2004; Krajewska, 2009]. No presente trabalho será dada uma especial atenção à imobilização de enzimas em filmes de surfactantes (secção 1.1.4.1) e de sol-gel (secção 1.1.4.2).

##### 1.1.4.1 Surfactantes

A imobilização de proteínas com filmes de surfactantes tem sido sugerida como uma boa abordagem para promover a transferência de elétrões entre proteínas e elétrodos [Fan *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2012; Vittal *et al.*, 2006; Silveira, 2011; Rodrigues, 2013].

Os surfactantes (também conhecidos como detergentes) são compostos anfipáticos constituídos por um grupo hidrofílico (cabeça polar) e uma cadeia hidrofóbica (cauda) constituída por 6 a 22 átomos de carbono. A região polar da molécula pode ser positiva, negativa, neutra ou zwitteriônica. Assim sendo, os surfactantes podem ser classificados de acordo com a densidade de carga que apresentam, podendo ser catiónicos, aniônicos, não-iônicos ou zwitteriônicos. Nos surfactantes iônicos existe um grupo carregado, positiva ou negativamente, enquanto que nos não-iônicos o grupo hidrofílico é neutro. Os surfactantes zwitteriônicos possuem na cabeça polar igual número de grupos carregados positiva e negativamente [Holmberg *et al.*, 2003; Le Maire *et al.*, 2000].

Em solução aquosa, as moléculas de surfactante formam micelas esféricas com a cabeça hidrofílica virada para a solução, e as cadeias de hidrocarbonetos orientadas para o interior da estrutura – Figura 1.3. O processo de formação de micelas a partir das moléculas de surfactante, a uma determinada temperatura, ocorre a uma determinada concentração, denominada concentração micelar crítica (CMC) [Evans e Wennerström, 1999]. A CMC é característica de cada surfactante e está relacionada com alterações significativas nas propriedades físicas do surfactante, tais como a condutividade, viscosidade e a tensão superficial [Maniasso, 2001].

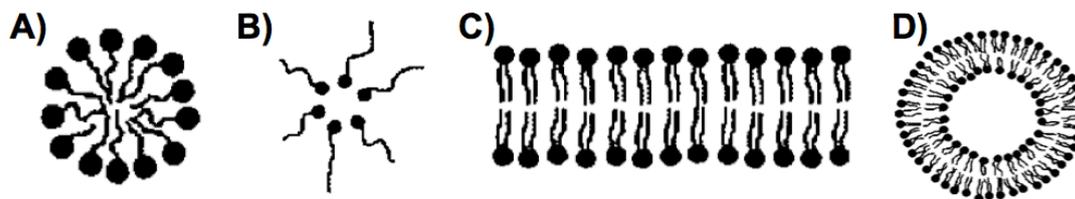


Figura 1.3 - Exemplos de algumas estruturas típicas de uma micela: A) micela esférica normal; B) micela esférica invertida; C) micela lamelar; D) vesículo [Adaptado de Tadros, 2005].

A capacidade dos surfactantes formarem micelas é bastante importante uma vez que lhes permite solubilizar solutos com diferentes características através da combinação do efeito hidrofóbico e de forças electrostáticas, isto é, ao interagirem com o soluto, as moléculas hidrofóbicas são capturadas para dentro da micela onde são solubilizadas [Tadros, 2005]. Ao agregarem as micelas podem formar estruturas supramoleculares com regiões específicas de carácter hidrofílico e hidrofóbico – Figura 1.4 [Seddon *et al.*, 2004; Holmberg *et al.*, 2003].

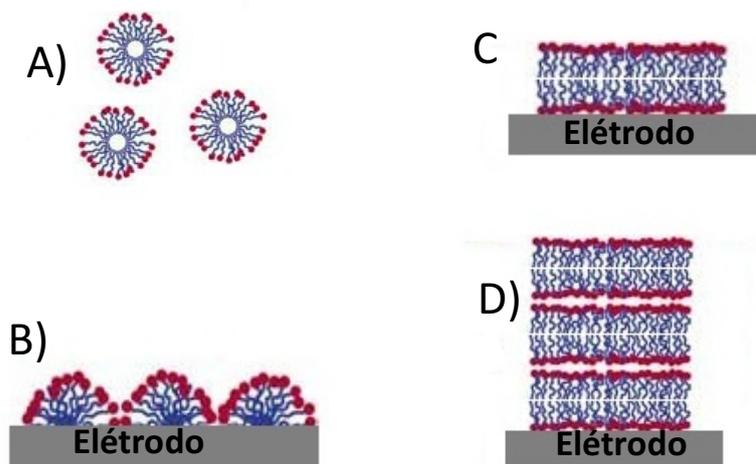


Figura 1.4 - Representações esquemáticas de surfactantes nas diferentes formas, a cabeça está representada em círculos vermelhos, e as caudas hidrofóbicas estão a azul. A) micelas esféricas, B) hemimielas, C) bicamada na superfície do elétrodo e D) multicamada na superfície do elétrodo [adaptado de Silveira, 2011].

Devido à capacidade de alterar as propriedades da interface elétrodo-solução, vários surfactantes têm sido utilizados em metodologias eletro-analíticas, podendo ser empregues em solução e/ou na modificação da superfície do elétrodo [Cao *et al.*, 2008; Mahmud *et al.*, 2011]. Os surfactantes têm a capacidade de interagir com os analitos facilitando a adsorção desses compostos, o que aumenta a concentração dos mesmos sobre a superfície do elétrodo [Xu *et al.*, 2009; Rajbongshi *et al.*, 2010].

Estudos anteriores mostraram que os filmes de surfactantes são bastante estáveis em solução aquosa e que as proteínas imobilizadas conseguem reter as suas propriedades nativas [Rusling, 1998; Guto e Rusling, 2006]. Estes filmes podem também ajudar a orientar as proteínas e permitir uma boa difusão no seu interior devido à microestrutura bem definida e a dinâmica dos filmes dos surfactantes [Rusling e Nassar, 1993; Zhang e Rusling, 1997]. A possibilidade de orientar especificamente as proteínas no interior de filmes de surfactante está relacionada com o grupo hidrofílico do surfactante ou a interação entre a proteína e as bicamadas hidrofóbicas. Outras vantagens atribuídas aos filmes dos surfactantes são a possibilidade de estudar as proteínas por métodos eletroquímicos ou óticos, o aumento do grau de reversibilidade conferido aos sinais eletroquímicos, as quantidades reduzidas de amostra necessárias para preparar os filmes, e a estabilidade [Rusling, 1998; Hu, 2001].

No presente trabalho, usaram-se dois tipos de surfactantes para a imobilização da enzima ccNiR: dodecil sulfato de sódio (SDS) – Figura 1.5A – e o n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosídeo (DDM) Figura 1.5B.

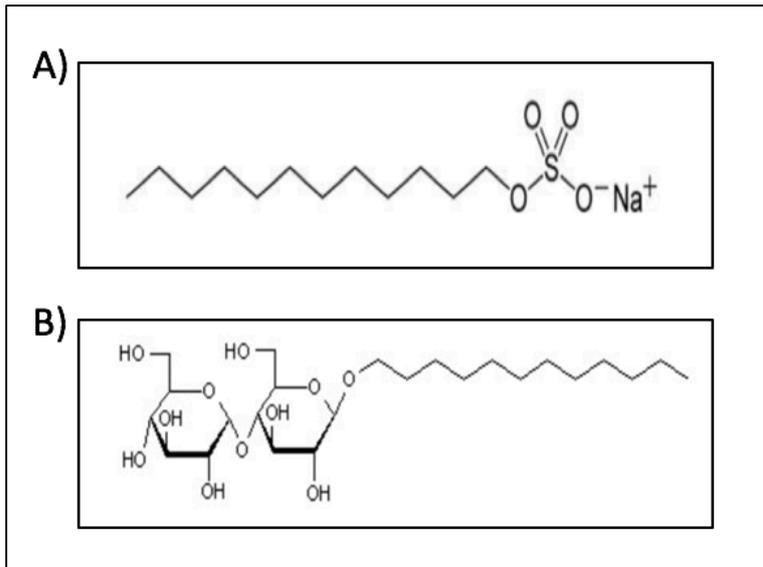


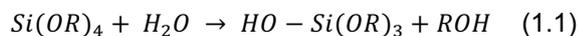
Figura 1.5 - Estruturas química dos surfactantes. A) n-dodecil-sulfato de sódio (SDS) (CMC=8,1 mM). B) n-dodecil- β-D-maltosídeo (DDM) (CMC=0,18 mM).

### 1.1.4.2 Filmes de sol-gel

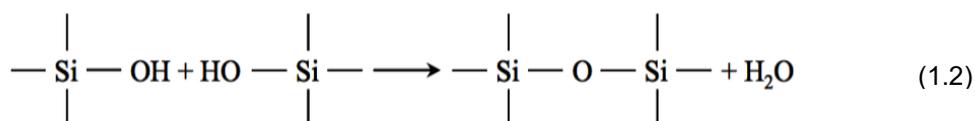
O interesse pelo processo sol-gel para a produção de vidros e materiais cerâmicos teve início por volta da segunda metade do século XIX. Em 1846, Ebelmen foi o primeiro a relatar a formação de sol-gel como resultado da hidrólise lenta de um éster do ácido silícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), o Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub> chamado de tetraetilortossilicato ou TEOS [Ebelmen, 1846]. A denominação de sol-gel advém de uma das etapas mais importantes deste processo que consiste no momento de transição de uma fase sol para uma fase gel. O termo sol é utilizado para definir uma dispersão estável de partículas coloidais de dimensão entre 1 e 100 nm num fluido, enquanto que o termo gel define um sistema formado por uma estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza uma fase líquida nos seus interstícios [Iler, 1979; Brinker *et al.*, 1990].

A reação de polimerização sol-gel pode ser dividida em duas etapas (a hidrólise e a condensação) ilustrado nas equações 1.1 a 1.3, com precursores alcóxido:

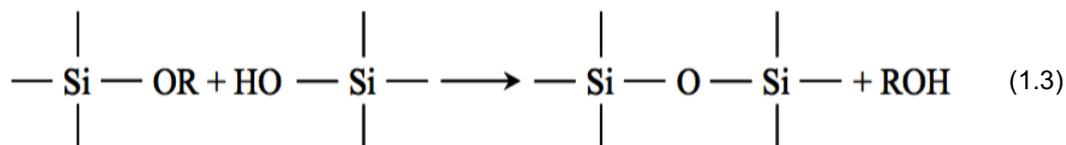
Hidrólise do grupo alcóxido com a formação dos grupos funcionais silanol:



Condensação do grupo silanol, que inicialmente leva à formação do sol e, eventualmente à formação do gel:



ou,



É de notar que as reações de hidrólise e condensação ocorrem simultaneamente, pois após a formação das primeiras moléculas de precursor hidrolisadas, estas ficam disponíveis para participar nas reações de condensação.

Os precursores para formar o “sol” são moléculas constituídas por elementos metálicos ou metalóides (elementos metálicos rodeados por ligandos reativos). Os alcóxidos, em particular, são os mais frequentemente utilizados uma vez que reagem facilmente com a água. Os alcóxidos mais utilizados para a preparação de sensores são o tetrametiloxisilano (TMOS), tetraetilortossilicato (TEOS), aminopropiltriétoxissilano (APTOS), 2-(3,4-epoxiciclohexil)-etiltrimetoxissilano, e metil-trimetiloxissilano [Li *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000 (a); Lee *et al.*, 2000 (b); Navas Días *et al.*, 1998; Van Unen *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2003; Kauffmann *et al.*, 1996; Lev *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000 (a); Sampath e Lev, 1996; Künzelmann *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000 (b); Martinez-Pérez *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 1997; Couto *et al.*, 2002; Rabinovich e Lev, 2001]. No entanto, existem outros tipos de precursores disponíveis, tais como os titanatos, aluminatos, boratos, etc. [Airoldi e Farias, 2004; Avnir, 1995]. Como o grupo alcóxido possui baixa reatividade, as reações de hidrólise e condensação são relativamente lentas, sendo necessária a adição de catalisadores ácidos (por exemplo, o ácido clorídrico e a amónia) ou básicos (hidróxido de potássio). O efeito da adição destes catalisadores, além de fazer variar a energia de ativação do processo, altera também a polidispersidade, a massa molar e o grau de ramificação das cadeias formadas [Kandimalla *et al.*, 2006; Brinker *et al.*, 1990; Alfaya *et al.*, 2002].

Após a formação do “sol”, e a secagem do gel, forma-se o xerogel, um silicato poroso com área de superfície elevada [Lev *et al.*, 1997; Rabinovich e Lev, 2001; Pauliukaite *et al.*, 2005]. As reações químicas envolvidas na formação do sol, do gel e do xerogel influenciam a composição e as propriedades do produto final [Kandimalla *et al.*, 2006; Alfaya *et al.*, 2002; Brinker *et al.*, 1990]. Na Figura 1.6 é possível observar com mais detalhe os principais produtos obtidos pelo processo sol-gel.

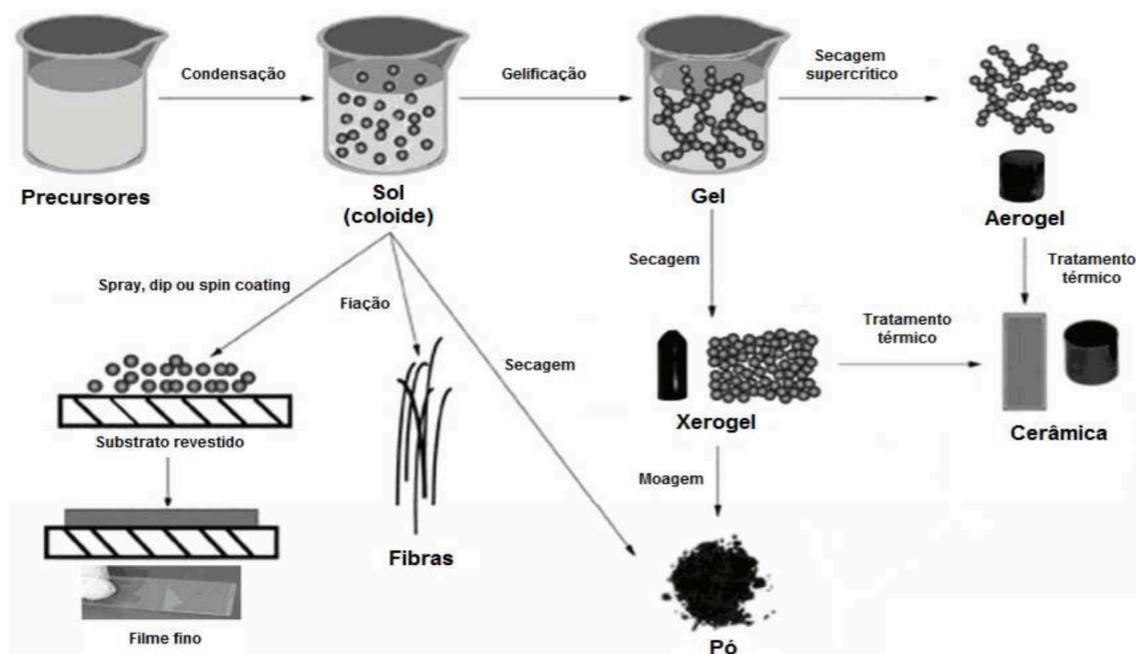


Figura 1.6 -Esquema ilustrativo dos possíveis produtos no processo sol-gel [adaptado de Catauro, 2012].

O processo de sol-gel pode ser dividido em duas classes dependendo da natureza do precursor inorgânico utilizado: os sais (cloretos, nitratos, sulfetos, entre outros) e os alcóxidos, sendo esta última, a classe mais versátil [Alfaya e Kubota, 2001].

A razão molar água:precursor, a natureza e a concentração do catalisador e o tipo de precursor alcóxido são parâmetros específicos que influenciam fortemente as velocidades relativas das reações de hidrólise e de condensação na formação do sol-gel. Em geral, preparações com baixo valor de pH e de teor de água produzem materiais densos com poros pequenos, enquanto que preparações de pH elevado e altos teores de água produzem materiais mais porosos [Kandimalla *et al.*, 2006; Brinker *et al.*, 1990; Alfaya *et al.*, 2002].

### Aplicações de materiais de sol-gel

A utilização do processo de sol-gel para produzir materiais para sensores analíticos tem atraído um grande interesse por parte da comunidade científica [Li e Tan, 2000; Kandimalla *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2015 (a)]. Este interesse deve-se a vários fatores, tais como o facto de os materiais de sol-gel serem quimicamente inertes, a facilidade de fabricação do sol-gel, a flexibilidade dos processos de síntese, a estabilidade mecânica dos materiais produzidos, a possibilidade de controlar a sua porosidade, bem como o facto de permitirem a fácil imobilização das enzimas retendo a sua atividade enzimática [Avnir *et al.*, 1994; Dave *et al.*, 1994; Gill, 2001; Collinson *et al.*, 2002; Carturan *et al.*, 2004].

No contexto da imobilização de enzimas e de outros componentes biológicos, os materiais de sol-gel têm-se demonstrado bastante vantajosos devido à sua capacidade de retenção de um alto teor de água, o que promove a estabilidade a longo prazo da enzima, e do facto do processo de imobilização poder ser realizado à temperatura ambiente [Avnir *et al.*, 1994; Dave *et al.*, 1994; Gill, 2001; Collinson *et al.*, 2002; Carturan *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2002; Brinker *et al.*, 1990; Alfaya *et al.*, 2002].

Existem quatro abordagens diferentes no que diz respeito à imobilização de enzimas numa matriz de sol-gel: o aprisionamento da enzima na matriz de sol-gel, a ligação da enzima à

superfície de um precursor organicamente modificado, a imobilização da enzima numa configuração de sanduiche e a imobilização de enzimas numa configuração em bicamada— Figura 1.17 [Tripathi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2000 (c); Liu e Sun, 2007; Narang *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2004].

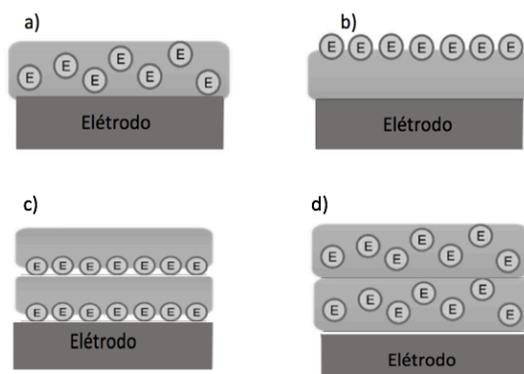


Figura 1.7 - Esquema das diferentes abordagens da imobilização de enzimas em sol-gel. a) Aprisionamento da enzima na matriz de sol-gel; b) Ligação da enzima à superfície de um precursor organicamente modificado; c) Método de sanduiche; d) Configuração em bicamada (reproduzida com modificações) [adaptado de Tripathi *et al.*, 2006].

Na literatura encontra-se informação quanto ao uso da matriz de sol-gel nos mais diversificados eletrodos de trabalho. Os mais comuns são de metais, como o ouro, e diferentes tipos de eletrodos de carbono, em particular grafite, pasta de carbono, carbono vítreo, e filmes de carbono [Lee *et al.*, 2000 (b); Wang *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Sampath e Lev., 1996; Wang *et al.*, 2000 (a); Pauliukaite *et al.*, 2005; Pauliukaite *et al.*, 2006; Pauliukaite *et al.*, 2008 (a); Pauliukaite *et al.*, 2008 (b)]. Assim, o aprisionamento de biomoléculas em sol-gel permite a conversão de materiais biológicos lábeis em nanocompósitos reutilizáveis e físico-quimicamente robustos, que podem ser integrados em plataformas espectroscópicas e eletroquímicas para gerar biossensores. A estrutura porosa da matriz de sílica garante à biomolécula um aprisionamento eficaz, permitindo que espécies pequenas (i.e., os analitos) possam aceder aos centros bioativos [Walcarius e Collinson, 2009].

No presente trabalho pretende-se imobilizar o sistema bienzimático de remoção de oxigénio molecular, baseado na glucose oxidase e catalase, assim como a ccNiR numa matriz de sol-gel, no qual este seria o biossensor final e ideal de nitrito. O sol-gel foi preparado com a combinação de silicato de sódio - Figura 1.8A e polietilenoglicol (PEG) - Figura 1.8B.

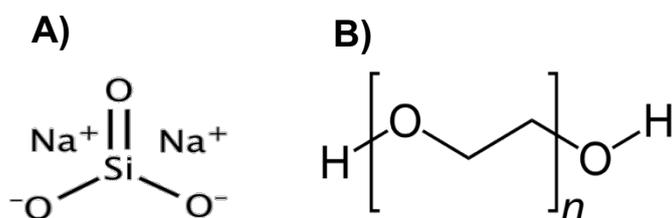


Figura 1.8 - Estruturas químicas dos componentes do sol-gel utilizado nesta tese. A) Silicato de sódio; B) Polietilenoglicol.

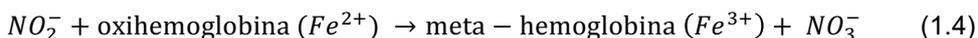
## 1.2 Biossensores de nitrito

### 1.2.1 Ocorrência/Importância/Riscos – Nitratos e Nitritos

As principais fontes de exposição alimentar do Homem, a nitratos e nitritos incluem peixes e carnes processadas e outros produtos fumados aos quais se adicionam nitratos e/ou nitritos (conservação de alimentos), vegetais (como alface, espinafres, couves, brócolos, etc.), e ainda a água de locais contaminados por nitratos com origem na agricultura intensiva com recurso a fertilizantes. Os vegetais são a principal fonte de nitratos (80-95%), enquanto os produtos processados e curados são a principal fonte de nitritos [Pennington, 1998; Santamaria, 2006]. Na conservação dos alimentos, os nitratos e nitritos são adicionados como aditivos, tendo como principais funções: dar cor e sabor aos alimentos e inibir o crescimento da bactéria *Clostridium botulinum* (responsável por um tipo de intoxicação alimentar conhecida como botulismo) [Azeredo, 2012].

Nos últimos anos, o aumento da exposição a nitratos e nitritos na alimentação humana tem dado origem a um interesse crescente na determinação dos teores destes iões em produtos alimentares. Isto deve-se aos potenciais efeitos adversos na saúde humana e animal dos nitritos derivados da redução de nitratos [Romitelli *et al.*, 2007; Chan, 2011; Fewtrell, 2004; WHO, 2011]. A principal preocupação com o nitrato é o seu potencial de conversão endógena em nitrito e nitrosaminas, que são potenciais causadores de doenças agudas e crónicas, tais como a meta-hemoglobinemia, distúrbios da tiróide e carcinogénese [Bahadoran *et al.*, 2015; Fewtrell, 2004; Gilchrist *et al.*, 2010 (a)].

A meta-hemoglobinemia é uma condição clínica rara originada pela entrada de uma concentração elevada de nitrito, na corrente sanguínea, que ao reagir com a hemoglobina (Hb) origina meta-hemoglobina, que é incapaz de se ligar ao oxigénio impedindo assim que ocorra o seu transporte normal no organismo. No decurso desta reação o átomo de ferro é oxidado, passando do estado  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  – Equação 1.4.



Esta condição leva a sintomas clínicos como a cianose (coloração azul da pele), quer em adultos, quer em crianças. Devido à diferença da acidez do líquido gástrico entre os adultos e os bebés (sendo que o dos bebés é menos ácido), e à reduzida atividade da enzima meta-hemoglobina redutase (que é responsável pela passagem da meta-hemoglobina a hemoglobina), os bebés tornam-se mais suscetíveis à cianose, podendo daí resultar asfixia e eventualmente morte, sobretudo em bebés com menos de 3 meses [Fraser, 1981; Santamaria, 2006; Hord, 2009; Dutt e Davis, 2002; Chan, 2011].

Outra grande preocupação para a saúde humana deve-se ao elevado consumo de carnes processadas, o que tem sido associado a um aumento do risco de cancro gástrico por vários autores. Recentemente, um estudo demonstrou também uma associação entre a exposição elevada a nitritos e o cancro da tiróide [Fewtrell, 2004; Larsson *et al.*, 2006; Kilfoy *et al.*, 2011; Aschebrook-Kilfoy *et al.*, 2013; Bahadoran *et al.*, 2015]. Por outro lado, foram publicados vários estudos que contradizem estas teorias e que não demonstram relações consistentes entre a exposição a nitrato e nitrito e qualquer tipo de cancro [Milkowski *et al.*, 2010; Inoue-Choi *et al.*, 2013; Bryan *et al.*, 2012]. Para além disto, as potenciais propriedades terapêuticas de nitrato e nitrito foram também já reportadas na literatura, o que provocou um interesse na sua aplicação na terapia clínica de várias condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, síndrome metabólica e a resistência à insulina [Ghasemi e Zahediasl, 2011; Ghasemi e Zahediasl, 2013; Kevil *et al.*, 2011; Kevil e Lefter, 2012; Lundberg *et al.*, 2008;

Machha e Schechter, 2011; Gilchrist e Benjamin, 2010; Machha e Schechter, 2012]. Desta forma, o conceito de risco-benefício da exposição alimentar ao nitrato/nitrito tem vindo a impulsionar o desenvolvimento de métodos práticos para a quantificação destes compostos [Gilchrist *et al.*, 2010 (a); Van Grinsven *et al.*, 2006].

### 1.2.2 Regulamentação

A segurança alimentar é um assunto de grande preocupação para os consumidores. Com base nos estudos relativos dos efeitos adversos do nitrato e nitrito na saúde, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu valores para a dose diária aceitável, que estão compreendidos entre 0 e 3,7 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dia para o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e entre 0 e 0,06 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dia para o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> [WHO, 2011]. Com a intenção de manter o teor de nitrosaminas o mais baixo possível, o Parlamento Europeu adotou a Diretiva 2006/52/CE com o objetivo de reduzir a quantidade de nitritos e de nitratos adicionados aos alimentos. Esta legislação comunitária foi transposta para a diretiva portuguesa através do Decreto-lei 33/2008, que estabelece as condições a que deve obedecer a utilização dos aditivos alimentares (DL 33/2008 de 25 de Fevereiro de 2008). A legislação em vigor determina que, nos produtos à base de carne, a quantidade de nitrito adicionada poderá ser no máximo igual a 150 mgkg<sup>-1</sup> de NaNO<sub>2</sub>. Para a água potável, a Diretiva Europeia 98/83/EC estabelece que os níveis máximos admitidos são de 50 mgL<sup>-1</sup> para nitrato, e de 0,1 mgL<sup>-1</sup> para o nitrito. A Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu para o nitrato o mesmo valor limite, permitindo ao nitrito um limite de 3 mgL<sup>-1</sup> [WHO, 2011].

### 1.2.3 Estado de Arte

Dado que o nitrito e nitrato estão presentes nos alimentos e água que consumimos, a sua deteção é extremamente importante. Assim, ao longo dos anos, tem havido um aumento significativo na procura por métodos analíticos para determinação de nitratos e nitritos. Contudo, as amostras ambientais, alimentares, industriais e fisiológicas têm uma elevada complexidade e possuem um grande número de potenciais interferentes, pelo que se torna difícil encontrar técnicas de quantificação compatíveis com os diferentes tipos de amostra [Moorcroft *et al.*, 2001].

Existem vários métodos de análise disponíveis para a determinação de iões de nitrito e nitrato: espectrofotometria UV-Vis (sendo o mais comum o método de Griess), espectrofotometria de fluorescência, eletroforese capilar, eletroquímica, cromatografia iónica e gasosa (associada a vários sistemas de deteção, tais como UV-Vis, fluorimetria, eletroquímica e espectrometria de massa), entre outros [Dutt e Davis, 2002; Moorcroft *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 1998; Bryan e Grisham, 2007; Helmke e Ducan, 2007; Pelletier *et al.*, 2006; Guevara *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008; Abha *et al.*, 2001]. De entre os métodos reportados destacam-se os espectrofotométricos que, pela simplicidade dos protocolos, disponibilidade da instrumentação e os baixos limites de deteção obtidos, são os mais usados. No entanto, os métodos eletroquímicos, têm-se demonstrado uma interessante alternativa, pois são capazes de fornecer limites de deteção baixos, oferecendo a possibilidade de análise direta das amostras sem a necessidade de ter que haver pré-tratamentos das mesmas, possibilitam ainda a análise de soluções coloridas ou com partículas sólidas em suspensão, e além disso, a instrumentação é menos dispendiosa quando comparada a outros equipamentos, como por exemplo, os utilizados em cromatografia [Silva *et al.*, 1996]. Já os sistemas de análise baseados em técnicas laboratoriais automatizadas, como a eletroforese capilar e cromatografia, necessitam muitas vezes de passos de preparação da amostra, antes de se realizar a análise (como por exemplo a ultrafiltração), têm tempos de resposta longos (10 - 30 minutos) e são de uso quase

exclusivamente laboratorial. Por estes motivos são preteridos relativamente aos métodos eletroquímicos [Larsen *et al.*, 2000]. De modo a ultrapassar as desvantagens que os métodos de deteção de nitratos e nitritos baseados em técnicas laboratoriais proporcionam, a área analítica procura ferramentas inovadoras e melhoradas, tais como os biossensores.

Na última década, a tecnologia de biossensores tem sido explorada para realizar quantificação confiável de nitrito em amostras complexas. Na maioria dos casos, a sua concentração é determinada utilizando dispositivos enzimáticos baseados em redutases de nitrito [Almeida *et al.*, 2010]. Relativamente ao método de transdução é possível encontrar uma ampla predominância de abordagens eletroquímicas na literatura, baseadas na voltametria e/ou amperometria e um pequeno número de trabalhos de investigação que recorrem a técnicas potenciométricas ou condutimétricas. Contudo, encontram-se também na literatura sistemas integrados que utilizam o método de transdução ótico, e a redutase de nitrito, *cd<sub>1</sub>NiR*, como elemento de reconhecimento biológico [Silveira, 2011; Silveira *et al.*, 2010 (a); Almeida *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2010 (b); DaSilva *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2007 (b); Ferretti *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2002].

A utilização de enzimas redutoras de nitrito altamente seletivas, ativas e estáveis, isoladas em diversas espécies bacterianas, melhorou os valores de sensibilidade, intervalo linear e seletividade da resposta analítica nos biossensores pretendidos, aumentando o interesse por parte dos investigadores sobre estes.

A Tabela 1.1 resume alguns dispositivos propostos na área dos biossensores de nitrito baseados em redutases do nitrito citocromo *c*, desde 1995 até à presente data. Os biossensores enzimáticos capazes de quantificar os nitritos (Tabela 1.1), podem ser classificados de acordo com o método de transdução de sinal utilizado (maioritariamente eletroquímico), com o tipo de enzima que possuem e com o tipo de resposta fornecido (mediada ou direta).

A revisão bibliográfica apresentada demonstra que os biossensores propostos usam maioritariamente transdução por amperometria ou voltametria, encontrando-se também trabalhos com transdução ótica ou potenciométrica [Ferreti *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2002; Kiang *et al.*, 1975]. A informação relatada na literatura refere o uso predominante da transferência eletrónica mediada (apesar da existência de trabalhos com transferência eletrónica direta), i.e., com recurso a mediadores redox (como por exemplo, derivados de viologénio), que exibem uma resposta eletroquímica rápida e reversível e são capazes de transportar rapidamente os eletrões para os centros redox das proteínas [Silveira, 2011]. As várias propostas apresentadas na Tabela 1.1 baseiam-se na mistura de polímeros/ redutase de nitrito citocromo *c* (*ccNiR*) sobre a superfície de elétrodos, com vista ao aprisionamento simultâneo desta enzima e mediadores.

Tabela 1.1 -Descrição e parâmetros analíticos de biossensores baseados na redutase de nitrito citocromo c (MET – Transferência eletrônica mediada; DET – transferência eletrônica direta; N.D.- não determinado).

Enzima	Fonte	Preparação do sensor	Modo de Transdução	Transferência eletrônica	Intervalo linear	Sensibilidade	Referência
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de enzima + poliacrilamida (mediador na solução)	Voltamétrico	MET	Até 200 µM	N.D.	[Scharf <i>et al.</i> , 1995]
	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de enzima + poliacrilamida	Voltamétrico	DET	Até 200 µM	N.D.	[Scharf <i>et al.</i> , 1995]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	GC / dispersão de mistura de poli (pirrolo-viologénio) + enzima seguida de electropolimerização	Voltamétrico	MET	5,4–43,4 µM	1721 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[DaSilva <i>et al.</i> , 2004]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de Nafion + enzima/ incorporação do mediador	Voltamétrico	MET	75–800 µM	445 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Almeida <i>et al.</i> , 2007]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	GC / deposição de [ZnCr-AQS] + enzima / ligação covalente com vapor de gluteraldeído	Amperométrico	MET	0,015–2,350 µM	1824 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Chen <i>et al.</i> , 2007]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	Ouro / deposição de Nafion + enzima + mediador + glicerol + BSA/ ligação covalente com gluteraldeído	Condutimétrico	MET	0,2–120 µM	0,194 µSµM <sup>-1</sup>	[Zhang <i>et al.</i> , 2009]

<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	Grafite pirolítica / deposição de EETMS sol/ deposição de enzima	Amperométrico	DET	0,25–50 µM	430 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Silveira <i>et al.</i> , 2010]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	Grafite / deposição de dispersão de nanotubos de carbono "single-walled" / deposição de enzima	Voltamétrico	DET	Até 150 µM	2400 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Silveira <i>et al.</i> , 2010]
<b>ccNiR</b>	<i>D. desulfuricans</i>	Tinta condutora de carbono/enzima	Voltamétrico	DET	0,7–370 µM	0,55 AM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Monteiro <i>et al.</i> , 2015]
<b>ccNiR</b>	<i>S. deleyianum</i>	Compósito de grafite + mediador/deposição de enzima + membrana de hidrogel de poli(carbamoil surfonato)	Amperométrico	MET	Até 250 µM	446,5 mAM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup>	[Strehlitz <i>et al.</i> , 1996]

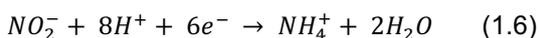
## 1.2.4 NIR's

Tal como demonstrado na seção anterior (seção 1.2.3), as enzimas redutase de nitrito (NiRs) são candidatas inatas para desempenhar o papel de elementos de bioreconhecimento biológico nos biossensores de nitrito. Trata-se de uma categoria de proteínas que catalisam a redução de nitrito por duas vias distintas: *ammonia forming* (produtoras de amônia), originando como produto final da reação amônia ( $\text{NH}_4^+$ ); e *NO forming* (produtoras de óxido nítrico) sendo que o produto final da reação é o óxido nítrico (NO). Estas duas categorias de redutases de nitrito podem também ser subdivididas tendo em conta o tipo de cofator que possuem [Almeida *et al.*, 2010].

Existem dois tipos de NiRs, que catalisam a reação de redução do nitrito a óxido nítrico (equação 1.5): i) as redutases de nitrito de cobre (CuNiRs), que contêm centros de cobre do tipo I ou tipo II, e ii) as redutases do nitrito citocromo  $\text{cd}_1$  ( $\text{cd}_1\text{NiRs}$ ), que possuem um hemo-tipo c e um hemo-tipo  $\text{d}_1$ . Estas enzimas estão envolvidas na desnitrificação bacteriana [Zumft, 1997; Atkins *et al.*, 2006; Wasser *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2001].



Os restantes dois tipos de NiR's, redutases do nitrito citocromo c (ccNiR) e NiR sirohémica, catalisam a redução de nitrito a amônia ( $\text{NH}_4^+$ ), de acordo com a seguinte equação:



O (ccNiR) são enzimas multihémicas geralmente isoladas a partir de bactérias redutoras de sulfato ou enxofre, e estão envolvidas no passo terminal do metabolismo energético anaeróbico do azoto, tendo um papel importante na respiração bacteriana e na conservação de energia. Estas enzimas foram isoladas a partir de diversas espécies de bactérias como por exemplo, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes*, *Sulfurospirillum deleyanum*, *Vibrio fisheri* e *Vibrio alginolyticus* [Rodrigues *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2003].

As redutases de nitrito sirohémicas constituem a segunda classe de NiRs que reduzem nitrito a amônia. Estas possuem um sirohemo e um centro de ferro-enxofre, e são usualmente isoladas a partir de organismos fotossintéticos como plantas, algas e cianobactérias [Kuznetsova *et al.*, 2004; Swamy *et al.*, 2005; Hirasawa *et al.*, 2010].

A enzima ccNiR usada neste trabalho, foi purificada a partir da proteobactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. A ccNiR é uma proteína que está associada à membrana periplasmática, e cuja produção é fortemente aumentada ao crescer a bactéria *Desulfovibrio desulfuricans*, num meio contendo nitrato [Costa *et al.*, 1990]. Para além do sulfato, estas bactérias têm a capacidade de utilizar uma ampla variedade de compostos inorgânicos como aceitadores de eletrões tais como nitrato, nitrito, tiosulfato e enxofre [Hansen, 1994]. A ccNiR é composta pelas subunidades NrfA e NrfH, de massa 61 a 19 kDa. A estequiometria *in vitro* do complexo purificado é de 2NrfA : 1NrfH (MM(ccNiR)=141 kDa) e *in vivo*, segundo Rodrigues, *et al.*, 2006 a estequiometria é 4NrfA: 2NrfH [Einsle *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2006]. Esta enzima não é uma proteína integral de membrana, sendo que a subunidade NrfA, o citocromo pentahémico catalítico, localiza-se no periplasma e está ancorada à membrana pela subunidade NrfH. A subunidade NrfH é um citocromo tetrahémico que constitui o doador eletrónico fisiológico da subunidade catalítica (está envolvida no processo de transferência de eletrões para a subunidade catalítica) [Cunha *et al.*, 2003]. A formação do complexo com as duas subunidades garante a transferência rápida de eletrões, evitando-se as limitações de difusão e *docking* (interação molecular de proteínas) de parceiros

redox [Einsle *et al.*, 1999]. A enzima tem um espectro UV-visível típico de citocromos do tipo c com máximos de absorção a 280, 409 e 534 nm na forma oxidada, e no estado reduzido a 420,5; 523,5 e 553,5 nm.

Na Figura 1.9 está representada a estrutura cristalográfica da ccNiR, onde se observam as 4 subunidades catalíticas, NrfA, e as 2 subunidades de transferência eletrônica, NrfH. Pressupõe-se que os homodímeros compactos da subunidade NrfA, constituem a forma funcional da subunidade catalítica. Os cinco grupos hemo de cada monómero de ccNiR estão em contato muito próximo, característico em enzimas redox. Esta disposição sugere a transferência eletrônica direta entre os grupos hemo, incluindo aqueles que se concentram na interface do dímero [Bamford *et al.*, 2002].

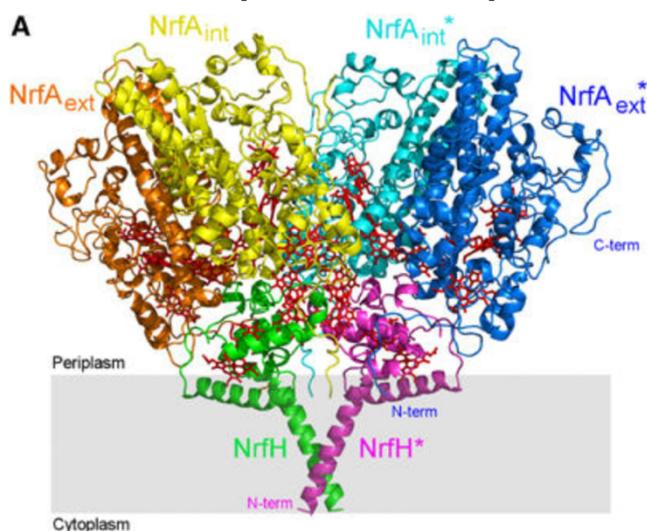


Figura 1.9 - Estrutura da redutase do nitrito de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough* com as suas sub-unidades [Rodrigues *et al.*, 2006].

O hemo 1 da subunidade catalítica constitui o centro ativo penta-coordenado da ccNiR e contém um resíduo de lisina como ligando proximal, em vez do habitual resíduo de histidina presente nos citocromos do tipo c. Este tipo de coordenação é exclusivo desta proteína e está apenas presente no hemo 1, sendo que os outros hemos da enzima apresentam o motivo de ligação típico dos hemos c, com histidinas como ligandos proximais e distais (coordenação bis-His). Estes grupos hemo são responsáveis pela transferência eletrônica [Bamford *et al.*, 2002]. O hemo 1, pode ser acessado por dois canais que comunicam com a superfície da proteína, os canais de substrato e de produto. Os aniões como o nitrito chegam ao centro ativo pelo canal de entrada de substrato, que tem uma carga eletrostática positiva. O produto fisiológico da reação, o catião amónia, passa por um segundo canal localizado no lado oposto do canal de entrada de substrato, cuja superfície apresenta uma carga eletrostática predominante negativa. Estas características eletrostáticas são consideradas importantes para atrair os iões de nitrito negativamente carregados, ao centro ativo, e para levar os iões de amónia positivamente carregados, para o exterior da enzima, sendo uma das possíveis justificações para a elevada eficiência catalítica da ccNiR. Os resíduos que compõem a cavidade do centro ativo garantem um potencial eletrostático positivo, o que facilita a permanência de aniões intermediários, que se vão formando ao longo da reação, na cavidade.

Além da conversão do nitrito a amónia, a ccNiR catalisa também a redução de NO e de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH), que são possíveis intermediários da redução catalítica do nitrito, com atividades específicas de 1,2% e 50% relativamente à atividade para o nitrito [Bamford *et al.*, 2002]. Esta enzima apresenta também atividade vestigial para a redução do sulfito [Pereira *et al.*, 1996].

## 1.3 Biossensores de Glucose

### 1.3.1 Importância

A glucose é um hidrato de carbono simples (monossacarídeo), sendo o açúcar mais importante no metabolismo humano. O valor médio de glucose no sangue humano é de 72 mg/dL, sendo que este valor pode variar ao longo do dia. Os valores anormais da concentração de glucose no sangue podem ser indicativos da alteração do estado de saúde ou de alguma doença, como por exemplo a diabetes [<http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>]. A diabetes é uma doença crónica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina ou quando o organismo não consegue utilizar a insulina produzida, o que pode levar ao desenvolvimento de uma série de problemas de saúde incapacitantes ou mesmo fatais [<http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>]. Apesar de não haver cura para esta doença, o principal tratamento passa por manter os níveis de glucose no sangue dentro de limites aceitáveis (inferior a 180 mgdL<sup>-1</sup>). Além disso, sabe-se que monitorização contínua da glucose no sangue reduz, a longo-prazo, as complicações causadas pela doença e, conseqüentemente, o sofrimento humano resultante destas complicações, bem como os custos económicos associados à monitorização, controlo e intervenção médica [<http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>; Mealey e Oates, 2006]. Para uma melhor qualidade de vida dos pacientes, desde cedo tentou-se desenvolver dispositivos precisos e autónomos, capazes de medir os níveis de glucose *in situ* e em tempo real.

### 1.3.2 Monitorização da glucose

Os níveis de glucose no sangue podem, atualmente, ser monitorizados usando diferentes tipos de dispositivos. Todos os testes de deteção da glucose disponíveis comercialmente, sejam eletroenzimáticos ou colorimétricos, baseiam-se na quantificação da reação de oxidação da glucose catalisada pela enzima GOx [Steine *et al.*, 2011]. Existem vários métodos de espectroscopia utilizados para a quantificação da glucose *in vivo*, tais como a espectroscopia de fluorescência (GOx e sensores fluorescentes), espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de Raman e a deteção colorimétrica de glucose [Coté e McNichols, 2003]. Ao longo dos anos, os testes eletroquímicos ganharam vantagem por várias razões, incluindo a precisão e a capacidade de medir a glucose em volumes de sangue extremamente pequenos. Atualmente a grande maioria dos testes presentes no mercado compreende estas vantagens [Heller e Feldmand, 2008; Steiner *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2011].

### 1.3.3 Enzima GOx

Os biossensores eletroquímicos de glucose são baseados, em geral, em uma das três enzimas; hexoquinase, glucose-oxidase (GOx) ou glucose-desidrogenase (GDH) [Price, 2003]. Devido à sua fácil obtenção, ao seu custo relativamente baixo e à sua grande estabilidade, a GOx é a enzima mais amplamente utilizada como agente de reconhecimento biológico para a determinação da glucose [Bankar *et al.*, 2009].

A GOx é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da  $\beta$ -D-glucose em D- glucono- $\delta$ -lactona e peróxido de hidrogénio, utilizando oxigénio molecular como recetor de eletrões. As fontes microbianas mais comuns para a produção de GOx são *Aspergillus*, *Penicillium*, e as espécies

*Saccharomyces* [Bankar *et al.*, 2009]. A GOx utilizada no presente trabalho é originária do *Aspergillus niger* tipo II. O pH tem um papel importante na manutenção da estrutura apropriada da GOx, sendo que o pH ótimo para esta enzima, se situa entre 5,0 a 7,0. Outro parâmetro essencial na atividade desta enzima é a temperatura; para a GOx originária de *A. niger* a temperatura ótima situa-se entre os 40 e os 60 °C [Bankar *et al.*, 2009].

A GOx contém o cofactor redox dinucleótido de flavina e adenina (FAD). Este funciona inicialmente como aceitador de eletrões e é reduzido a FADH<sub>2</sub> durante o ciclo catalítico da enzima. O cofactor é regenerado por reação com o oxigénio, conduzindo à formação de peróxido de hidrogénio – Figura 1.10.

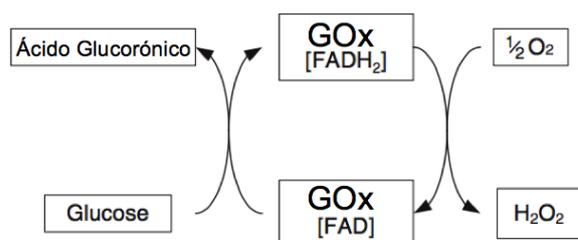


Figura 1.10 - Diagrama esquemático das reações da GOx.

### 1.3.4 Estado de Arte

Desde os primeiros trabalhos realizados na década de 60, o desenvolvimento de biossensores de glucose tem vindo a ser explorado, de forma a obter biossensores de baixo custo e confiáveis, com uma alta sensibilidade e seletividade. Os biossensores de glucose baseados na GOx têm sido bastante estudados ao longo dos anos devido à elevada procura de métodos para a monitorização fiável e sensível de glucose no sangue, quer no contexto de análises clínicas como na investigação. [Rahman *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2016].

Para a criação de novos biossensores de glucose, foram desenvolvidos numerosos processos e metodologias (secção 1.3.2), sendo que nos últimos 40 anos os biossensores de glucose eletroquímicos têm atraído maior atenção devido à sua sensibilidade e seletividade. [Rahman *et al.*, 2010].

A Tabela 1.2 apresenta alguns biossensores eletroquímicos de glucose, reportados nos últimos quatro anos, que fazem uso da enzima GOx, como elemento de bioreconhecimento, imobilizada em diversos tipos de matrizes. Para além destes dispositivos (Tabela 1.2), é possível encontrar vários outros trabalhos relatados na literatura, porque as áreas médicas e farmacêuticas têm investido cada vez mais no desenvolvimento de biossensores para a deteção da glucose devido ao aumento do número de pessoas com diabetes [http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html; Yoo, e Lee, 2010].

Tabela 1.2 - Descrição e parâmetros analíticos de alguns biossensores eletroquímicos de glicose apresentados nos últimos quatro anos na literatura, utilizando a enzima GOx para determinação de glicose.

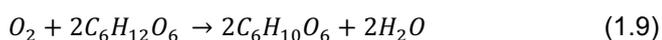
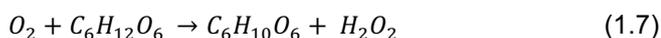
Enzima	Preparação do Sensor	Intervalo Linear (mM)	Sensibilidade ( $\mu\text{AmM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	Tempo de resposta (s)	Referência
GOx	GOx imobilizada com FAD e poli(ácido tiofeno-3-borónico) (PTBA)	0,5 - 18	2140	5	Şenel <i>et al.</i> , 2013
GOx	GOx imobilizada com óxido de grafeno reduzido (RGO)	0,1 - 27	1,85	5	Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2013
GOx	GOx imobilizada com óxido de grafeno – multicamada de nanotubos de carbono (ERGO-MWCNT)	0,01 – 6,5	7,95	5	Mani <i>et al.</i> , 2013
GOx	GOx imobilizada com óxido de grafeno reduzido (RGO)	0,1 - 27	1,85	-	Unnikrishnan <i>et al.</i> , 2013
GOx	GOx imobilizada com <i>nanorods</i> de dióxido de titânio (TCS-TiO <sub>2</sub> )	0,005 – 1,32	0,0232	3	Yang <i>et al.</i> , 2014
GOx	GOx imobilizada com multicamada de nanotubos de carbono – óxido de grafeno (MWCNT/GO)	0,05 – 23,2	0,266	11	Palanisamy <i>et al.</i> , 2014
GOx	GOx imobilizada com nanopartículas de quitosano	0,001 - 1	156,27x10 <sup>6</sup>	2	Anusha <i>et al.</i> , 2015

GOx	Quitosano/GOx/cadeias de grafite modificadas com azul de Prússia (PB-G)	0,03 - 1	641,3	3	Lee <i>et al.</i> , 2015
GOx	GOx imobilizada com nanopartículas de ouro eletrodepositadas em PVP-PANI/Nafion	0,05 – 2,25	9,62	-	Miao <i>et al.</i> , 2015
GOx	GOx imobilizada com ouro nanoporoso	0,05 - 10	12,1	-	Wu <i>et al.</i> , 2015
GOx	GOx imobilizada com compósito de grafeno (GR)/MnO <sub>2</sub>	0,04 - 2	3,3	-	Liu <i>et al.</i> , 2016
GOx	GOx imobilizada com um nanocompósito de ouro (Au/MXene/Nafion)	0,1 - 18	4,2	-	Rakhi <i>et al.</i> , 2016
GOx	GOx imobilizada com sulfeto de estanho revestido com carbono (SNS)	0,03 – 0,7	4,39x10 <sup>4</sup>	7	Chung <i>et al.</i> , 2017
GOx	GOx imobilizada com óxido de grafeno conjugado com nanopartículas magnéticas (RGO-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	0,05 - 1	5,9	3	Pakapangpan e Poo-arporn, 2017

## 1.4 Sistema de remoção de oxigénio

A maioria dos biossensores eletroquímicos baseados em redutases são utilizados em condições anaeróbias, sendo a eliminação do oxigénio do eletrólito realizada através do borbulhamento com um gás inerte (árgon ou azoto). A remoção do oxigénio é determinante, pois este pode contribuir para a corrente medida no potencial de trabalho, e pode ainda oxidar a superfície do eletrodo e reagir com os reagentes e/ou produtos da reação em estudo [Rodrigues, 2013].

Trabalhar em condições anaeróbias é uma desvantagem que limita a aplicação de redutases em biossensores usados fora do meio laboratorial, e como tal é importante desenvolver métodos alternativos para a remoção do oxigénio nas amostras a analisar. Mas para ser um sistema de remoção de oxigénio tão eficaz como a remoção com gás inerte, este sistema terá que ser capaz de assegurar as condições anaeróbias durante todo o ensaio, não interferir com o processo eletroquímico nem com o elemento de bioreconhecimento ou com os mediadores envolvidos na quantificação do analito, apresentar uma rápida cinética de redução do oxigénio, para minimizar o tempo de espera necessário para atingir as condições anaeróbias e ser autónomo, i.e., não necessitando de equipamento especializado [Plumeré *et al.*, 2012]. Assim, Plumeré *et al.*, (2012) aplicou num biossensor amperométrico de nitrato um sistema capaz de remover o oxigénio do eletrólito baseado nas enzimas glucose-oxidase (GOx) e catalase (Cat). Este sistema de captação de oxigénio permite trabalhar com a célula eletroquímica aberta, em contacto com o ar [Plumeré *et al.*, 2012]. A GOx catalisa a oxidação da glucose na presença de oxigénio e liberta peróxido de hidrogénio (Equação 1.7). De seguida, num segundo passo, o peróxido de hidrogénio resultante da reação (1.7) é desproporcionado em água e oxigénio, reação catalisada pela enzima catalase (Equação 1.8). As moléculas de oxigénio regeneradas pela catalase são ainda reduzidas pela oxidase. Na reação global (1.9), duas moléculas de glucose são necessárias para a redução de uma molécula de oxigénio.



O sistema de remoção de  $O_2$  consegue assim remover o oxigénio dissolvido no eletrólito, enquanto que os reagentes, os catalisadores, os intermediários da reação e produtos envolvidos na reação de redução do oxigénio – Figura 1.11 - não são detetados electroquimicamente [Plumeré *et al.*, 2012].

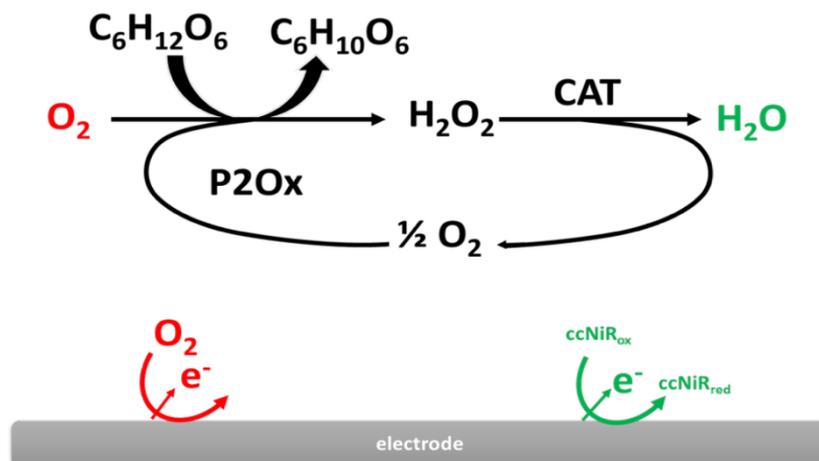


Figura 1.11 - Esquema do sistema de remoção de  $O_2$  GOx-Catalase [Rodrigues, 2013].

No presente trabalho, este sistema foi primeiro utilizado para a remoção do oxigênio em solução, e numa segunda parte tentou-se imobilizar este sistema numa matriz de sol-gel, e desta forma explorar o seu funcionamento quando imobilizado na superfície do eletrodo. A atividade das enzimas que o integram foi também estudada, o que deu origem a um sistema de deteção de glucose.

## 1.5 Objetivos

No seguimento de trabalhos anteriormente realizados no nosso grupo de investigação sobre o desenvolvimento de biossensores amperométricos para a deteção de nitrito usando a enzima redutase de nitrito (ccNiR) de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, e tendo-se obtido resultados preliminares promissores com a imobilização da enzima na presença de surfactantes, o primeiro objetivo deste trabalho consistiu em fazer uma otimização dos parâmetros analíticos do biossensor através da escolha de um eletrólito de suporte e uma matriz de imobilização adequada (surfactantes, o polímero PEG 400 e sol-gel). Para tal, a resposta do biossensor ao nitrito foi avaliada em termos da sua sensibilidade, e gama de linearidade.

O segundo objetivo deste trabalho, foi realizar a imobilização de cada uma das enzimas do sistema de remoção de  $O_2$  (GOx e catalase) na superfície do PGE com a matriz de sol-gel isoladamente e em conjunto, testando-se várias configurações de eletrodo.

Por fim, foi realizado a imobilização deste mesmo sistema, assim como da ccNiR, na matriz de sol-gel.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e proteínas

O ácido clorídrico ( $36,46 \text{ g mol}^{-1}$ ;  $\geq 37\%$ ), o Trizma® base ( $121,14 \text{ g mol}^{-1}$ ), o fosfato de potássio dibásico trihidratado ( $228,22 \text{ g mol}^{-1}$ ), o fosfato de sódio monobásico ( $119,98 \text{ g mol}^{-1}$ ), o hidróxido de sódio ( $40 \text{ g mol}^{-1}$ ), o n-dodecil-sulfato de sódio (SDS,  $288,4 \text{ g mol}^{-1}$ ), a glucose ( $180,16 \text{ g mol}^{-1}$ ), o polietilenoglicol 400 (PEG 400,  $d = 1,128 \text{ g mL}^{-1}$ ), e a solução de silicato de sódio ( $d = 1,39 \text{ g mL}^{-1}$ ) foram obtidos da Sigma Aldrich. O cloreto de potássio ( $74,55 \text{ g mol}^{-1}$ ) e o nitrito de sódio ( $69 \text{ g mol}^{-1}$ ) foram adquiridos à VWR. O n-dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo (DDM,  $510,6 \text{ g mol}^{-1}$ ) foi adquirido à Calbiochem®. O ácido sulfúrico ( $d = 1,84 \text{ g cm}^{-3}$ ) foi adquirido à Panreac.

A catalase (proveniente de fígado de bovino;  $5000 \text{ U mg}^{-1}$  sólido), a glucose oxidase (GOx) (originária de *Aspergillus niger* tipo II,  $17300 \text{ U g}^{-1}$  sólido), e o citocromo c (originário de coração de cavalo;  $12,384 \text{ kDa}$ ) foram obtidos à Sigma Aldrich.

As soluções foram preparadas com água desionizada ( $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ ) obtida com um sistema Millipore da Milli-Q.

#### 2.1.1 Preparação das soluções

As soluções de Tris-HCl e KCl foram preparadas com Trizma® base e cloreto de potássio, tendo-se acertado o pH a 7,6 com ácido clorídrico. O tampão PB foi preparado a partir da mistura de 100 mM fosfato de sódio monobásico com 100 mM fosfato de potássio dibásico trihidratado até atingir o valor de pH desejado.

As soluções padrão de nitrito de sódio (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mM) foram preparadas em 2 mM hidróxido de sódio para prevenir a degradação do nitrito.

### 2.2 Quantificação da enzima ccNiR

A redutase do nitrito (ccNiR) disponibilizada para a realização desta tese foi purificada de acordo com o método usado por Almeida (2003) [Almeida, 2003]. O conteúdo proteico foi determinado com o kit *BIO-RAD Protein Assay (BIO-RAD)*, baseado no método de Bradford; este emprega o corante *Coomassie® Brilliant Blue G-250*, cujo máximo de absorção se desloca de 465 para 595 nm quando ligado à proteína. Utilizou-se citocromo c como padrão [Bradford, 1976].

Foram testados 3 lotes de enzima (numerados em laboratório) sendo que no lote VII obteve-se um conteúdo proteico de  $0,955 \text{ mg mL}^{-1}$ , no lote V  $1,962 \text{ mg mL}^{-1}$  e no lote C  $2,275 \text{ mg mL}^{-1}$ ; os diferentes lotes foram preservados a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  em tampão PB 100 mM, pH 7,6. Após a realização de ensaios preliminares com os vários lotes de enzima, selecionou-se o lote V para o restante trabalho experimental.

### 2.3 Eletroquímica

Os ensaios de voltametria cíclica foram realizadas num potenciostato *Autolab PGSTAT12 da Eco-Chemie*, controlado através do *software GPES 4.9*. Utilizou-se uma velocidade de varrimento de  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ , numa janela de potencial de  $-0,1$  a  $-0,8 \text{ V vs Ag/AgCl}$  (salvo indicação contrária). Para a determinação dos valores de corrente de pico utilizaram-se as ferramentas

de análise do *software* GPES, traçando-se linhas de base manuais lineares, para cada voltamograma. No caso do biossensor de nitrito, as correntes catalíticas foram determinadas no potencial de inversão (-0,8 V vs Ag/AgCl), e no biossensor de glucose, foram determinadas no pico catódico dos voltamogramas.

### 2.3.1 Célula eletroquímica

Os ensaios de eletroquímica foram realizados numa célula de vidro de um único compartimento com um sistema convencional de três elétrodos. Para assegurar a completa remoção de nitrito residual entre cada ensaio, a célula eletroquímica foi primeiro lavada com uma solução de ácido sulfúrico (32% (m/V)) durante 5 minutos, seguida de nova lavagem com água desionizada e secagem com ar comprimido.

Foi usado um elétrodo de trabalho de grafite pirolítica basal (PGE,  $\varnothing=3$  mm), fabricado no laboratório com grafite adquirida à *GE Quartz*, um elétrodo de referência de Ag/AgCl e um contra-elétrodo de platina em fio (Pt) que foram fornecidos pela *Radiometer* (Figura 2.1).

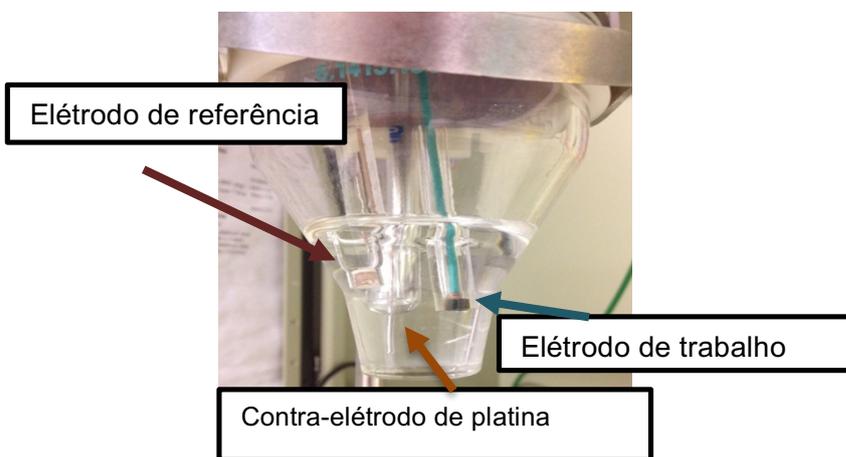


Figura 12.1 -Célula eletroquímica com o sistema convencional de 3 elétrodos, usada neste trabalho.

Em alternativa, foram usados elétrodos *Screen-Printed* de pasta de carbono (SPE,  $\varnothing = 4$  mm) - DRP-C110, adquiridos à *DropSens*, que incluem, num mesmo suporte de porcelana, o elétrodo de trabalho, o contra-elétrodo (ambos de pasta de carbono) e o elétrodo de referência. Os resultados referentes a estes ensaios encontram-se no anexo B.

### 2.3.2 Eletrólito suporte

Os ensaios foram realizados em 10 mL de eletrólito suporte à temperatura ambiente ( $22\pm 3$  °C), salvo indicação contrária. Foram testadas 3 soluções diferentes: Tris-HCl 100 mM pH 7,6 e KCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e KCl 100 mM e tampão fosfato (PB) 100 mM, pH 7,6. Para a remoção do oxigénio do eletrólito suporte, utilizaram-se dois métodos distintos.

a) Borbulhamento com um gás inerte – árgon

O eletrólito suporte foi desarejado através do borbulhamento com árgon durante 15 minutos, antes do início dos ensaios, tendo-se mantido a atmosfera de árgon no interior da célula eletroquímica durante a realização dos mesmos.

#### b) Sistema de remoção de O<sub>2</sub>

Antes da realização dos ensaios, foram adicionadas GOx (15 UmL<sup>-1</sup>), Cat (2000 UmL<sup>-1</sup>) e glucose (80 mM) ao eletrólito suporte. A solução foi agitada durante 15 minutos para promover a remoção do oxigénio. A cat foi preparada a uma concentração de 50000 UmL<sup>-1</sup>, a glucose a 1 M, e a GOx a 375 UmL<sup>-1</sup> em tampão PB 100 mM, pH 7,6.

## 2.4 Preparação do eléctrodo de trabalho

### 2.4.1 Limpeza

Os eléctrodos de trabalho (PGE) foram limpos através do polimento da sua superfície, antes de cada ensaio, sobre um material aveludado com uma suspensão de partículas de óxido de alumina ( $\varnothing = 0,3 \mu\text{m}$ , *Buehler*), seguido de lavagem com água desionizada. O eléctrodo foi mergulhado em água desionizada e colocado num aparelho de ultrassons durante 5 minutos, para remover vestígios de alumina, novamente lavado com água desionizada e por fim seco com ar comprimido.

### 2.4.2 Imobilização das enzimas

As enzimas (ccNiR, GOx e Cat) foram imobilizadas no eléctrodo de trabalho separadamente, isoladas ou em misturas, com agentes de imobilização. O procedimento consistiu na deposição de uma gota de enzima (ou misturas) na superfície do eléctrodo, deixando-se secar ao ar durante cerca de 45 minutos. Em alternativa a enzima e os agentes de imobilização foram aplicados sequencialmente em camadas na superfície do eléctrodo. Após a secagem do material depositado no eléctrodo, este foi usado de imediato. As várias configurações de eléctrodo preparadas e respetivos métodos de imobilização são descritos de seguida.

#### A) Biossensores de nitrito – imobilização da ccNiR

- Adsorção simples

O eléctrodo foi modificado com uma gota de solução de ccNiR, contendo 41,8 pmol de proteína, depositada na superfície do eléctrodo.

- Em detergentes
  - **n-dodecil- $\beta$ -D-maltosídeo (DDM) e n-dodecil-sulfato de sódio (SDS)**

A enzima foi misturada com os surfactantes, numa concentração correspondente a duas vezes a sua concentração micelar crítica (0,18 mM para DDM, 8,1 mM para SDS), e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente ( $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Seguidamente, uma gota de 3  $\mu\text{L}$  da mistura,

contendo 33,3 pmol de ccNiR, foi aplicada no elétrodo de trabalho (PGE).

- Em Polietilenoglicol 400

A enzima foi imobilizada na presença de 6% (v/v) PEG 400, tendo-se seguido o procedimento utilizado com os surfactantes SDS e DDM.

- Em sol-gel

O sol-gel foi preparado a partir de uma mistura de silicato de sódio 57 mM e PEG400 6% (v/v), cujo valor de pH foi ajustado para 7, com HCl.

De seguida, depositaram-se sequencialmente 3  $\mu$ L de ccNiR e 3  $\mu$ L da mistura de sol-gel na superfície do elétrodo de trabalho, deixando-se secar entre as deposições.

- Co-imobilização com as enzimas usadas no sistema bienzimático remoção de O<sub>2</sub>

Começou-se por imobilizar a ccNiR no PGE. De seguida depositaram-se 3  $\mu$ L da enzima do sistema de remoção de O<sub>2</sub>, GOx e/ou Cat, e por fim 3  $\mu$ L da mistura de sol-gel, deixando-se secar entre deposições.

## B) Sistema bienzimático remoção de O<sub>2</sub>

As enzimas do sistema bienzimático, GOx e Cat, foram imobilizadas no PGE com sol-gel. Para tal, depositaram-se 3  $\mu$ L de mistura das enzimas (contendo 150 e 1,1 U de Cat e de GOx, respetivamente) e 3  $\mu$ L da mistura de sol-gel, deixando-se secar entre cada aplicação. Em todas as situações a glucose foi adicionada à solução.

Foram testados diferentes métodos de deposição (misturas de enzima(s) e sol-gel em várias, camadas ou sanduiche e ordens de aplicação das enzimas e sol-gel no elétrodo, sendo que “/” simboliza uma camada e “+” significa que os componentes foram adicionados numa mistura, o que resultou na preparação das seguintes configurações:

- Em camadas:
  - a. PGE/GOx+sol-gel;
  - b. PGE/Cat+sol-gel;
  - c. PGE/GOx/Cat/sol-gel;
  - d. PGE/Cat/ GOx/sol-gel;
  - e. PGE/sol-gel/Cat/GOx;
  - f. PGE/sol-gel/GOx/Cat;
- Em sanduiche:
  - a. PGE/Cat+sol-gel/GOx+sol-gel;
  - b. PGE/GOx+sol-gel/Cat+sol-gel.
- Misturas:
  - a. PGE/Cat+GOx+sol-gel

### C) Biossensor de glucose – imobilização da GOx

- Com sol-gel

Para a preparação dos biossensores de glucose, depositaram-se 3  $\mu\text{L}$  de GOx (1,1 U) no PGE, deixando-se secar por 45 minutos. De seguida, foram depositados 3  $\mu\text{L}$  da solução de sol-gel, deixando-se secar novamente durante aproximadamente 1 hora.

## 2.5 Atividade dos bioelétrodos

### 2.5.1 Resposta ao nitrito

Previamente aos testes de atividade dos bioelétrodos, realizaram-se 15 voltamogramas cíclicos seguidos, até o sinal obtido ser reprodutível, i.e., até os voltamogramas serem sobreponíveis. Para avaliar a resposta do biossensor (modificado com ccNiR) ao nitrito, foram sucessivamente adicionados volumes de soluções padrão de nitrito de sódio (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 mM), à célula eletroquímica.

### 2.5.2 Resposta à glucose

Para avaliar a resposta do biossensor de glucose, foram realizadas adições de soluções padrão de glucose (0,1 e 1 M) preparadas previamente, à célula eletroquímica, contendo eletrólito suporte não desarejado. Entre cada adição, a solução foi agitada com uma barra de agitação magnética, durante 1 minuto, para promover a homogeneização.

## 2.6 Cálculo dos parâmetros analíticos e cinéticos dos biossensores

A sensibilidade da resposta dos biossensores de nitrito foi determinada a partir do declive da curva de regressão linear ajustada aos dados de variação de intensidade de corrente catalítica com a concentração de nitrito (no intervalo de resposta linear). Para o cálculo da sensibilidade, os valores de intensidade de corrente foram convertidos em densidade de corrente, utilizando para tal a área geométrica do eletrodo de trabalho, que no caso do PGE é de 0,071  $\text{cm}^2$ , e no caso do SPE é de 0,139  $\text{cm}^2$ . O intervalo de linearidade corresponde à gama de concentrações na qual a intensidade de corrente catalítica é proporcional à concentração de nitrito.

O desempenho dos biossensores, é geralmente avaliado considerando para o limite de deteção (LOD), para além da sensibilidade e do intervalo de linearidade. Contudo, os valores calculados no decorrer do trabalho com os diversos métodos de cálculo descritos na literatura, apresentavam-se bastante abaixo do limite inferior do intervalo de linearidade, tendo-se decidido não usar este parâmetro.

Os valores dos parâmetros cinéticos aparentes dos biossensores, referentes às constantes de *Michaelis-Menten* obtiveram-se utilizando o programa *GraphPad Prism v6.0* para o ajuste de dados.



## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Otimização do biossensor de nitrito

Na sequência dos resultados promissores anteriormente obtidos no nosso grupo de investigação e no âmbito do desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a deteção de nitrito baseados na enzima ccNiR (Silveira *et al.*, 2010(a); Monteiro *et al.*, 2015), a primeira etapa deste trabalho consistiu numa otimização mais fina dos parâmetros analíticos do biossensor de nitrito, em concreto, fez-se variar a composição do eletrólito suporte bem como se testou a incubação prévia da enzima em detergentes ou polímeros hidrofílicos.

#### 3.1.1 Eletrólito suporte

Em primeiro lugar, comparou-se a atividade dos biossensores em 3 eletrólitos suporte com o mesmo valor de pH, mas forças iónicas ligeiramente diferentes, nomeadamente Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM; Tris-HCl 50 mM pH 7,6 em 100 mM KCl, e PB 100 mM, pH 7,6. Nesta fase, a ccNiR foi imobilizada por adsorção física diretamente na superfície do elétrodo de grafite pirolítica (PGE) - Figura 3.1. O voltamograma cíclico mostrado na Figura 3.1 ilustra a resposta eletroquímica direta de ccNiR, na ausência de nitrito e usando Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM como eletrólito suporte. Tal como se pode ver, o voltamograma cíclico apresenta um pico catódico bastante largo e mal-resolvido, a cerca de  $-0,4$  V vs Ag/AgCl, que foi anteriormente atribuído à redução dos 14 grupos hemo da ccNiR por Almeida *et al.*, (2007), mas também poderá dever-se à redução de nitrito residual presente na célula eletroquímica [Almeida *et al.*, 2007]. Por sua vez, o pico de oxidação, centrado a cerca de  $-0,250$  V, é praticamente impercetível, pelo que o sistema eletroquímico é geralmente classificado como irreversível (Anexo A).

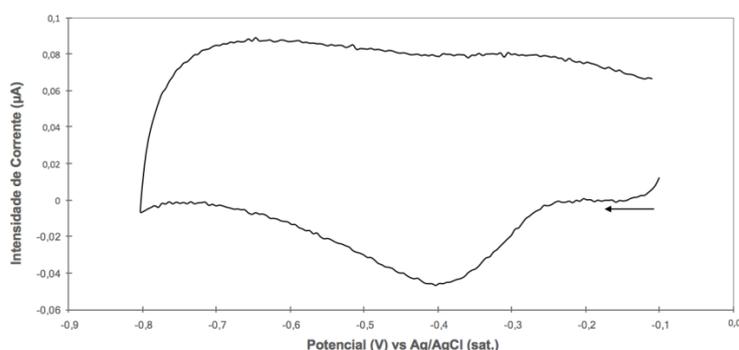


Figura 13.1 - Voltamograma cíclico do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR (41,8 pmol), na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM desarejado com árgon; velocidade de varrimento =  $0,05$  Vs<sup>-1</sup>.

A resposta eletroquímica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR, na presença de concentrações crescentes de nitrito, no eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, é demonstrada na Figura 3.2A.

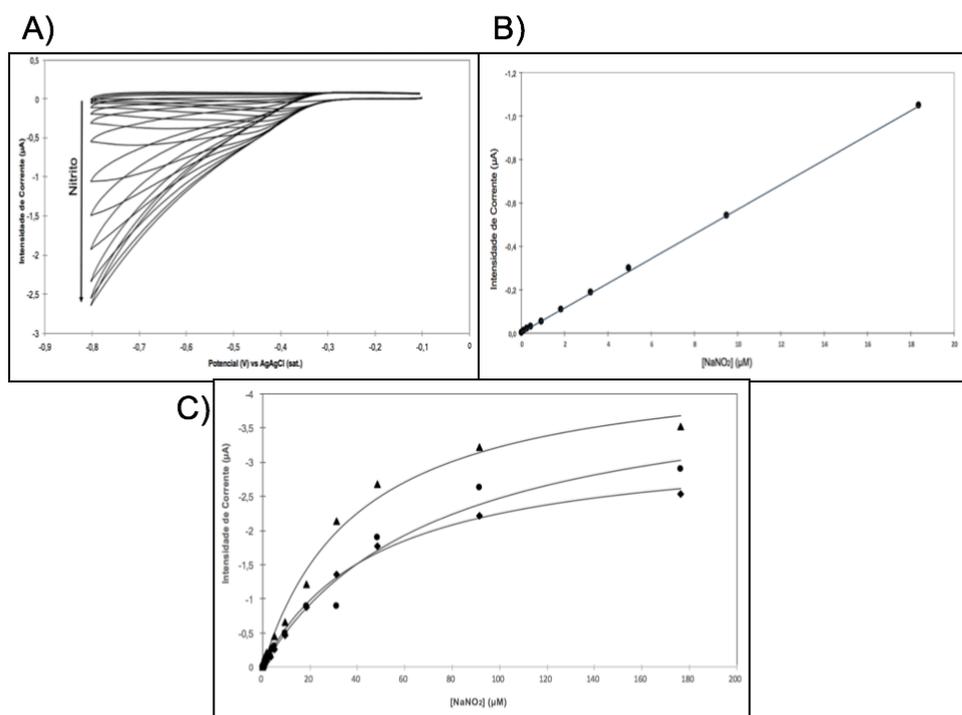
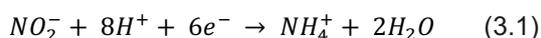


Figura 3.2 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR (41,8 pmol) obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 176,4 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, desarejado com argônio. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y = -0,057x - 1^{-9}$ ;  $r^2 = 0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com os diferentes eletrólitos testados (▲ - Tris-HCl 50 mM em KCl 100 mM; ◆ - Tris-HCl 100 mM em KCl 100 mM; ● - PB 100 mM). As linhas contínuas representam as simulações de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática.

Os voltamogramas cíclicos mostram um aumento das correntes catódicas em função da concentração de nitrito na célula eletroquímica. Isto deve-se à reação de redução de nitrito a amónia catalisada pela ccNiR imobilizada no eléctrodo, de acordo com a seguinte equação:



O processo eletrocatalítico global, encontra-se esquematizado na Figura 3.3; após a redução da ccNiR na superfície do eléctrodo (reação heterogénea), segue-se a redução catalítica do nitrito numa reação química homogénea, onde é produzida amónia, e da qual resulta a regeneração da sua forma oxidada. Desta forma estamos perante um mecanismo do tipo EC (*ElectroChemical/Chemical*), no qual após a reação eletroquímica da redução da ccNiR no eléctrodo, ocorre uma reação química acoplada, a redução do nitrito a amónia.

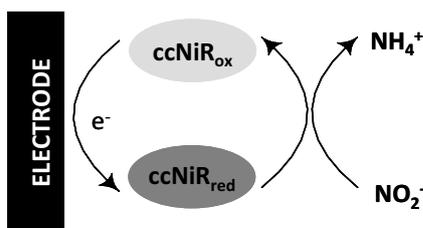


Figura 3.3 - Representação esquemática do mecanismo da reação do biossensor de nitrito baseado na resposta eletroquímica direta da ccNiR [Silveira, 2011].

A curva de calibração associada à resposta eletroquímica do biossensor à adição de nitrito está representada na Figura 3.2B; a corrente catalítica (medida no potencial de inversão do voltamograma cíclico e corrigida relativamente ao branco obtido na ausência de analito) é proporcional à concentração de nitrito no intervalo 0,05 a 18  $\mu\text{M}$ . De acordo com o declive da curva de calibração representada, a sensibilidade deste biossensor para o nitrito é de  $0,72 \text{ AM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ .

Os parâmetros analíticos obtidos com os demais eletrólitos suporte estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 -Parâmetros analíticos e valores dos parâmetros cinéticos, do biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR com os diferentes eletrólitos de suporte testados.

	Sensibilidade ( $\text{AM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ )	Intervalo de Linearidade ( $\mu\text{M}$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$I_{\text{max}}^{\text{ap}}$ ( $\mu\text{A}$ )
Tris-HCl 50 mM em KCl 100 mM (n=2)	0,9 ( $\pm 0,1$ )	0,5/1,9 - 31	0,041 ( $\pm 0,007$ )	4,5 ( $\pm 0,3$ )
Tris-HCl 100 mM em KCl 100 mM (n=2)	0,76 ( $\pm 0,04$ )	0,05 – 18/31	0,039 ( $\pm 0,007$ )	3,09 ( $\pm 0,07$ )
PB 100 mM (n=2)	0,71 ( $\pm 0,06$ )	0,05 - 18	0,09 ( $\pm 0,03$ )	5 ( $\pm 2$ )

Da análise dos resultados da Tabela 3.1, conclui-se que o biossensor apresenta valores de sensibilidade relativamente mais elevados com o eletrólito de suporte Tris-HCl 50 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, mas também apresenta um maior erro. Relativamente às gamas de linearidade, estas são bastante semelhantes entre os eletrólitos, não sendo possível fazer uma escolha entre elas. Contudo, a sensibilidade apresentada para o tampão PB é ligeiramente inferior aos outros dois, o que está de acordo com o trabalho reportado por Stach, *et al.* em 2000, no qual a atividade da ccNiR diminui na presença deste tampão [Stach *et al.*, 2000]. Além disso, o  $K_m^{\text{app}}$  tende a ser maior neste tampão (ver discussão abaixo). Assim, e tendo em conta que os resultados foram reprodutíveis com o eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, optou-se por prosseguir o trabalho com esta solução.

Na Figura 3.2C observa-se a variação da intensidade de corrente catalítica numa gama mais ampla de concentrações de nitrito, para os três eletrólitos suporte testados. Os resultados mostram um aumento das correntes catalíticas até cerca de 0,1 mM de nitrito, atingindo-se um patamar para concentrações mais elevadas. Este comportamento demonstra que a resposta eletroquímica da ccNiR ao nitrito, segue uma cinética enzimática de *Michaelis – Menten*, na presença dos 3 eletrólitos suporte.

Os valores aparentes dos parâmetros cinéticos,  $K_m$  e  $I_{\text{máx}}$  do biossensor obtidos na presença dos diferentes eletrólitos suporte testados são apresentados na Tabela 3.1. Os valores de  $K_m^{\text{app}}$  nos eletrólitos suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM e Tris-HCl 50 mM pH 7,6 em

100 mM KCl, são muito semelhantes entre si, ao invés do valor obtido em PB 100 mM, pH 7,6, que apresenta um valor superior, o que poderá indicar uma menor afinidade da enzima para o nitrito nestas condições.

### 3.1.2 Incubação em compostos anfífilicos ou hidrofóbicos

Após a escolha do eletrólito suporte mais adequado, a segunda etapa do trabalho passou pelo teste do efeito de alguns compostos anfífilicos na atividade catalítica da ccNiR. Assim, importa mencionar que os resultados prévios obtidos por Silveira (2011), mostravam que a incubação em diferentes detergentes afeta significativamente a resposta eletroquímica direta de ccNiR, pelo que a sua influência nos parâmetros analíticos merece ser estudada mais a fundo [Silveira, 2011]. Refira-se que os dois surfactantes escolhidos são capazes de formar membranas na superfície do eletrodo o que constitui um ambiente apropriado para a imobilização de proteínas de membrana, tais como a ccNiR. Ambos (DDM e SDS) foram usados com uma concentração correspondente a 2xCMC para garantir que, sobre o eletrodo, poderiam ser formadas biomembranas, a partir das micelas em solução, e desta forma poder comparar os efeitos dos surfactantes sobre a resposta eletroquímica da enzima ccNiR em condições equivalentes. O biossensor foi preparado pela deposição de uma mistura de enzima e surfactante na superfície do eletrodo de grafite pirolítica. Preparou-se ainda um controlo, que consistiu na deposição de uma mistura de enzima e água destilada, na superfície do PGE. A resposta ao nitrito foi avaliada por voltametria cíclica na presença de diferentes concentrações do substrato. Os voltamogramas cíclicos destes bioelétrodos obtidos na ausência de substrato são exibidos na Figura 3.4.

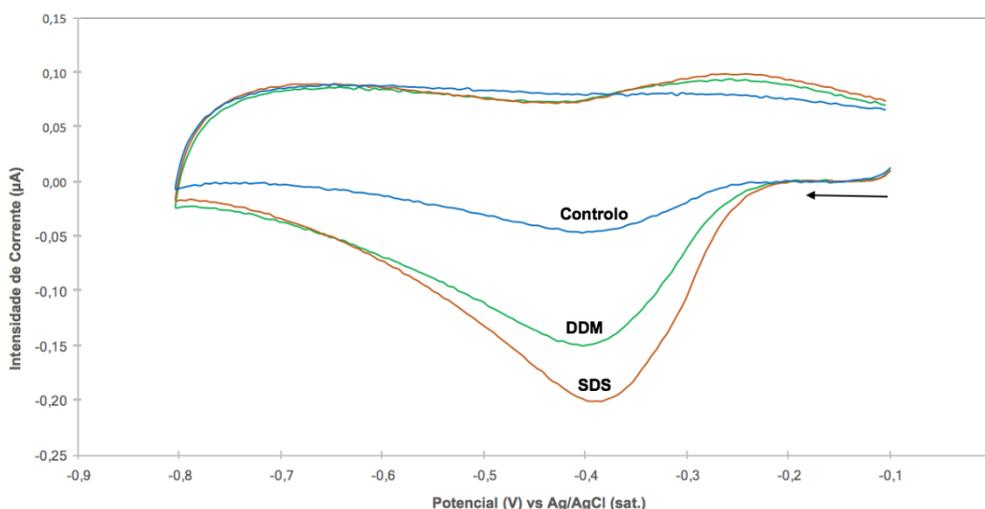


Figura 3.4 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+surfactante, na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. Linha verde – DDM; linha laranja - SDS e linha azul – controlo (sem surfactantes).

Da análise da Figura 3.4 conclui-se que o potencial de redução da enzima é igual na ausência/presença de surfactantes, e que a intensidade de corrente no pico é maior para o SDS, depois para o DDM e, por fim, para o controlo. Estes resultados mostram que apesar da quantidade de proteína depositada em todos os eletrodos ser a mesma, há possivelmente um maior número de moléculas eletroativas na presença do SDS. Em parte, este resultado é surpreendente, na medida em que o SDS é reconhecido pelo seu efeito desnaturante. Este

surfactante pode estar a funcionar como um agente de solubilização para os agregados hidrofóbicos que a ccNiR forma em solução, e conseqüentemente ocorre a desagregação destes, levando a um aumento do número de moléculas disponíveis para reagir diretamente com a interface [Silveira, 2011].

A resposta eletroquímica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, na presença de diferentes concentrações de nitrito, apresenta-se na Figura 3.5A.

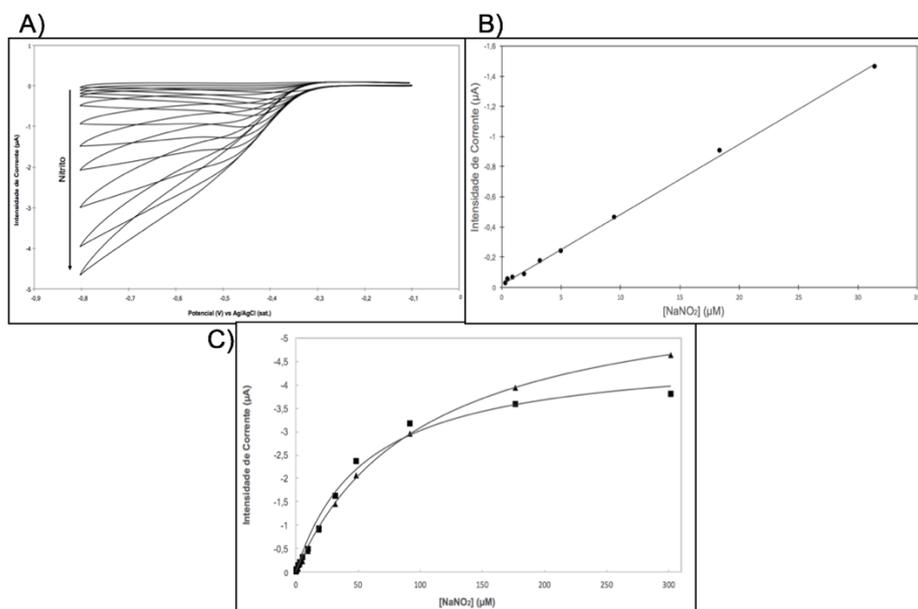


Figura 3.5 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 301,3 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com argon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,0465x-0,0187$ ;  $r^2=0,998$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com os diferentes surfactantes testados (▲- DDM; ◆- SDS). As linhas contínuas representam as simulações de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática.

Os voltamogramas cíclicos mostram um aumento das correntes catódicas em função do aumento da concentração de nitrito. Tal como visto nos voltamogramas cíclicos obtidos com o sistema PGE/ccNiR (Figura 3.2A), isto indica que o biossensor de nitrito é funcional na presença de ambos os detergentes.

A curva de calibração associada à resposta eletroquímica do biossensor à adição de nitrito está representada na Figura 3.5B; a corrente catalítica (medida no potencial de inversão do voltamograma cíclico e corrigida relativamente ao branco obtido na ausência de analito) é proporcional à concentração de nitrito no intervalo 0,3 a 31 µM. De acordo com o declive da curva de calibração representada, a sensibilidade deste biossensor para o nitrito é de 0,66 AM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>.

A Tabela 3.2 reúne dados sobre os parâmetros analíticos obtidos com o biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+surfactantes, SDS e DDM.

Tabela 3.2 - Parâmetros analíticos e valores dos parâmetros cinéticos, do biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+matriz de imobilização, e controlo baseado no sistema PGE/ccNiR+água.

	Sensibilidade ( $\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	Intervalo de Linearidade ( $\mu\text{M}$ )	$K_m^{\text{app}}$ (mM)	$I_{\text{max}}^{\text{ap}}$ ( $\mu\text{A}$ )
<b>Controlo (n=2)</b>	0,65 ( $\pm 0,07$ )	0,2/0,3 – 18/31	0,067 ( $\pm 0,001$ )	4,2 ( $\pm 0,7$ )
<b>SDS (n=2)</b>	0,64 ( $\pm 0,07$ )	0,3 – 18/48	0,09 ( $\pm 0,05$ )	7 ( $\pm 3$ )
<b>DDM (n=2)</b>	0,65 ( $\pm 0,03$ )	0,3/0,5 – 31/48	0,10 ( $\pm 0,06$ )	6 ( $\pm 3$ )
<b>PEG 400 (n=2)</b>	0,78 ( $\pm 0,04$ )	0,5/2 - 31	0,055 ( $\pm 0,001$ )	4,8 ( $\pm 0,4$ )
<b>Sol-gel (n=3)</b>	0,41 ( $\pm 0,03$ )	0,5/0,95 – 18/31	0,026 ( $\pm 0,009$ )	1,03 ( $\pm 0,08$ )

Do ponto de vista analítico, a utilização de surfactantes não demonstrou qualquer vantagem relativamente ao eléctrodo controlo preparado apenas com ccNiR, pois quer a sensibilidade, quer o intervalo de linearidade são bastante semelhantes (Tabela 3.2).

A análise da variação da intensidade de corrente catalítica com a concentração de nitrito para os biossensores preparados com DDM e SDS apresenta-se na Figura 3.5C, e demonstra que a resposta ao nitrito é bastante semelhante, em ambos os casos. A Figura 3.5C mostra ainda um aumento das correntes catalíticas até cerca de 0,2 mM de nitrito, as quais se tornam constantes para concentrações mais elevadas. Na presença dos dois detergentes, a resposta eletroquímica da ccNiR ao nitrito segue mais uma vez uma cinética de *Michaelis – Menten*. Os valores de  $K_m^{\text{app}}$  e  $I_{\text{max}}^{\text{app}}$  do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+surfactantes são também apresentados na Tabela 3.2, bem como os resultados relativos ao eléctrodo de controlo preparado na ausência de detergentes. Os valores de  $K_m^{\text{app}}$  são superiores na presença de SDS e DDM, indicando que a imobilização da ccNiR na presença dos surfactantes pode levar à formação de uma barreira de difusão ao analito (nitrito), que limita o seu transporte até à enzima. A resposta do biossensor passa assim a ser controlada pela difusão do substrato até à camada de ccNiR imobilizada, o que resulta no aumento dos valores de  $K_m$ .

Com o uso de surfactantes esperava-se uma melhoria da atividade da ccNiR, tal como foi demonstrado anteriormente por Silveira, 2011, pois a ccNiR é uma enzima de membrana, e apresenta, por isso, características hidrofóbicas quando colocada em solução, mostrando uma forte tendência para formar agregados com uma massa molecular bastante elevada [Almeida *et al.*, 2003; Silveira, 2011]. A desagregação dos complexos da ccNiR na presença dos surfactantes, deveria assim aumentar o número de moléculas disponíveis para reagir diretamente com a interface e conseqüentemente aumentar a atividade do biossensor. Tal como visto anteriormente, o biossensor preparado com o surfactante SDS apresenta valores de corrente não catalítica superiores aos dos outros sistemas (Figura 3.4), o que parece corresponder a um maior número de moléculas a interatuar com o eléctrodo. Mas após a análise dos parâmetros analíticos, estes não revelaram qualquer melhoria de sensibilidade e intervalo de linearidade do biossensor de nitrito. Assim, os ensaios realizados com os surfactantes não demonstraram o aumento da atividade do biossensor. No decurso desta tese, outras tentativas de melhorar a resposta do biossensor passaram pela miniaturização dos dispositivos, com a mudança do sistema para eléctrodos de pasta de carbono (SPE), nos quais foram testadas diferentes quantidades de enzima e temperaturas de operação do biossensor na presença de DDM (Anexo B). Contudo, nenhuma das estratégias utilizadas resultou numa melhoria significativa da *performance* analítica do biossensor.

Adicionalmente, testou-se o efeito do polímero hidrofílico de baixo peso molecular, o polietilenoglicol 400 (PEG 400), na resposta do biossensor de nitrito. O polímero foi testado da

mesma forma que os surfactantes, i.e., foi depositado numa mistura com a enzima na superfície do eléctrodo. Este composto é também integrante da matriz de imobilização sol-gel, utilizada em ensaios posteriores (ver abaixo secção 3.1.3). A sua utilização como aditivo em materiais de sol-gel provou ser altamente benéfica para a estabilização de proteínas de membrana imobilizada [Winger *et al.*, 2009].

A resposta eletroquímica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400, na presença de diferentes concentrações de nitrito está representada na Figura 3.6.

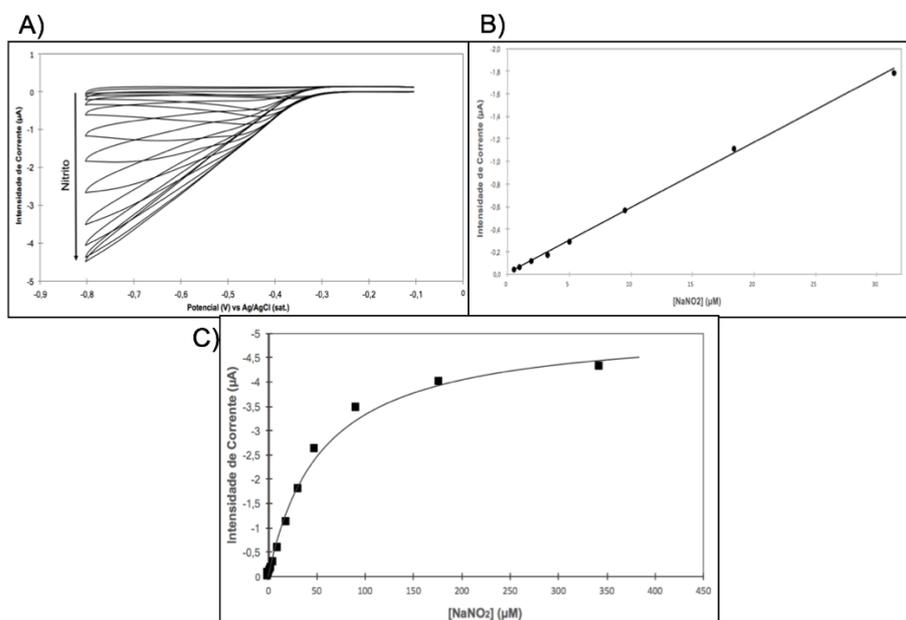


Figura 3.6 - A) Voltamogramas cíclicos com o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 462,9 μM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, desarejado com árgon. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=-0,0573x-2^{-8}$ ;  $r^2=0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400 em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a - 0,8 V vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. A linha contínua representa a simulação de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática.

Na Figura 3.6B observa-se a respetiva curva de calibração associada à resposta eletroquímica do biossensor à adição de nitrito; a corrente catalítica (medida no potencial de inversão do voltamograma cíclico e corrigida relativamente ao branco obtido na ausência de analito) é proporcional à concentração de nitrito no intervalo de 0,5 a 18 μM, e acordo com o declive da curva de calibração representada, a sensibilidade deste biossensor para o nitrito é de 0,81 AM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>.

Os valores obtidos para a sensibilidade e o intervalo de linearidade com o sistema PGE/ccNiR+PEG 400 estão apresentados na Tabela 3.2. Comparando estes resultados com os obtidos com os surfactantes, concluiu-se que a ccNiR incubada com PEG apresenta melhores resultados a nível da sensibilidade, com uma melhoria na sensibilidade na ordem dos 17% em comparação com os surfactantes DDM, SDS e o controlo, apresentando assim uma boa atividade catalítica. Quanto ao intervalo de linearidade, este manteve-se semelhante aos obtidos na presença dos surfactantes, mas menos amplo em relação ao controlo.

A variação da intensidade de corrente catalítica em função da concentração de nitrito com o sistema PGE/ccNiR+PEG pode observar-se na Figura 3.6C. Esta variação demonstra que a resposta eletroquímica da ccNiR ao nitrito segue uma cinética de *Michaelis-Menten* na presença do PEG (tal como verificado anteriormente com os outros bioeléctrodos estudados).

Os valores do  $K_m^{app}$  e  $I_{máx}^{app}$  do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+PEG 400, estão apresentados na Tabela 3.2. Observa-se que este biossensor apresenta um  $K_m$  inferior aos surfactantes e até mesmo ao controlo, o que poderá indicar que a enzima imobilizada com o PEG tem uma maior afinidade para o substrato ou que haverá uma menor limitação no transporte de massa do nitrito, ao longo do biofilme ccNiR+PEG400.

### 3.1.3 Imobilização em Sol-gel

O objetivo de usar o sol-gel foi encontrar uma matriz de imobilização que permitisse ao mesmo tempo imobilizar a ccNiR e os componentes do sistema bienzimático de remoção de oxigénio molecular e assim tornar o biossensor numa unidade funcional de utilização simples, sem ser necessário remover o oxigénio das soluções a analisar com árgon.

No contexto da imobilização de enzimas e de outros componentes biológicos, o sol-gel tem-se demonstrado bastante vantajoso (ver secção 1.1.4.2). Neste trabalho testou-se uma matriz de sol-gel anteriormente explorada pelo grupo de trabalho, preparada a partir da mistura de silicato de sódio e PEG400 [Mazurenko *et al.*, 2015]. Da composição deste sol-gel faz parte o PEG 400, que tal como foi possível observar anteriormente melhora a resposta da enzima.

Assim, realizaram-se ensaios com o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel e comparou-se a resposta obtida com os biossensores testados anteriormente.

A análise da variação da intensidade de corrente catalítica em função da concentração de nitrito para o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel está apresentada na Figura 3.7. Esta demonstra que a resposta eletroquímica de ccNiR imobilizada em sol-gel ao nitrito segue também uma cinética de *Michelis-Menten*.

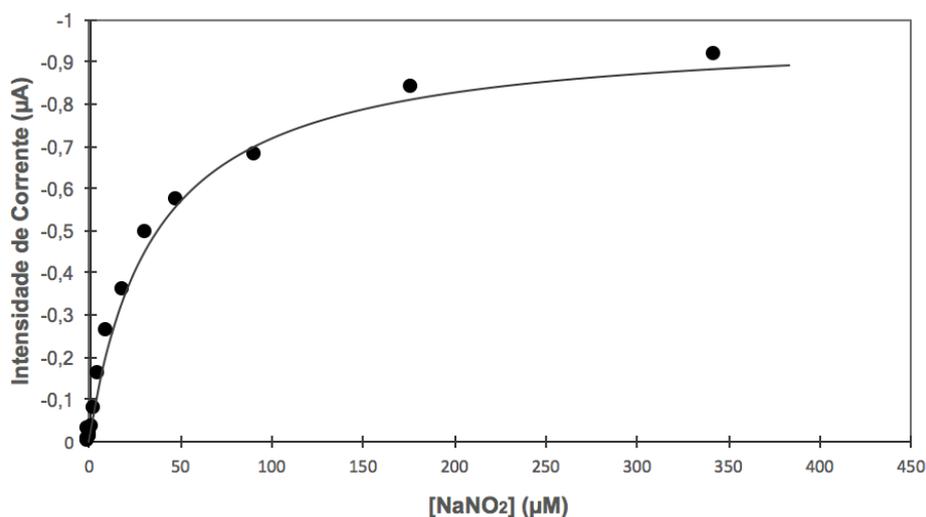


Figura 3.7 - Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito com o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a - 0,8 V vs Ag/AgCl. A linha contínua representa a simulação de *Michaelis-Menten* de cinética enzimática.

Os resultados apresentados na Tabela 3.2 demonstram que a incorporação da ccNiR na matriz de sol-gel resulta numa diminuição da sensibilidade do biossensor relativamente aos surfactantes, ao controlo e ao PEG 400. No que diz respeito ao intervalo de linearidade, este

manteve-se constante, concluindo-se que apesar da perda significativa de sensibilidade o biossensor de nitrito é funcional do ponto de vista analítico.

Os valores de  $K_m^{app}$  e  $I_{máx}^{app}$  do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel, são apresentados na Tabela 3.2. O valor de  $K_m^{app}$  é inferior aos das outras matrizes de imobilização, o que indica que a enzima imobilizada com o sol-gel aparenta ter uma maior afinidade pelo substrato, quando comparado com a imobilização em PEG 400 ou, alternativamente, que a difusão de nitrito está facilitada nesta matriz de imobilização.

### 3.1.4 Remoção do O<sub>2</sub> dissolvido

A remoção do oxigénio é um dos passos importantes no funcionamento dos biossensores eletroquímicos baseados em redutases de nitrito, pois o oxigénio pode reagir com os reagentes e/ou produtos da reação de elétrodo em estudo, pode oxidar a superfície do elétrodo e pode interferir na corrente medida [Rodrigues, 2013]. Normalmente, a remoção do oxigénio é feita através de borbulhamento das soluções com um gás inerte (neste trabalho recorreu-se ao uso do árgon), mas o processo tem inconvenientes no que diz respeito à utilização destes dispositivos fora do ambiente laboratorial, como por exemplo, ter que se transportar uma garrafa de gás comprimido, o que se torna impraticável, bem como o próprio custo deste tipo de gases. Assim, neste trabalho testou-se o sistema bienzimático de remoção do O<sub>2</sub> descrito por Plumeré *et al.*, (2012) – secção 1.4 [Plumeré *et al.*, 2012].

Nesta fase do trabalho, optou-se pela utilização do surfactante DDM na preparação do biossensor; os componentes do sistema de remoção de O<sub>2</sub> (GOx, Cat e glucose) foram adicionados ao eletrólito suporte. Como demonstrado por Monteiro *et al.*, (2015), este sistema tem a capacidade de remover todo o oxigénio em solução, sendo que após 10 minutos da adição do mesmo à solução, é possível observar a diminuição da intensidade de corrente correspondente à redução do oxigénio [Monteiro *et al.*, 2015].

Os voltamogramas cíclicos obtidos com o sistema PGE/ccNiR+DDM após o borbulhamento do eletrólito com árgon, durante 15 minutos (linha preenchida) ou usando o sistema de remoção de O<sub>2</sub> (linha tracejado) para o mesmo fim, após 15 minutos da adição dos componentes ao eletrólito suporte, estão apresentados na Figura 3.8. O sinal da ccNiR é muito mais intenso (cerca de -113 nA) com árgon do que com o sistema bienzimático de remoção de O<sub>2</sub> (cerca de -31,8 nA). Esta diferença pode ser justificada por um possível efeito de passivação da superfície do elétrodo pelas enzimas GOx e Cat em solução, diminuindo assim a resposta da ccNiR.

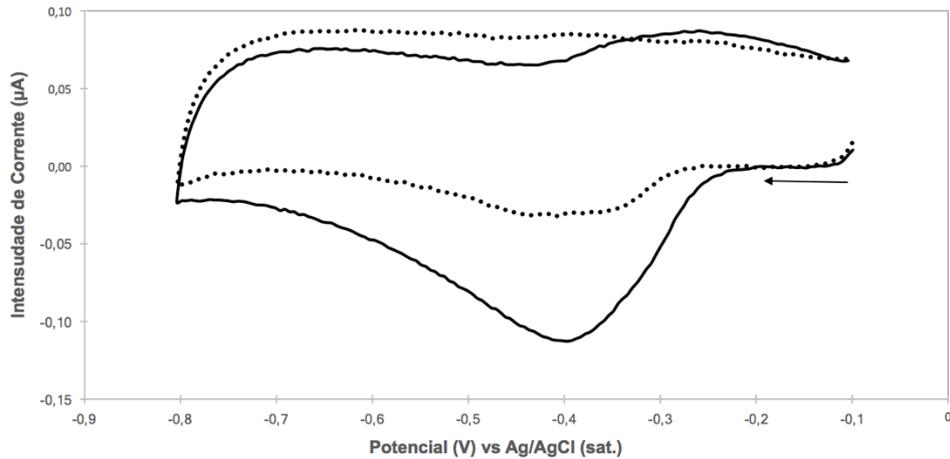


Figura 3.8 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, na ausência de nitrito. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em 100 mM KCl, desarejado com argon ou com o sistema de remoção de  $O_2$  em solução. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . Linha preenchida – Uso de argon para remoção de oxigénio; linha tracejada – uso do sistema bienzimático para remoção do oxigénio.

De seguida realizaram-se ensaios de resposta do biossensor ao nitrito na presença do sistema bienzimático de remoção de oxigénio molecular – Figura 3.9A.

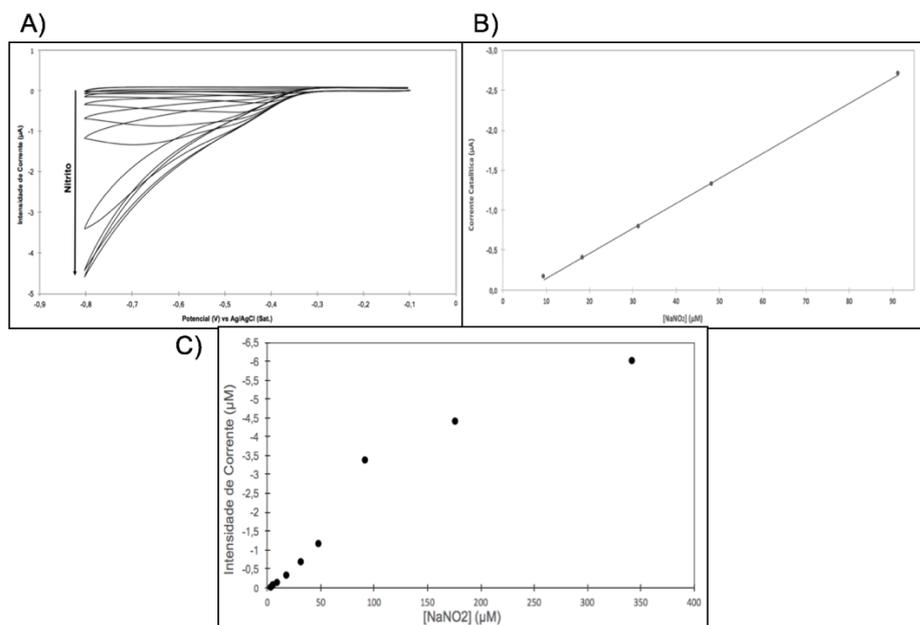


Figura 3.9 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito ( $0,05 - 342,2 \mu\text{M}$ ). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM, com o sistema de remoção de  $O_2$  em solução. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . B) Curva de calibração ( $y = -0,0313x + 2^{-7}$ ;  $r^2 = 0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a  $-0,8 \text{ V}$  vs Ag/AgCl. C) Variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito.

Os resultados mostram um aumento da corrente catalítica, que demonstra que a ccNiR responde às adições de nitrito, e que o biossensor é capaz de detetar nitrito na presença do sistema de remoção de O<sub>2</sub>. A curva de calibração associada à resposta eletroquímica do biossensor representado à adição de nitrito, mostra que a corrente catalítica (medida no potencial de inversão do voltamograma cíclico e corrigida relativamente ao branco obtido na ausência de analito), é proporcional à concentração de nitrito no intervalo 1,8 a 31 μM, e que a sensibilidade deste biossensor é de 0,48 AM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup> (Figura 3.9B).

A análise da variação da intensidade de corrente catalítica com a concentração de nitrito para o biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> em solução, é apresentada na Figura 3.9C. Esta, ao contrário do que se tem observado até agora, mostra que a resposta eletroquímica da ccNiR ao nitrito na presença do DDM, não segue uma cinética de *Michaelis-Menten*.

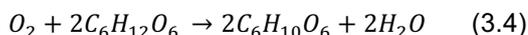
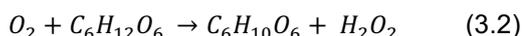
A sensibilidade e o intervalo de linearidade determinados para o biossensor de nitrito utilizado como sistema bienzimático de remoção de O<sub>2</sub> foram de 0,33 (±0,08) AM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup> e 2/3 – 18/31 μM, respetivamente, e para comparação utilizou-se os parâmetros analíticos apresentados na Tabela 3.2. É possível observar que a *performance* do biossensor é inferior no primeiro caso uma vez que a sensibilidade diminui cerca de 49% e que o limite inferior do intervalo de linearidade do sistema de remoção de O<sub>2</sub> (2 a 3 μM), é superior ao obtido com argón (0,3 a 0,5 μM), impossibilitando a deteção de concentrações baixas de nitrito.

Os parâmetros cinéticos (K<sub>m</sub><sup>app</sup> e I<sub>max</sub><sup>app</sup>) não foram possíveis determinar na presença do sistema bienzimático, pois a resposta do bioeléctrodo ao nitrito não segue uma cinética de *Michaelis-Menten*.

### 3.2 Imobilização do sistema de remoção de O<sub>2</sub>

Tal como reportado por diversos autores Kandimalla *et al.*, (2006), Wang e Uchiyama, (2013), e mais recentemente por Moreira *et al.*, (2015), o sol-gel é uma matriz ideal para imobilização de enzimas, uma vez que permite que estas mantenham a sua atividade enzimática, e os processos de síntese do sol-gel são relativamente simples e versáteis, entre diversas outras vantagens. No presente trabalho, pretendeu-se imobilizar as enzimas que compõem o sistema de remoção de O<sub>2</sub> na matriz de sol-gel. Numa primeira fase as proteínas foram incorporadas isoladamente no sol-gel (primeiro a GOx e depois a Cat; de seguida procedeu-se à co-imobilização destas duas enzimas, testando-se várias configurações e métodos de deposição no eléctrodo) [Kandimalla *et al.*, 2006; Wang e Uchiyama, 2013; Moreira *et al.*, 2015].

Tal como descrito anteriormente, o sistema de remoção de O<sub>2</sub> é composto pela GOx e pela Cat, e funciona do seguinte modo: a GOx catalisa a reação de oxidação da glucose na presença de oxigénio e liberta peróxido de hidrogénio (Equação 3.2). Num segundo passo, o peróxido de hidrogénio resultante da reação da GOx é desproporcionado em água e oxigénio, uma reação catalisada pela enzima Cat (Equação 3.3). As moléculas de oxigénio regeneradas pela Cat são novamente reduzidas pela oxidase, constituindo-se assim um ciclo catalítico que vai diminuindo progressivamente a concentração de oxigénio em solução. Na reação global (Equação 3.4), duas moléculas de glucose são necessárias para a redução de uma molécula de oxigénio.



### 3.2.1 Imobilização da GOx

Primeiramente, começou-se por imobilizar a GOx em sol-gel no PGE, adicionando-se os restantes componentes do sistema de remoção de O<sub>2</sub>, a Cat e a glucose, ao eletrólito suporte (Figura 3.10).

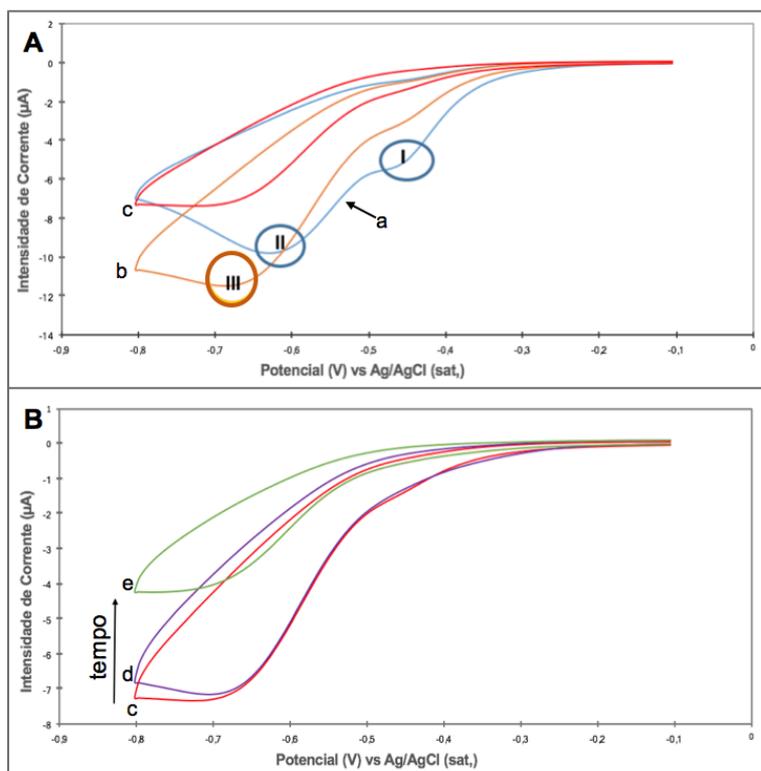
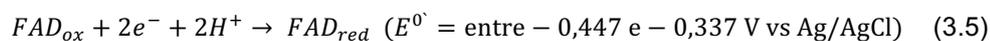
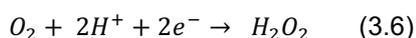


Figura 3.10 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, com a Cat e glucose em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) –PGE/GOx/Sol-gel – linha a; Adição de 2000 UmL<sup>-1</sup> de Cat – linha b; Adição de 80mM de glucose –linha c; B) – Adição de glucose – linha c; 10 minutos – linha d; 30 minutos – linha e.

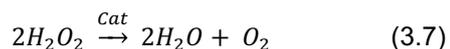
Na Figura 3.10A, a linha a) mostra a resposta eletroquímica da GOx imobilizada no sol-gel, numa solução contendo oxigénio. De acordo com a literatura consultada, o processo de redução indicado em I, (aproximadamente - 0,450 V), refere-se à redução do FAD, o centro ativo da GOx – Equação 3.5 [Harper e Anderson, 2010].



O processo II (aproximadamente a - 0,620 V) corresponde à redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na superfície do elétrodo – Equação 3.6 (ver Figura 3.12) [Harper e Anderson, 2010]:

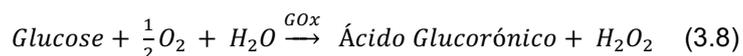


Após a adição da Cat à solução (Figura 3.10A, linha b), observa-se um novo processo catódico a cerca de - 0,680 V, assinalado como III. Este consiste possivelmente na associação do processo anterior (Equação 3.5) com a reação catalisada pela Cat, i.e., a decomposição do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água [Lai e Bergel, 2002], de acordo com a seguinte equação:



Desta forma estamos novamente perante um mecanismo do tipo EC no qual após a reação eletroquímica da redução do oxigénio no eletrodo, ocorre uma reação química acoplada, a redução do peróxido de hidrogénio pela Cat.

Com a adição da glucose à solução (Figura 3.10A, linha c) observa-se uma diminuição significativa da intensidade de corrente catódica, que corresponde ao consumo de oxigénio durante a reação catalítica da GOx, na presença de glucose e oxigénio, de acordo com a seguinte equação:



Na Figura 3.10B é apresentada a evolução do sinal ao longo do tempo, após a adição de glucose ao eletrólito, sendo que ao fim de 30 minutos não se observa nenhum dos processos catódicos identificados nos voltamogramas a). É possível observar ainda uma diminuição da intensidade de corrente do processo denominado III ao longo do tempo. Nestas condições, embora se verifique uma diminuição significativa das correntes de redução de oxigénio, a remoção desta molécula do eletrólito suporte não parece ser totalmente eficaz. Uma explicação possível será a acumulação do peróxido de hidrogénio na matriz de sol-gel, proveniente da redução catalítica do oxigénio pela GOx imobilizada na superfície do eletrodo.

Seguidamente foi realizado um ensaio nas mesmas condições exceto na ordem de adição dos componentes do sistema de remoção de  $O_2$  à solução: primeiro adicionou-se a glucose e de seguida a Cat. Os resultados são apresentados na Figura 3.11.

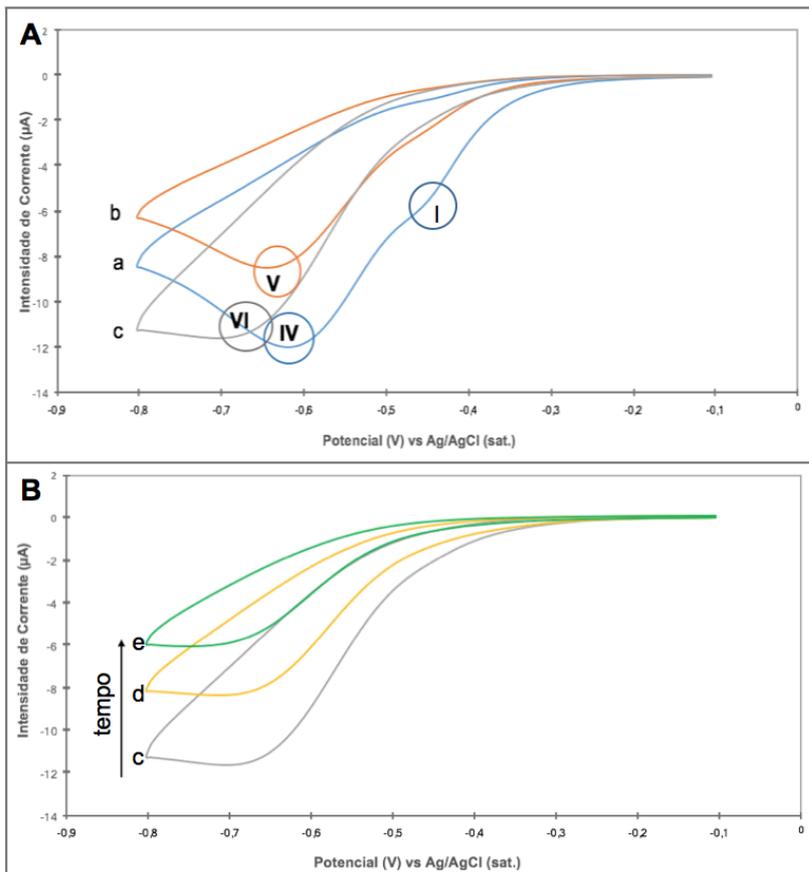


Figura 3.11 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/Sol-Gel, com a glucose e Cat em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . A) – PGE/GOx/sol-gel - linha a; Adição de 80mM de glucose – linha b; Adição de  $2000 \text{ UmL}^{-1}$  de Cat – linha c; B) – Adição de Cat – linha c; após 15 minutos – linha d; após 60 minutos – linha e.

Os resultados obtidos são muito semelhantes aos do ensaio anterior (Figura 3.10); a remoção do oxigénio e peróxido de hidrogénio não é totalmente eficaz. O processo denominado I, refere-se à redução do FAD, tal como visto no ensaio anterior, e o processo IV corresponde à redução do  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  na superfície do eléctrodo, denominado de processo II no ensaio anterior. Destaca-se a existência do processo catódico denominado V, a  $-0,640 \text{ V}$ , após a adição da glucose à solução (Figura 3.11A); este deverá corresponder à redução do oxigénio, a peróxido de hidrogénio, catalisada pela GOx – Equação 3.8. O sinal catódico diminui aquando da adição da glucose, o que indica o consumo de oxigénio, mas torna a aumentar quando a Cat é adicionada à solução (Figura 3.11A, linha c) desviando-se também para um potencial mais negativo - processo VI. Este aumento da intensidade de corrente de redução deve-se provavelmente à reação desta enzima que vai converter imediatamente o peróxido de hidrogénio que se acumulou na célula eletroquímica em oxigénio e água (Equação 3.7). A continuação do funcionamento do ciclo catalítico formado pelas duas enzimas resulta numa diminuição gradual de oxigénio e peróxido de hidrogénio na solução. A comparação da Figura 3.10A e Figura 3.11A, mostra que os processos III e VI se devem à ação da Cat.

No passo seguinte, realizou-se um ensaio controlo, sem enzimas imobilizadas na matriz de sol-gel, e no qual se adicionou-se GOx e glucose à solução, uma vez que se queria confirmar se o sistema era funcional na ausência da Cat. Esse ensaio é apresentado na Figura 3.12. O voltamograma a), obtido na ausência de GOx e glucose, mostra a reação de redução do oxigénio no eléctrodo (modificado com sol-gel) a cerca de  $-0,600 \text{ V}$  (denominado 0). Com a

adição de GOx (linha b), o potencial desvia-se para cerca de  $-0,620$  V concordante com o processo II – Figura 3.10A – observado no ensaio com a GOx imobilizada no sol-gel. Com a adição de glucose (linha c) há uma diminuição muito rápida do oxigénio em solução; após 10 minutos não se observam quaisquer processos redox no voltamograma cíclico. Estes resultados demonstram que nas condições experimentais testadas a GOx é capaz de remover eficazmente o oxigénio da solução. Uma vez que o peróxido de hidrogénio formado não interfere na resposta do eléctrodo (possivelmente a concentração é baixa e como tal não é detetada), não é necessário adicionar Cat, simplificando-se assim o processo de remoção de oxigénio do eletrólito suporte. Os resultados sugerem também que quando a GOx é imobilizada no sol-gel (ensaio representados nas Figuras 3.10 e 3.11) o processo de remoção de oxigénio e peróxido de hidrogénio da solução não é tão eficaz porque este último poderá ficar retido na matriz polimérica.

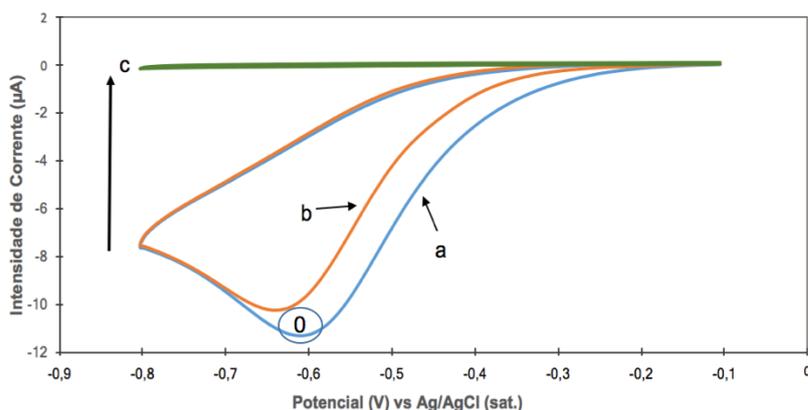


Figura 3.12 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/sol-gel, com adição de GOx e glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05$  Vs<sup>-1</sup>. PGE/sol-gel - linha a; Adição de  $15\text{U mL}^{-1}$  de GOx – linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c.

### 3.2.2 Imobilização da catalase

Seguidamente, procedeu-se à imobilização da Cat na matriz de sol-gel, sendo a GOx e a glucose adicionadas à célula eletroquímica. Os voltamogramas obtidos estão representados na Figura 3.13.

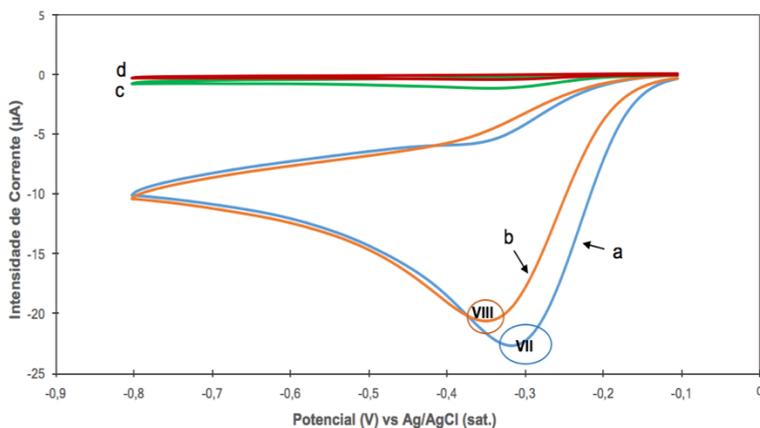
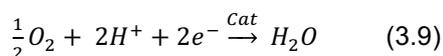


Figura 3.13 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/Cat/sol-gel, com a GOx e glucose em solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05$  Vs<sup>-1</sup>. PGE/Cat/sol-gel – linha a; Adição de GOx  $15\text{U mL}^{-1}$  – linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c; após 60 minutos – linha d.

A linha a) mostra a resposta da Cat imobilizada no sol-gel numa solução contendo oxigénio. O processo observado a  $-0,320$  V, denominado de VII, deverá corresponder à reação da redução do oxigénio pela Cat, formando-se água [Lai e Bergel, 2002], de acordo com a seguinte equação:



Com efeito, o potencial de redução do oxigénio é bastante diferente do que é normalmente observado na ausência de Cat e GOx, i.e., a redução de oxigénio diretamente no eletrodo ( $-0,600$  V, Figura 3.12). Isto mostra que o processo VII deve-se muito provavelmente à reação da Cat com o oxigénio, ou seja, a reação de redução do  $O_2$  está muito facilitada ( $\Delta E \approx -0,300$  V). Após a adição da GOx (linha b) ocorre um desvio do potencial de pico catódico para cerca de  $-0,345$  V (denominado processo VIII), que poderá dever-se à reação da GOx também com o  $O_2$ , estando a dificultar a reação da Cat, levando a uma competição destas duas enzimas pelo oxigénio, e conseqüentemente o desvio para potenciais mais negativos. Quando se adiciona a glucose à solução (Figura 3.13, linha c), observa-se um decréscimo quase instantâneo e muito acentuado das correntes catódicas, concluindo-se que há uma remoção eficiente do oxigénio.

Realizou-se um segundo tipo de ensaio no qual se fez a monitorização do sinal eletroquímico do sistema PGE/Cat/sol-gel ao longo do tempo na ausência dos restantes componentes do sistema de remoção de  $O_2$  – Figura 3.14. Desta forma pretendeu avaliar-se a resposta da Cat na presença de oxigénio.

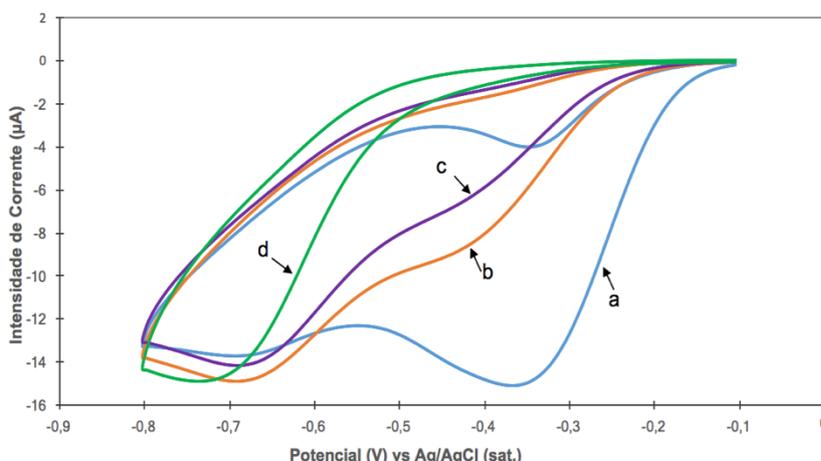


Figura 3.14 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/Cat/sol-gel. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05$  Vs<sup>-1</sup>. PGE/Cat/sol-gel - linha a; após 15 minutos – linha b; após 30 minutos – linha c; após 60 minutos – linha d.

Os voltamogramas da Figura 3.14, mostram que o sinal relativo à reação da Cat com o oxigénio (linha a, aproximadamente a  $-0,350$  V) desaparece 15 minutos após o início do ensaio (linha b). Este resultado sugere que a reação poderá inativar a enzima, a qual deixará então de ser capaz de reduzir o oxigénio. Por outro lado, o pico de redução a  $-0,730$  V aumenta ao longo do tempo e poderá corresponder à redução do oxigénio a peróxido de hidrogénio diretamente na superfície do eletrodo (Equação 3.6). Este resultado mostra que a Cat imobilizada não é suficiente para impedir a acumulação de peróxido de hidrogénio na solução. Note-se que os processos que ocorrem na superfície do eléctrodo não afetam toda a solução o que poderá justificar este resultado.

### 3.2.3 Co-imobilização da GOx e Cat

Após a imobilização isolada de cada uma das enzimas do sistema de remoção de  $O_2$ , procedeu-se à sua co-imobilização. Assim, testaram-se várias configurações de eléctrodo que diferiram no método de deposição (em camadas ou sanduíche<sup>1</sup>) das enzimas, se estas eram adicionadas isoladas ou em misturas e na ordem de aplicação das mesmas e/ou sol-gel no eléctrodo. Na lista seguinte “/” simboliza uma camada e “+” significa que os componentes foram adicionados numa mistura. Em todas as situações a glucose foi adicionada à solução.

- a. PGE/Cat/GOx/sol-gel;
- b. PGE/sol-gel/GOx/Cat;
- c. PGE/sol-gel/Cat/GOx;
- d. PGE/sol-gel+GOx+Cat;
- e. PGE/sol-gel/GOx+sol-gel/Cat;
- f. PGE/sol-gel/Cat+sol-gel/GOx.

Os resultados obtidos com as diversas configurações de eléctrodo foram iguais, estando representados na Figura 3.15, para a combinação PGE/sol-gel+GOx+Cat.

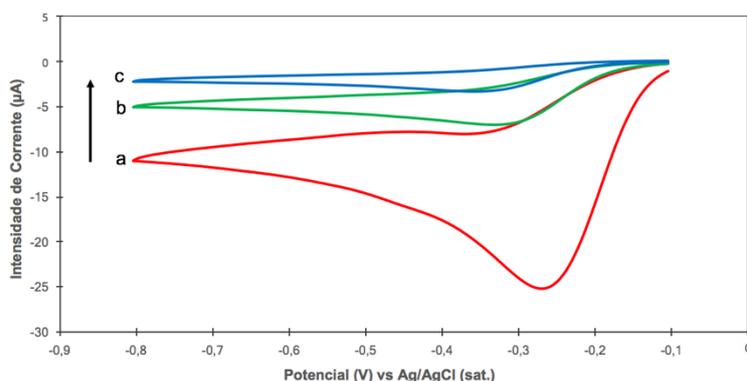


Figura 3.15 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ sol-gel+GOx+Cat, com adição de glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . PGE/ sol-gel+GOx+Cat – linha a; Adição de 80mM de glucose à solução – linha b; após 60 minutos – linha c.

O formato dos voltamogramas e os potenciais observados na Figura 3.15, são muito semelhantes aos observados com o sistema PGE/Cat/sol-gel (Figura 3.13), pelo que se pode concluir que a Cat tem uma maior afinidade para o oxigénio do que a GOx, tornando a redução do oxigénio a água o processo dominante nestes eléctrodos. Embora se verifique uma diminuição significativa das correntes catódicas, a remoção de oxigénio da solução não é totalmente eficaz.

Em conclusão, o estudo da imobilização do sistema de remoção de  $O_2$ , isolado e em conjunto, mostrou que a configuração mais eficaz para a remoção do oxigénio consiste na imobilização da Cat no eléctrodo (PGE/Cat/sol-gel), sendo a GOx e a glucose adicionadas à solução (Figura 3.13).

<sup>1</sup> Esta técnica (no contexto deste trabalho) consiste no revestimento do PGE com a enzima ou sol-gel, e depois de se formar uma camada de polímero seca, revestir novamente com outra enzima ou sol-gel, formando-se assim várias camadas de polímeros.

### 3.3 Biossensor de nitrito com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> incorporado

Após a imobilização do sistema bienzimático para remoção de O<sub>2</sub>, procedeu-se à co-imobilização da ccNiR com as enzimas Cat ou GOx no sol-gel. Este será o formato final e ideal do biossensor de nitrito, com a ccNiR e as enzimas do sistema de remoção de O<sub>2</sub> imobilizadas, que permitem, respetivamente, a deteção do nitrito e a remoção do oxigénio (na presença de glucose). Assim, tal como na secção anterior (secção 3.2.3), foram testados diferentes combinações e métodos para a deposição das enzimas no eléctrodo:

- A. PGE/ccNiR+GOx/sol-gel & glucose em solução;
- B. PGE/ccNiR+GOx/sol-gel & Cat e glucose em solução;
- C. PGE/ccNiR+Cat/sol-gel & GOx e glucose em solução.

Os resultados relativos ao sistema PGE/ccNiR+GOx/sol-gel (combinação A) apresentam-se na Figura 3.16; é possível observar que a remoção do oxigénio é pouco eficiente e não há resposta da ccNiR às adições de nitrito. O mesmo tipo de perfil foi também observado para o sistema B.

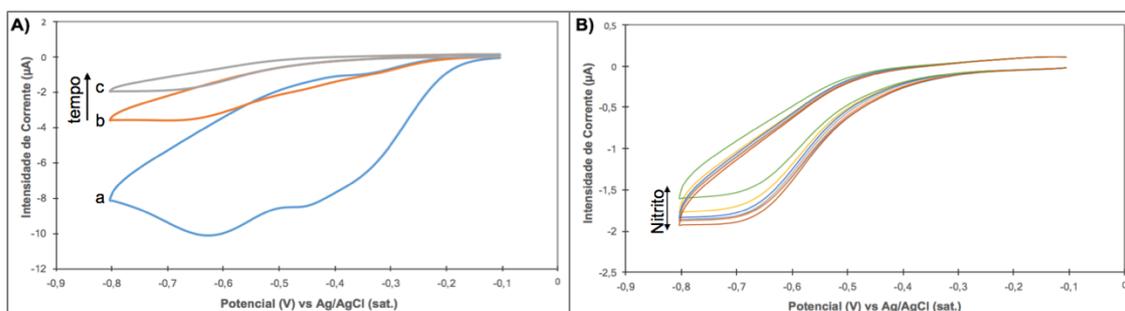


Figura 3.16 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+GOx/sol-gel, com adição de glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. A) PGE/ccNiR/GOx/sol-gel – linha a; Adição de 80mM de glucose – linha b; após 60 minutos – linha c. B) Na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4 µM).

Contudo, a combinação C que consiste no sistema PGE/ccNiR+Cat/sol-gel, com GOx e glucose em solução, apresentou um perfil diferente. Na Figura 3.17A e B é possível observar que na ausência de nitrito e após a adição de todos os componentes do sistema bienzimático à solução, o voltamograma é distinto do representado na Figura 3.24 A, pois apenas se vê o pico de redução do O<sub>2</sub>, pela catalase, a cerca de -0,320 V e as correntes são baixas a -0,8 V.

O aumento da corrente catódica em função da concentração de nitrito na célula eletroquímica, indica que a ccNiR reage com o nitrito reduzindo-o a amónia, concluindo-se que o biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+Cat/sol-gel com adição de GOx e glucose em solução é funcional. Contudo, a sensibilidade obtida para este sistema foi de 0,40 (±0,03) AM<sup>-1</sup>cm<sup>-2</sup>, num intervalo de linearidade de 0,95/5 – 31/48 µM, sendo estes valores muito semelhantes aos biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+sol-gel (Tabela 3.3). Mas comparando com o uso do sistema de remoção de O<sub>2</sub> em solução (secção 3.1.4), há uma melhoria de cerca de 18% na sensibilidade e uma melhoria também no intervalo de linearidade o qual é agora mais amplo. No futuro, este ensaio será revisto e otimizado por exemplo, ao nível da quantidade de enzimas aplicadas no eléctrodo e em solução, quantidade de glucose adicionada, etc.

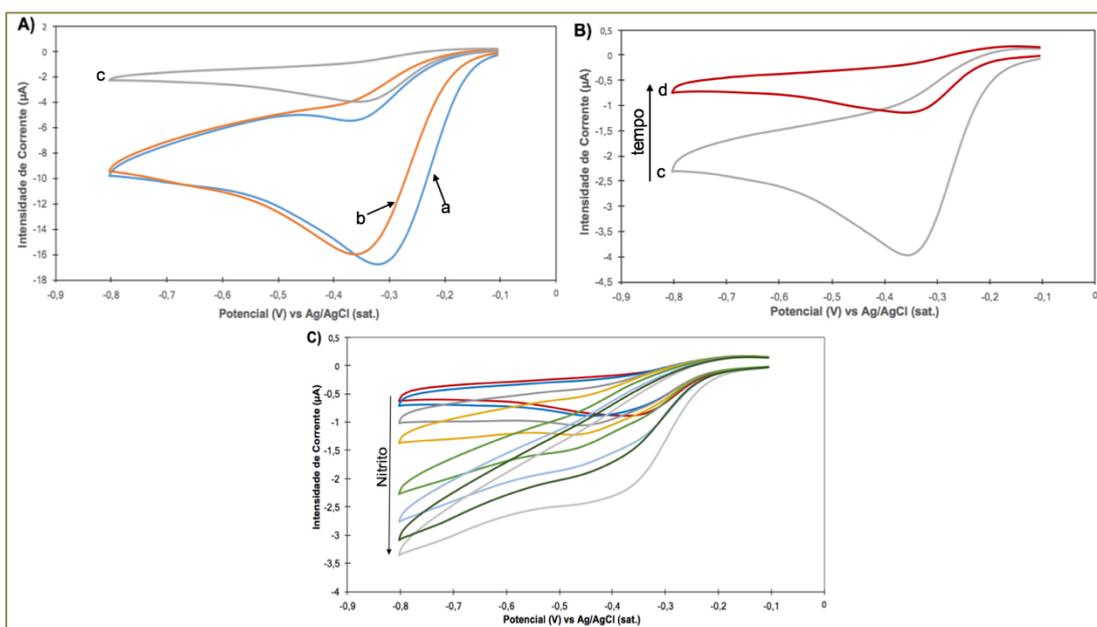


Figura 3.17 - Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+Cat/sol-gel, com adição de GOx e glucose à solução. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . A) PGE/ccNiR+Cat/sol-gel – linha a; Adição de  $15 \text{ U mL}^{-1}$  de GOx – linha b; Adição de 80mM de glucose – linha c; B) Adição de glucose – linha c; após 45 minutos de ensaios – linha d; C) Na presença de concentrações crescentes de nitrito ( $0,05 - 844,4 \text{ } \mu\text{M}$ ).

### 3.4 Biossensor de glucose

Uma vez que ficou demonstrado que a GOx consome o oxigénio rapidamente na presença de glucose em solução (Figura 3.13), foram realizados ensaios com a GOx imobilizada no sol-gel nos quais se fez variar a concentração de glucose com o intuito de construir um biossensor para esta molécula.

Contrariamente ao biossensor de nitrito baseado na ccNiR, o qual demonstrava uma resposta máxima a potenciais bastante negativos (tendo-se como tal utilizado o potencial de inversão,  $-0,800 \text{ V}$ , dos voltamogramas para fazer as medições de intensidade de corrente) no caso do biossensor da glucose a intensidade de corrente, foi determinada no pico catódico dos voltamogramas.

A resposta da GOx à glucose foi estudada em soluções não desarejadas, às quais se fez adições crescentes de glucose à solução – Figura 3.18A.

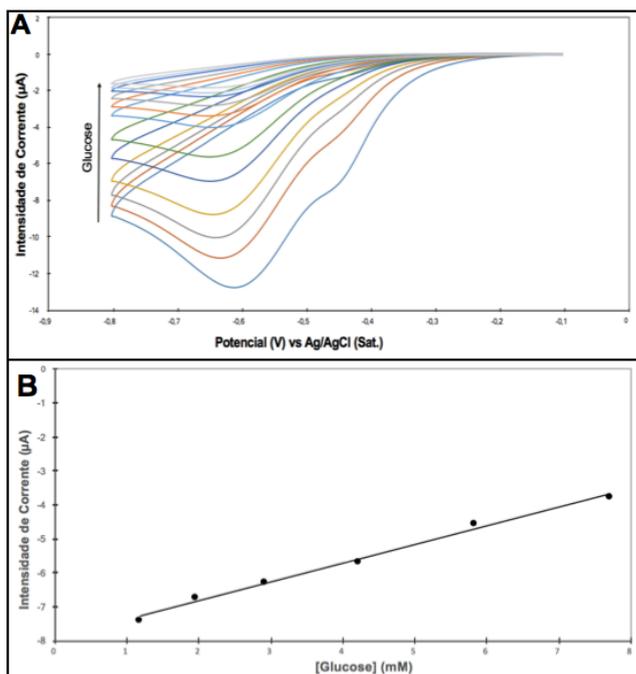


Figura 3.18 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, obtidos na presença de concentrações crescentes de glucose (0,2 – 45,6 mM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y=6^{-7}x-8^{-6}$ ;  $r^2=0,993$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de glucose. Correntes catalíticas medidas no pico catódico dos voltamogramas.

Os resultados apresentados na Figura 3.18A demonstram que a corrente catódica diminui com o aumento da concentração de glucose em solução saturada em ar, indicando que o oxigênio está a ser consumido. Segundo Nasri e Shams, a GOx catalisa a reação de oxidação da glucose a ácido glucorónico, em simultâneo com a redução de oxigênio a peróxido de hidrogénio – Equação 3.8 [Nasri e Shams, 2013]. Desta forma, a reação enzimática consome o oxigênio dissolvido na solução e como tal, a quantidade de glucose é detetada monitorizando a diminuição da intensidade de corrente relativa à sua redução eletroquímica.

A curva de calibração associada à resposta eletroquímica do biossensor proposto à adição de glucose (Figura 3.18B) mostra que a intensidade de corrente é proporcional à concentração de glucose no intervalo 1,2 a 8 mM, e que a sensibilidade deste biossensor varia entre 2,66 – 6,69  $\text{mAM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ . Comparando com os resultados reportados na literatura (Tabela 1.2), verifica-se que a sensibilidade de quase todos os biossensores descritos é mais baixa, contudo o limite inferior do intervalo de linearidade (1,2 mM), é superior. Como referido anteriormente, o valor médio de glucose no sangue humano é de 4 mM, o que demonstra que o biossensor de glucose apresentado é apropriado para a sua quantificação neste fluido biológico.

A variação de corrente catalítica com a concentração de glucose adicionada à célula eletroquímica está representada na Figura 3.19, neste, observa-se a resposta da GOx à glucose até cerca de 10 mM, não se tendo observado mais a diminuição de corrente a partir deste valor de concentração.

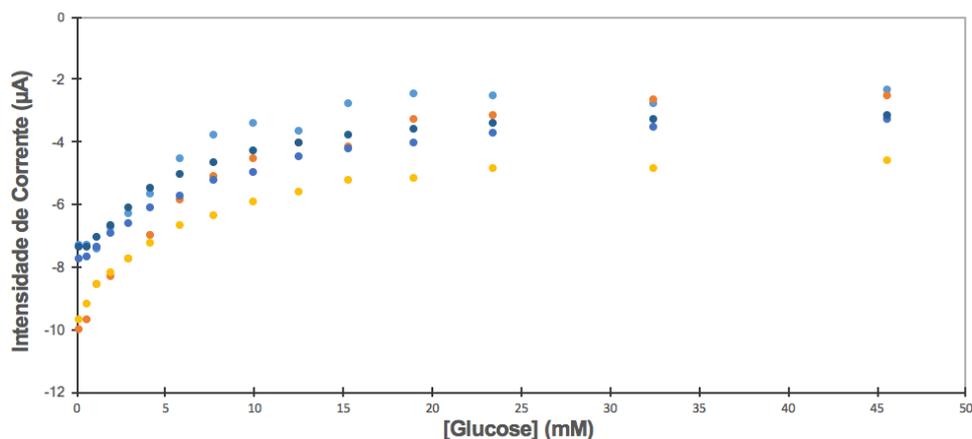


Figura 3.19 - Variação da corrente catalítica em função da concentração de glucose adicionada ao sistema PGE/GOx/sol-gel. Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ ; Correntes catalíticas medidas no pico catódico dos voltamogramas.

Apesar de se ter executado um total de 7 ensaios, a resposta dos biossensores não foi constante. Como tal, realizaram-se ensaios a uma temperatura controlada ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), sendo que os anteriores foram realizados à temperatura ambiente ( $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Os voltamogramas cíclicos correspondentes ao sistema PGE/GOx/sol-gel, com adições crescentes de glucose ( $0,2 - 45,6 \text{ mM}$ ) a uma temperatura controlada de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , são idênticos aos da Figura 3.18, observando-se novamente uma diminuição da corrente catódica, com o aumento da concentração de glucose numa solução saturada em ar.

As curvas de calibração associadas à resposta eletroquímica do biossensor à glucose, foi semelhante à obtida com o sistema PGE/GOx/sol-gel, mas à temperatura ambiente (Figura 3.18B), a intensidade de corrente é proporcional à concentração de glucose no intervalo  $0,2$  a  $10 \text{ mM}$ , e a sensibilidade deste biossensor variou entre  $6,05 - 18,8 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ .

Note-se que embora as diferenças de temperaturas não sejam muito significativas, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , a sensibilidade é mais do dobro da registada a  $\pm 22 \text{ }^\circ\text{C}$ , apesar do intervalo de linearidade ser praticamente idêntico. Tal facto significa que a atividade de enzima GOx é bastante sensível a variações de temperatura, tendendo a melhorar com o aumento da mesma.

Em conclusão, os resultados apresentados demonstraram ser possível construir um biossensor de glucose baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, pretendendo-se no futuro otimizar os parâmetros analíticos do mesmo, por exemplo, através de uma nova formulação de sol-gel, variação da concentração da enzima, da temperatura, etc.



## 4. CONCLUSÃO

Numa fase inicial, procurou otimizar-se o funcionamento do biossensor de nitrito de 3<sup>o</sup> geração baseado na redutase do nitrito ccNiR, desenvolvido anteriormente no nosso grupo de investigação Silveira *et al.*, 2010(a); Monteiro *et al.*, 2015. No cômputo geral, fizeram-se pequenas variações nos parâmetros experimentais, tais como escolha do eletrólito suporte, variação da quantidade de enzima, da temperatura, e incubação em detergentes ou no polímero PEG400. Contudo, comparado com os parâmetros dos biossensores anteriormente descritos, estas alterações não contribuíram para uma melhoria significativa do comportamento analítico.

Contrariamente ao observado em [Silveira, 2011] a utilização de detergentes não demonstrou qualquer aumento na atividade catalítica de ccNiR. Contudo, o biossensor é funcional na presença de ambos os detergentes. No que diz respeito, ao polímero PEG400 (aditivo estabilizador do sol-gel usado posteriormente, como matriz de imobilização), o qual não fora anteriormente testado - sistema PGE/ccNiR+PEG400 – observou-se uma melhoria na atividade catalítica. Refira-se que este biossensor apresentou um  $K_m^{app}$  inferior aos detergentes e até mesmo ao controlo, podendo indicar que a enzima imobilizada com o PEG tem uma maior afinidade pelo substrato ou que haverá uma menor limitação no transporte de massa do nitrito, ao longo do biofilme ccNiR+PEG400.

Seguidamente, efetuou-se a incorporação da ccNiR na matriz de sol-gel (preparada a partir da mistura de silicato de sódio e PEG400), tendo se observado uma diminuição da sensibilidade do biossensor relativamente aos detergentes, ao controlo e ao PEG400, sendo que o intervalo de linearidade se manteve constante. O valor de  $K_m^{app}$  revelou-se inferior aos das outras matrizes de imobilização, podendo indicar que o nitrito está facilitado nesta matriz.

Numa fase seguinte, foi implementado o sistema bienzimático de remoção do O<sub>2</sub> descrito por Plumeré *et al.*, (2012), e a capacidade deste sistema em remover todo o oxigénio em solução, demonstrado anteriormente por Monteiro *et al.* (2015). Assim, testou-se o biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM, com GOx, Cat e glucose em solução. Os resultados demonstraram que a ccNiR respondia às adições de nitrito e que o biossensor é capaz de detetar nitrito na presença deste sistema. Porém, a *performance* (sensibilidade e intervalo de linearidade) do biossensor revelou-se inferior, em comparação borbulhamento com árgon.

A remoção de oxigénio dissolvido como visto anteriormente, é um aspeto importante, por este motivo, procurou-se imobilizar-se o sistema de remoção de O<sub>2</sub> composto pelas enzimas GOx e catalase, usando uma matriz de sol-gel. Primeiramente as proteínas foram incorporadas isoladamente no sol-gel, testando assim dois biossensores diferentes. O primeiro baseou-se no sistema PGE/GOx/sol-gel com Cat e glucose em solução; os resultados demonstraram que o processo de remoção de oxigénio e peróxido de hidrogénio da solução não era eficaz. O segundo baseou-se no sistema PGE/Cat/sol-gel, com GOx e glucose em solução, neste caso, a remoção do oxigénio foi mais eficiente. Em seguida, procedeu-se à co-imobilização destas duas enzimas, testando-se várias configurações e métodos de deposição no eletrodo. Contudo, a remoção de oxigénio da solução não foi totalmente eficaz.

Após a imobilização do sistema bienzimático para remoção de O<sub>2</sub>, procedeu-se à co-imobilização da ccNiR com as enzimas Cat ou GOx no sol-gel. Este seria o formato final e ideal do biossensor de nitrito, com a ccNiR e as enzimas do sistema de remoção de O<sub>2</sub> imobilizadas, que permitiam, respetivamente, a deteção do nitrito e a remoção do oxigénio. Assim, testaram-se diferentes métodos e combinações para a deposição das enzimas no eletrodo, sendo que o biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+GOx/sol-gel & glucose em solução, e no sistema PGE/ccNiR+GOx/sol-gel & Cat e glucose em solução a remoção do oxigénio demonstrou-se pouco eficiente e não tendo havido resposta da ccNiR às adições de nitrito. Porém, os resultados do biossensor de nitrito baseado no sistema PGE/ccNiR+Cat/sol-gel &

GOx e glucose em solução, demonstrou ser funcional, ainda que com uma baixa sensibilidade. No futuro, este ensaio deverá ser revisto e otimizado por exemplo, ao nível da quantidade de enzimas aplicadas no eléctrodo e/ou em solução, quantidade de glucose adicionada, etc.

Uma vez que anteriormente ficou demonstrado que a GOx consome o oxigénio rapidamente na presença de glucose em solução, foram realizados ensaios com a GOx imobilizada no sol-gel nos quais se fez variar a concentração de glucose. A resposta da GOx à glucose foi então estudada em soluções não desarejadas, às quais se fez adições crescentes de glucose. Ao reagir com a glucose, a GOx consome o O<sub>2</sub> dissolvido, levando a um decréscimo da corrente de redução de O<sub>2</sub> proporcional à sua concentração. A sensibilidade deste biossensor para a glucose varia entre 2,66 – 6,69 mA·M<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup> e o intervalo de linearidade entre 1,2 a 8 mM. Comparando os resultados obtidos, com os biossensores de glucose descritos anteriormente na literatura, no qual, estes últimos apresentam uma sensibilidade mais baixa, contudo o limite inferior do intervalo de linearidade (1,2 mM), é normalmente superior. Como referido anteriormente, o valor médio de glucose no sangue humano é de 4 mM, o que demonstra que o biossensor de glucose apresentado é apropriado para a sua quantificação neste fluido biológico.

Por último, foram realizados ensaios com o biossensor de glucose a uma temperatura controlada (25 °C), que demonstraram um aumento de sensibilidade superior a duas vezes (entre 6,05 – 18,8 mA·M<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>, a 25°C), apesar do intervalo de linearidade ser praticamente idêntico. Tal facto significa que a atividade de enzima GOx é bastante sensível a variações de temperatura, tendendo a melhorar com o aumento da mesma. Os resultados demonstraram assim, ser possível construir um biossensor de glucose baseado no sistema PGE/GOx/sol-gel, pretendendo-se no futuro otimizar os parâmetros analíticos do mesmo, por exemplo, através de uma nova formulação de sol-gel, variação da concentração da enzima, e de temperatura, etc.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Abha, C., Anil, K. B., Gupta, V. K. (2001) Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. *Talanta* 55: 789
- Airoldi, C.; Farias, R.F. (2004). Alcóxidos como precursores na síntese de novos materiais através do processo sol-gel. *Quím. Nova*, 27, 84-88.
- Alfaya, A.A.S., Kubota, L.T. (2002). A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Quim. Nova*, 25(5): 835-841
- Almeida, M. G., Macieira, S., Goncalves, L. L., Huber, R., Cunha, C. A., Romao, M. J., Costa, C., Lampreia, J., Moura, J. J. and Moura, I. (2003) The isolation and characterization of cytochrome c nitrite reductase subunits (NrfA and NrfH) from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Europ. J. of Biochem.* 270, 3904–3915.
- Almeida, M. G., Serra, A., Silveira, C. M., Moura, J. J. G. (2010). Nitrite biosensing via selective enzymes—a long but promising route. *Sensors (Basel, Switzerland)* 10, 11530–55.
- Almeida, M. G., Silveira, C. M. & Moura, J. J. G. (2007). Biosensing nitrite using the system nitrite reductase/Nafion/methyl viologen—a voltammetric study. *Biosensors & bioelectronics* 22, 2485–92. (b).
- Almeida, M.G, Silveira, C.M., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Moura, J.J.G., Moura, I., Léger, C. (2007) A Needle in a Haystack: the Active Site of the Membrane-bound Complex Cytochrome c Nitrite Reductase, *FEBS Lett.* 581(2), 284-288.
- Anusha, J.R., Justin Raj, C., Cho, B-B., Fleming, A. T., Yu, K-H., Kim, B. C. (2015). Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized over chitosan nanoparticles from *gladius of Uroteuthis duvauceli*. *Sensors and Actuat. B* 215, 536–543.
- Aschebrook-Kilfoy, B., Shu, X.-O., Gao, Y.-T., Ji, B.-T., Yang, G., Li, H. L. Ward, M. H. (2013). Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer. J. Internat. Du Cancer*, 132(4), 897–904
- Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F. (2006). *Química "Biológica Química Inorgânica"*. Shriver & Atkins *Inorgânica*. Oxford:Oxford University Press. pp. 754-5.
- Avnir, D. (1995). Organic Chemistry within Ceramic Matrixes: Doped Sol-Gel Materials. *Acc. Chem. Res.*, 28, 328-334.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M., (1994), Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials. *Chem. Mater.*, 6, 1605-1614.
- Azeredo, H.M.C. (2012). Fundamentos de estabilidade de alimentos. *Embrapa Agroindustrial Tropical*, 5, 168.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Ghasemi, A., Kabir, A., Azizi, F., Hadaegh, F. (2015). Is dietary nitrate/nitrite exposure a risk factor for development of thyroid abnormality? A systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide*, 47, 65-76.
- Bamford, V. A., Angove, H. C., Seward, H. E., Thomson, A. J., Cole, J. A., Butt, J. N., Hemmings, A. M. and Richardson, D. J. (2002). The structure and spectroscopy of the cytochrome c nitrite reductase of *Escherichia coli*. *Biochem.* 41, 2921-2931.

- Bănică, Florinel-Gabriel (2012). *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications*. Chichester, UK: John Wiley & Sons. p. 576
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase--an overview. *Biotechnol Adv.* 27(4):489–501. doi:10.1016/j.biotechadv.2009.04.003.
- Bard, A. J., Faulkner, L. R. (2000). *Electrochemical Methods – Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons. 2nd edition.
- Bond, A. M.; Feldberg, S. (1998). Analysis of Simulated Reversible Cyclic Voltammetric Responses for a Charged Redox Species in the Absence of Added Electrolyte. *J.Phys.Chem.* 102: 9966–9974.
- Borgmann, S., Schulte, A., Neugebauer, S. and Schuhmann, W. (2011). Amperometric Biosensors, in *Advances in Electrochem. Scien. and Engin.: Bioelectroch.*, Volume 13.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Brett, C. M. A., e Oliveira-Brett, A. M. (1996) *Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações*. New York, US: Oxford University Press Inc.
- Brett, C. M. A., e Oliveira-Brett, A. M. (1998). *Electroanalysis*. New York, US: Oxford University Press Inc.
- Brinker, C.J., Scherer, G.W., (1990). *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, Boston.
- Bryan, N. S., Alexander, D. D., Coughlin, J. R., Milkowski, A. L., Boffetta, P. (2012). Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: An updated review. *Food and Chemical Toxicology* 50, 3646–3665.
- Bryan, N.S. Grisham, M.B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.*, 43, 645-657.
- Buerk, D.G. (1993). *Biosensors, theory and applications*. Technomic publishing co., Inc., Lancaster Basel.
- Cao, X. Luo, L. Ding, Y. Zou, X. Bian, R. (2008). Electrochemical methods for simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using cetylpyridine bromide/chitosan composite film-modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuat. B-Chem.*, 129, 941-946.
- Carturan, G., Dal Toso, R., Boninsegna, S., Dal Monte, R. (2004). Encapsulation of functional cells by sol-gel sílica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J. Mater. Chem.*, 14, 2087-2098.
- Catauro, M.; Bollino, F. (2012). Synthesis and characterization of amorphous and hybrid materials obtained by sol-gel processing for biomedical applications. In: *GUISTA, D. N. (Ed.). Biomed science, engineering and techno*. Massachusetts: InTech, p. 389-416.
- Chan, T.Y. (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinemia. *Toxicology letters*, 200, 107-108.
- Chaubey, A., Malhotra, B.D. (2002). Mediated biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 17, 441-456.
- Chen, H. et al. (2007). Chen, H. Highly sensitive nitrite biosensor based on the electrical wiring

of nitrite reductase by [ZnCr-AQS] LDH. *Electrochem. Communications* 9, 2240– 2245.

Chung, R.J., Wang, A-N., Peng, S-Y. (2017). An Enzymatic Glucose Sensor Composed of Carbon-Coated Nano Tin Sulfide. *Nanomaterials*, 7, 39; doi:10.3390/nano7020039

Clark, L.C., Lyons, C. (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.102, p.29.

Collinson, M.M. (2002). Recent trends in analytical applications of organically modified silicate materials. *TRAC Trends Anal. Chem.*, 21: 30-38.

Costa, C., Moura, J. J., Moura, I., Liu, M. Y., Peck, H. D., Jr., LeGall, J., Wang, Y. N., Huynh, B. H. (1990). Hexaheme nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans*: Mossbauer and EPR characterization of the heme groups. *J. Biol. Chem.* 265, 14382–14388.

Coté G.L., McNichols R.J. (2003). Glucose Diagnostics. In: *Biomedical Diagnostics I*. DOI: 10.1201/9780203008997.sec4

Couto, C., Araújo, A.N., Montenegro, M., Rohwedder, J., Raimundo, I., Pasquini, C. (2002). Application of amperometric sol-gel biosensor to flow injection determination of glucose. *Talanta* 56, 997-1003.

Crow, D.R. (1994). *Principles and applications of electrochemistry*. London: Blackie Academic & Professional. P.221-216.

Cunha, C. A., Macieira, S., Dias, J. M., Almeida, G., Goncalves, L. L., Costa, C., Lampreia, J., Huber, R., Moura, J. J., Moura, I. and Romao, M. J. (2003). Cytochrome c nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: The relevance of the two calcium sites in the structure of the catalytic subunit (NrfA). *J. Biol. Chem.* 278, 17455-17465.

DaSilva, S., Cosnier, S., Gabriela Almeida, M., Moura, J. J. G. (2004). An efficient poly(pyrrole–viologen)-nitrite reductase biosensor for the mediated detection of nitrite. *Electro-chem. Communications* 6, 404–408.

Dave, B.C., Dunn, B., Valentine, J.S., Zink, J.I. (1994). Sol-gel encapsulation methods for biosensors. *Anal. Chem.* 66(22): A1120-A1127.

Dutt J., Davis J. (2002). Current strategies in nitrite detection and their application to field analysis. *J. Environ. Monit.*, 4, 465-471.

DuVall, S. D., McCreery, R. (1999). Control of Catechol and Hydroquinone Electron-Transfer Kinetics on Native and Modified Glassy Carbon Electrodes. *Anal. Chem.* 71: 4594–4602.

Ebelmen, M. (1846). Recherches sur les combinaisons des acides borique et silicique avec les éthers. *Annales de chimie et de physique*, v. 16, p. 129.

Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. Kroneck, P. M. (1999) Structure of cytochrome c nitrite reductase. *Nature* 400, 476-480.

Einsle, O., Stach, P., Messerschmidt, A., Simon, J., Kroger, A., Huber, R. Kroneck, P. M. (2000). Cytochrome c nitrite reductase from *Wolinella succinogenes*: Structure at 1.6 Å resolution, inhibitor binding, and heme-packing motifs. *J. Biol. Chem.* 275, 39608-39616.

Ellis, G.; Adatia, I.; Yazdanpanah, M., Makela, S.K. (1998). Nitrite and nitrate analyses: a clinical biochemistry perspective. *Clin. Biochem.*, 31, 195-220.

- Evans, D.F., Wennerström, H. (1999). *The colloidal domain: Where physics, chemistry, biology, and technology meet*. 2nd ed., Wiley-VCH, New York.
- Fan, C. H. Suzuki, I. Chen, Q. Li, G. X. Anzai, J. I. (2000). An unmediated hydrogen peroxide sensor based on a hemoglobin-SDS film modified electrode. *Anal. Lett.*, 33, 2631-2644.
- Fernandes, S. C. Souza, F. D. Souza, B. S. Nome, F. Vieira, I. C. (2012). Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. *Sensors Actuat. B-Chem.*, 173, 483-490.
- Ferretti, S. Lee, S. MacCraith, B.D. Oliva, A.G. Richardson, D.J. Russell, D.A. Sapsforda, K.E. Vidalc, M. (2000). Optical biosensing of nitrite ions using cytochrome cd<sub>1</sub> nitrite reductase encapsulated in a sol-gel matrix. *Analyst*, 125, 1993-1999.
- Fewtrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental health perspectives*, 112, 1371-1374.
- Fraser, P., Chilvers, C. (1981). Health aspects of nitrate in drinking water. *Sci. Total Environ*, pp. 28, 103-116.
- Gali, A. (2009). *Desenvolvimento e Caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre Monocamadas Auto-organizadas para determinação de Açúcares em Alimentos*. Tese de Doutorado em Química Analítica. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos. 143pp.
- Ghasemi, A., Zahediasl, S. (2011). Is nitric oxide a hormone? *Iranian Biomedical Journal*, 15, 59-65.
- Ghasemi, A., Zahediasl, S. (2013). Potential therapeutic effects of nitrate/nitrite and type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 11, 63-64.
- Gilchrist, M., Benjamin, N. (2010). Vegetables and diabetes. Is nitrate the answer? *British Medical Journal*, 341, c5306. (b).
- Gilchrist, M., Winyard, P.G., Benjamin, N. (2010). Dietary nitrate-good or bad? *Nitric Oxide*, 22, 104-109. (a).
- Gill, I. (2001). Bio-doped Nanocomposite Polymers: sol-gel bioencapsulates. *Chem. Mat.*, 13(10) 3404-3421.
- Greef, R., Peat, R., Peter, L.M., Fletcher, D., Robinson, J. (1985). *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Gregg, B. A. and Heller, A. (1991). Redox polymer films containing enzymes. 1. A redox-conducting epoxy cement: synthesis, characterization, and electrocatalytic oxidation of hydroquinone. *J. Phys. Chem.* 95, 5970-5975.
- Guevara, J., Iwanejko, I., Dembinska-Kiec, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Gołabek, I., Bartus, S., Malczewska- Malec, M., Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta*, 274, 177- 188.
- Gupta, B. D., Sharma, D. K. (1997). Evanescent wave absorption based fiber optic pH sensor prepared by dye doped sol-gel immobilization technique. *Opt. Commun.* 140, 32-35.
- Guto, P.M. Rusling, J.F. (2006). Myoglobin retains iron heme and near-native conformation in DDAB films prepared from pH 5 to 7 dispersions. *Electrochem. Commun.*, 8, 455- 459.

- Hansen, T.A. (1994). Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes. *Anton. Van Leeuw.* 66, 165–185.
- Harper, A. Anderson, M.R. (2010). Electrochemical Glucose Sensors-Developments Using Electrostatic Assembly and Carbon Nanotubes for Biosensor Construction. *Sensors*, 10, 8248-8274.
- Hayat, A., Andreescu, S., Marty, J.-L. (2013). Design of PEG-aptamer two piece macromolecules as convenient and integrated sensing platform: Application to the label free detection of small size molecules. *Biosens. Bioelectron.*, 45, 168–173. (b).
- Hayat, A., Haider, W., Rolland, M., Marty, J.-L. (2013). Electrochemical grafting of long spacer arms of hexamethyldiamine on a screen-printed carbon electrode surface: Application in target induced ochratoxin A electrochemical aptasensor. *Analyst.*, 138, 2951–2957. (a).
- Hayat, A., Marty, J.L. (2014). Disposable Screen Printed Electrochemical Sensors: Tools for Environmental Monitoring. *Sensors*, 14, 10432-10453.
- Heller, A.; Feldman, B. (2008). Electrochemical glucose sensors and their applications in diabetes management. *Chem. Rev.* 108, 2482-2505.
- Helmke, S.M.; Duncan, M.W. (2007). Measurement of the NO metabolites, nitrite and nitrate, in human biological fluids by GC-MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 851, 83-92.
- Hirasawa, M., Tripathy, J.N., Sommer, F., Somasundaram, R., Chung, J.S., Nestander, M., Kruthiventi, M., Zabet-Moghaddam, M., Johnson, M.K., Merchant, S.S., Allen, J.P., Knaff D.B. (2009). Enzymatic future of bioenergy. *Photosynth. Res.*, 103:67-77.
- Holmberg, K., Jönsson, B., Kronberg, B., Lindman, B. (2003) Surfactants and polymers in aqueous solutions. 2<sup>nd</sup>ed., John Wiley and Sons, Ltd.
- Hord N.G., Tang Y., Bryan N.S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *Am. J. Clin. Nutr.*, 90:1-10.
- Hu, N. (2001). Direct electrochemistry of redox proteins or enzymes at various film electrodes and their possible applications in monitoring some pollutants. *Pure Appl. Chem.*, 73, 1979-1991.
- Iler, R.K. (1979). The chemistry of silica: Solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica. John Wiley and Sons, New York.
- Inoue-Choi, M, Anderson, K. E., Cerhan, J. R., Weyer P. J. and Ward, M. H. (2013) Dietary intake of nitrate and nitrite, nitrate in drinking water, and ovarian cancer risk among postmenopausal women in Iowa. *American Association for Cancer Research*. Vol. 73 pp. 149
- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes*, 7 ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. Acedido a Janeiro de 2017: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>
- Justino, C. I. L., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte A. C. (2013). Biossensores com nanotubos de carbono para aplicações clínicas: avanços tecnológicos. *Captar*. v.4, p.1-12.
- Kandimalla, V.B., Tripathi, V.S., Ju, H.X. (2006). Immobilization of biomolecules in sol-gels: biological and analytical applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 73-106.
- Karube, I.; Nomura, Y. (2000). Enzyme sensors for environmental analysis. *J. of Molecular Cataly. B*, v. 10, p. 177-181.

- Kauffmann, C.G., Mandelbaum, R.T. (1996). Entrapment of atrazine degrading enzymes in sol-gel glass. *J. Biotechnol.* 51, 219-225.
- Kevil, C.G., Kolluru, G.K., Pattillo, C.B., Giordano, T. (2011). Inorganic nitrite therapy: historical perspective and future directions. *Free Radic. Biol. Med.*, 51, 576-593.
- Kevil, C.G., Lefer, D.J. (2012). Nitrite and nitrate: from bench to bedside. *Nitric Oxide*, 26, 195-196. doi: 10.1016/j.niox.2012.04.165
- Kiang, C. H., Kuan, S. S., Guilbault, G. G. (1975). A novel enzyme electrode method for the determination of nitrite based on nitrite reductase. *Analytica. chemica. acta* 80, 209–14.
- Kilfoy, B. A., Zhang, Y., Park, Y., Holford, T. R., Schatzkin, A., Hollenbeck, A., Ward, M. H. (2011). Dietary nitrate and nitrite and the risk of thyroid cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. *International Journal of Cancer. J. Intern. Du Cancer*, 129(1), 160–172.
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technol.*, v. 35, n. 2-3, p. 126–139.
- Krajweska, B. (2009). Review Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic*, v. 59, n. 1, p. 22–40.
- Künzelmann, U., Böttcher, H. (1997). Biosensor properties of glucose oxidase immobilized within SiO<sub>2</sub> gels. *Sens. Actuators B* 39, 222-228.
- Kuznetsova, S., Knaff, D.B., Hirasawa, M., Sétif, P., Mattioli, T.A. (2004). Reactions of spinach nitrite reductase with its substrate, nitrite, and a putative intermediate, hydroxylamine. *Biochemistry*. 44:10765–10774.
- Lai, M.E.; Bergel, A. (2002). Direct electrochemistry of catalase on glassy carbon electrodes. *Bioelectro.*, 55, 157-160.
- Larsen, L. H., Damgaard, L.R., Kjær, T., Stenstrøm, T., Lynggard-Jensen, A., Revsbech, N. P. (2000). Fast responding biosensor for on-line determination of nitrate/nitrite in activated sludge. *Water Res.*, 9:2463-2468.
- Larsson, S.C. Orsini, N. Wolk, A. (2006). Processed meat consumption and stomach cancer risk: A meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 98, 1078–1087.
- Le Maire, M., Champeil, P., Moller, J. V. (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica. biophysica. acta* 1508, 86–111.
- Lee, S. H., Chung, J-H., Park, H-K., Lee, G-J. (2015). A Simple and Facile Glucose Biosensor Based on Prussian Blue Modified Graphite String. *J. of Sensors*. v. 2016, 6. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1859292>
- Lee, W.Y., Kim, S.R., Kim, T.H., Lee, K.S., Shin, M.C., Park, J.K. (2000). Sol-gel derived thick-film conductometric biosensors for urea determination in serum. *Anal. Chim. Acta* 404, 195-203. (a).
- Lee, W.Y., Lee, K.S., Kim, T.H., Shin, M.C., Park, J.K. (2000). Microfabricated Conduometric Urea Biosensor Based on Sol-Gel Immobilized Urease. *Electroanal.* 12, 78-82. (b).
- Lev, O., Wu, Z., Bharathi, S., Glezer, V., Modestov, A., Gun, J., Rabinovich, L., Sampath, S. (1997). Sol-Gel Materials in Electrochemistry. *Chem. Mat.* 9, 2354 – 2375.
- Li, J., Tan, S.N. (2000). Applications of Amperometric Silica Sol-Gel Modified Enzyme Biosensors. *Anal. Lett.* 33, 1467-1477.

- Li, J., Tan, S.N., Oh, J.T. (1998). Silica sol-gel immobilized amperometric enzyme electrode for peroxide determination in the organic phase. *J. Electroanal. Chem.* 448, 69-77.
- Liu, M.-C.; Costa, C.; Moura, I. (1994). Hexaheme nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) of the chapter. In *Methods in Enzymology*, Harry D. Peck, J.J.L., Eds.; Academic Press: Country; Volume 243 Volume 243, pp. 303-319.
- Liu, S., Sun, Y. (2007). Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections. *Biosensors & Bioelectronics* 22(6), 905-911.
- Liu, Y., Zhang, X., He, D., Ma, F., Fu, Q., Hu, Y. (2016) An amperometric glucose biosensor based on a MnO<sub>2</sub>/graphene composite modified electrode. *RSC Advances*, 6. 18654-18661.
- Lojou, É. Bianco, P. (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *J. Electroceram.* 16, 79-91.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Gladwin, M.T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7, 156-167.
- Machha, A., Schechter, A.N. (2011). Dietary nitrite and nitrate: a review of potential mechanisms of cardiovascular benefits. *European J. of Nutrition*, 50, 293-303.
- Machha, A., Schechter, A.N. (2012). Inorganic nitrate: a major player in the cardiovascular health benefits of vegetables? *Nutrition Reviews*, 70, 367-372.
- Mahmud, I. Samed, A. J. F. Haque, M. A. Susan, M. A. B. H. (2011). Electrochemical behavior of anthraquinone in aqueous solution in presence of a non-ionic surfactant. *J. Saudi. Chem. Soc.*, 15, 203-208.
- Mani, V., Devadas, B., Chen, S-M. (2013). Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 41, 309–315.
- Maniasso, N. (2001). Ambientes micelares em química analítica. *Quím. Nova*, 24, 87-93.
- Martinez-Pérez, D., Ferrer, M.L., Mateo, C.R. (2003). A reagent less fluorescent sol-gel biosensor for uric acid detection in biological fluids. *Anal. Biochem.* 322, 238-242.
- Mazurenko, I., Ghach, W., Kohring, G.W., Despas, C., Walcarius, A., Etienne, M. (2015). Immobilization of membrane-bounded (S)-mandelate dehydrogenase in sol-gel matrix for electroenzymatic synthesis. *Bioelectrochem.* 104:65-70. Doi: 10.1016/j.bioelechem.2015.03.004.
- Mealey, B.L. e Oalter, T.W. (2006). Diabetes Mellitus and Periondontal Diseases. *Journal of Periodontology*, 77:8, 1289-1303.
- Metters, J.P., Kadara, R.O., Banks, C.E. (2011). New directions in screen printed electroanalytical sensors: An overview of recent developments. *Analyst.*, 136, 1067–1076.
- Miao, Z., Wang, P., Zhong, A., Yang, M., Xu, Q., ShirongHao, Hu, X. (2015). Development of a glucose biosensor based on electrodeposited gold nanoparticles-polyvinylpyrrolidone-polyaniline nanocomposites. *J. of Electroanalytical Chemistry.* doi: 10.1016/j.jelechem.2015.08.025
- Milkowski, A., Garg, H. K., Coughlin, J. R., Bryan, N. S. (2010). Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk–benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 22(2), 110–119.
- Monteiro, T., Rodrigues, P. R., Gonçalves, A. L., Moura, J. J.G., Jubete, E., Añorga, L.,

- Piknova, B., Schechter, A. N., Silveira, C. M., Almeida, M. G. (2015). Construction of effective disposable biosensors for point of care testing of nitrite. *Talanta* 142, 246–251.
- Moorcroft, M.J. Davis, J. Compton, R.G. (2001). Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, 54, 785-803.
- Moreira, F.T., Moreira-Tavares, A.P., Sales, M.G. (2015). Current Topics in Medicinal Chemistry: Sol-gel-based biosensing applied to medicinal science. Bentham Science Publishers, Vol. 15, pp. 245-255(11).
- Moura, I. e Moura, J. J. G. (2001) Structural aspects of denitrifying enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 168-175.
- Narang, U. Prasad, P. N. Bright, F. V. Ramanathan, K. Kumar, N. D. Malhotra, B. D. Kamalasanan, M. N. Chandra, S. (1994). Glucose Biosensor Based on a Sol-Gel Derived Platform," *Analytical Chemistry*, Vol. 66, No. 19, pp. 3139-3144.
- Nasri, Z., Shams, E. (2013). A glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized onto glassy carbon electrode modified with nitrophenyl diazonium salt. *Electrochimica Acta* 112; 640–647. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.176>
- Navas Días, A., Ramos Peinado, M.C., Torijas Minguez, M.C. (1998). Sol–gel horseradish peroxidase biosensor for hydrogen peroxide detection by chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta* 363, 221.
- Nicholson, R.S. (1965). Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. *Anal. Chem.* 37: 1351–1355.
- Oliveira Neto, G., Yamanaka, H. (1988). Enzimas e materiais biológicos imobilizados: biossensores, *Quimica Nova*, v.11, p.432-435.
- Pakapongpan, S., Poo-arporn, R. P. (2017). Self-assembly of glucose oxidase on reduced graphene oxide-magnetic nanoparticles nanocomposite-based direct electrochemistry for reagentless glucose biosensor. *Materials Science & Engineering C*. doi: 10.1016/j.msec.2017.03.031
- Palanisamy, S., Cheemalapati, S., Chen, S-M. (2014). Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene oxide hybrid biocomposite. *Materials Science and Engineering C* 34, 207–213.
- Pauliukaite, R., Brett, C.M.A. (2005). Characterization of novel glucose oxysilane sol-gel electrochemical biosensors with copper hexacyanoferrate mediator. *Electrochim. Acta* 50, 4973-4980.
- Pauliukaite, R., Chiorcea-Paquim, A.-M., Oliveira-Brett, A.M., Brett, C.A.M. (2006). Electrochemical, EIS and AFM characterization of biosensors: trioxysilane sol-gel encapsulated glucose oxidase with two diferente redox mediators. *Electrochim. Acta* 52, 1-8.
- Pauliukaite, R., Doherty, A.P., Murnaghan, K.D., Brett, C.M.A. (2008). Application of some room temperature ionic liquids in the development of biosensors at carbon film electrodes. *Electroanalysis* 20, 485-490. (a).
- Pauliukaite, R., Schoenleber, M., Vadgama, P., Brett, C.M.A. (2008). Development of electrochemical biosensors based on sol-gel enzyme encapsulation and protective polymer membranes. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1121-1131. (b).
- Pearson, J.E. Gill, A., Vadgama, P. (2000) Analytical aspects of biosensors *Ann Clin Biochem* 37, 119-145.

- Pelletier M. M., Kleinbongard P., Ringwood L., Hito R., Hunter C.J., Schechter A.N., Gladwin M.T., Dejam, A. (2006). The measurement of blood and plasma nitrite by chemiluminescence: pitfalls and solutions. *Free Radic. Biol. Med.*, 41, 541-548.
- Pennington, J.A.T. (1998). Dietary exposure models for nitrates and nitrites. *Food Control*, 9(6), 385-395.
- Pereira, I. C., Abreu, I. A., Xavier, A. V., LeGall, J. and Teixeira, M. (1996). Nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) - a heterooligomer heme protein with sulfite reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 611-618.
- Plambeck, J.A. (1982). *Electroanalytical Chemistry: Basic Principles and Applications*, John Willey & Sons, New York.
- Pletcher, D., Greff, R., Peat, R., Peter, L. M., Robinson, J. (2001). *Instrumental Methods in Electrochemistry*, Cambridge, GB, Woodhead Publishing.
- Plumeré, N., Henig, J., Campbell, W.H. (2012). Enzyme-catalyzed O<sub>2</sub> removal system for electrochemical analysis under ambient air: application in an amperometric nitrate biosensor. *Analytical chemistry* 84, 2141-6.
- Price, C.P. (2003). Point-of-care testing in diabetes mellitus. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 1213-1219.
- Rabinovich, L., Lev, O. (2001). Sol-Gel Derived Composite Ceramic Carbon Electrodes. *Electroanalysis* 13, 265-275.
- Rahman, M.M. Ahammad, A.J.S. Jin, J.-H. Ahn, S.J. Lee, J.-J. (2010). A Comprehensive Review of Glucose Biosensors Based on Nanostructured Metal-Oxides. *Sensors*, 10, 4855-4886.
- Rajbongshi, J. Das, D. K. Mazumdar, S. (2010). Direct electrochemistry of dinuclear Cu: A fragment from cytochrome c oxidase of *Thermus thermophilus* at surfactant modified glassy carbon electrode. *Electrochim. Acta*, 55, 4174-4179.
- Riley, T., Watson, A. (1987). *Polarographic and other Voltammetric Methods*, John Willey & Sons, London.
- Rodrigues, M.L., Oliveira, T.F., Pereira, I.A.C., Archer, M. (2006). X-ray structure of the membrane-bound cytochrome c quinol dehydrogenase NrfH reveals novel haem coordination. *EMBO Journal*, 25, 5951-5960.
- Rodrigues, P.R. dos S. (2013). Development of oxidoreductase based electrochemical biosensors, em <http://hdl.handle.net/10362/10427>.
- Romitelli, F. Santini, S. Chierici, E. Pitocco, D. Tavazzi, B. Amorini, A. M. Lazzarino, G. Stasio. (2007). Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 851 (1-2), 257-267.
- Rosa, C. C., Cruz, H. J., Vidal, M., Oliva, A. G. (2002). Optical biosensor based on nitrite reductase immobilised in controlled pore glass. *Biosensors & bioelectronics* 17, 45- 52.
- Rusling, J.F. (1998). Enzyme Bioelectrochemistry in Cast Biomembrane-Like Films. *Acc Chem Res.*, 31, 363-369.
- Rusling, J.F. Nassar, A.E.F. (1993). Enhanced electron transfer for myoglobin in surfactant films

on electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 11891-11897.

Sampath, S., Lev, O. (1996). Inert Metal. Modified, Composite Ceramic-Carbon, Amperometric Biosensors: Renewable, Controlled Reactive Layer. *Anal. Chem.* 68, 2015-2021.

Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation (Review), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 10-17.

Scharf M., Moreno C., Costa C., Van Dijk C., Payne W.J., LeGall J., Moura I., Moura J.J., (1995). Electrochemical Studies on Nitrite Reductase toward a Biosensor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 209, 1018–1025.

Scouten, W., Loung, J., Stephenbrown, R. (1995). Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. *Trends in Biotechnology* 13, 178-185.

Seddon, A. M., Curnow, P., Booth, P. J. (2004). Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et biophysica acta* 1666, 105–17.

Senel, M., Dervisevic, M., Çevik, M. (2013). A novel amperometric glucose biosensor based on reconstitution of glucose oxidase on thiophene-3-boronic acid polymer layer. *Current Applied Physics*. 13, 1199-1204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cap.2013.03.004>

Serra, A.S., Jorge, S.R., Silveira, C.M., Moura, J.J.G., Jubete, E., Ochoteco, E., Cabañero, G., Grande, H., Almeida, M.G. (2011). Cooperative use of cytochrome cd1 nitrite reductase and its redox partner cytochrome c552 to improve the selectivity of nitrite biosensing. *Anal Chim Acta* 693 (1–2):41-46

Silva, S. M., Alves, R., Machado, S. A. S., Mazo, L. H., Avaca, L. A. (1996). Electrochemical determination of nitrites in natural waters with ultramicroelectrodes *Electroanalysis*, 8,1055–1059.

Silveira, C. M. C. F. (2011). Development of electrochemical nitrite biosensors using cytochrome c nitrite reductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, em <http://hdl.handle.net/10362/6811>

Silveira, C. M., Baur, J., Holzinger, M., Moura, J. J. G., Cosnier, S. and Almeida, M. G. (2010). Enhanced Direct Electron Transfer of a Multihemic Nitrite Reductase on Single-walled Carbon Nanotube Modified Electrodes. *Electroanalysis*, 22: 2973–2978. (b).

Silveira, C. M., Gomes S.P., Araujo A.N., Montenegro M.C., Todorovic S., Viana A.S., Silva R.J., Moura J.J.G., Almeida M.G. (2010). An efficient non-mediated amperometric biosensor for nitrite determination. *Biosensors & bioelectronics* 25, 2026–32. (a).

Site wikipédia – potenciostato, acedido em Agosto de 2016: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato>.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. (1990). *Principles of Instrumental Analysis*. 5, Saunders College Publishing.

Skoog, D.A., Leary, J.J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*, 4<sup>th</sup> ed., Saunders College Publishing, Philadelphia.

Smith, K., Silvernail, N.J., Rodgers, K.R., Elgren, T.E., Castro, M., Parker, R.M. (2002). Sol-gel encapsulated horseradish peroxidase: a catalytic material for peroxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 4247-52.

Stach, P., Einsle, O., Schumacher, W., Kurun, E., Kroneck, P.M. (2000). Bacterial cytochrome c nitrite reductase: new structural and functional aspects. *J. Inorg. Biochem.* ,79(1-4):381-5.

Steiner, M.-S. Duerkop, A. Wolfbeis, O. S. (2011). Optical methods for sensing glucose. *Chemical Society Reviews*, v. 40, n. 9, p. 4805-4839.

Strehlitz, B. et al. (1996). A nitrite sensor based on a highly sensitive nitrite reductase mediator-coupled amperometric detection. *Analytical chemistry* 68, 807–16.

Swamy, U., Wang, M., Tripathy, J.N., Kim, S-K., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Allen, J.P. (2005). Structure of spinach nitrite reductase: implications for multi-electron reactions by the iron–sulfur: siroheme cofactor. *Biochemistry*. 44:16054–16063.

Tadros, T.F. (2005). Introduction, in *Applied Surfactants: Principles and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG. doi: 10.1002/3527604812.ch1

Taleat, Z., Khoshroo, A., Mazloum-Ardakani, M. (2014) Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013) *Microchimica Acta*. 181(9–10):865–891.

Thévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (1999). Electrochemical biosensor: recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.*, v.71, p.2333-2348.

Trévenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A., Wilson, G.S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensor & Bioelectronics*, V.16, p.121-131.

Tripathi, V.S., Kandimalla, V.B., Ju, H. (2006). Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules. *Sens Actuators B Chem.*, 114:1071–1082.

Tsai, H.C., Doong, R.A., Chiang, H.C., Chen, K.T. (2003). Sol-gel derived urease-based optical biosensor for the rapid determination of heavy metals. *Anal. Chim. Acta* 481, 75-84.

Turner, A., Wilson, G., Kaube, I. (1987). *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford, UK: Oxford University Press. P. 770.

Unnikrishnan, B.; Palanisamy, S.; Chen, S.-M. (2013). A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 39, n. 1, p. 70-75.

Van Grinsven, H.J., Ward, M.H., Benjamin, N., de Kok, T.M. (2006). Does the evidence about health risks associated with nitrate ingestion warrant an increase of the nitrate standard for drinking water? *Environmental Health*, 5, 1-6.

Van Unen, D.J., Engbersen, J.F.J., Reinhoudt, D.N. (2001). Sol-gel immobilization of serine proteases for application in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* 75, 154-158.

Vittal, R. Gomathi, H. Kim, K.-J. (2006). Beneficial role of surfactants in electrochemistry and in the modification of electrodes, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 119, 55-68.

Walcarius, A., Collinson, M. M. (2009). Analytical chemistry with silica sol-gels: traditional routes to new materials for chemical analysis. *Annual review of analytical chemistry (Palo Alto, Calif.)* 2, 121–43.

Wang, B., Zhang, J., Dong, S. (2000). Silica sol–gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 15, 397-402. (c).

Wang, B. Q., Dong, S. J. (2000). Organic-phase enzyme electrode for phenolic determination based on a functionalized sol-gel composite. *J. Electroanal. Chem.* 487, 45-50. (b).

- Wang, B. Q., Zhang, J. Z., Cheng, G. J., Dong, S. J. (2000). Amperometric biosensor for inert organic solvents based on a sol-gel hybrid material. *Chem. Commun.* 2123-2124. (a).
- Wang, J. (1985). *Stripping Analysis - Principles, Instrumentation and Applications*, VCH Publishers, Deerfield Beach.
- Wang, J., Pamidi, P.V.A., Park, D.S. (1996). Screen-printable sol-gel enzyme-containing carbon inks. *Anal. Chem.* 68, 2705-2708.
- Wang, Q. L., Lu, G. X., Yang, B. J. (2004). Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin immobilized on carbon paste electrode by silica sol-gel film, *Biosens. Bioelectron.*, 19, 1269-1275.
- Wang, X., Uchiyama, S. (2013). *Polymers for Biosensors Construction. State of the Art in Biosensors - General Aspects*, Dr. Toonika Rincken (Ed.), InTech. Doi: <http://dx.doi.org/10.5772/54428>
- Wasser, I. M., de Vries, S., Moenne-Loccoz, P., Schroder, I. e Karlin, K. D. (2002) "Nitric oxide in biological denitrification: Fe/Cu metalloenzyme and metal complex NO(x) redox chemistry." *Chem Rev* 102, 1201-1234.
- WHO (2011). Nitrate and nitrite in drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization. Acedido a Junho 2016, a partir de: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/nitratennitrite2ndadd.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/nitratennitrite2ndadd.pdf)
- Winger, M., De Vries, A. H., Van G., Wilfred F. (2009). Force-field dependence of the conformational properties of  $\alpha,\omega$ -dimethoxypolyethylene glycol. *Molecular Physics*. 107 (13): 1313.
- Wu, B. Hou, S. Miao, Z. Zhang, C. Ji, Y. (2015). Layer-by-Layer Self-Assembling Gold Nanorods and Glucose Oxidase onto Carbon Nanotubes Functionalized Sol-Gel Matrix for an Amperometric Glucose Biosensor. *Nanomaterials*. 5(3), 1544-1555. doi:10.3390/nano5031544 (a)
- Wu, C., Sun, H., Li, Y., Liu, X., Du, X., Wang, X., Xu, P. (2015). Biosensor based on glucose oxidase-nanoporous gold co-catalysis for glucose detection. *Biosensors and Bioelectronics* 66, 350-355. (b).
- Wu, Q., Wang, L., Haojie, Y., Wang, J. and Chen, Z. (2011). Organization of glucose-responsive systems and their properties. n. 1520- 6890 (Electronic).
- Xu, Y. Hu, C. Hu, S. (2009) Single-chain surfactant monolayer on carbon paste electrode and its application for the studies on the direct electron transfer of hemoglobin. *Bioelectrochemistry*, 74, 254-259.
- Yang, Z., Tang, Y., Li, J., Zhang, Y., Hu, X. (2014). Facile synthesis of tetragonal columnar-shaped TiO<sub>2</sub> nanorods for the construction of sensitive electrochemical glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 54, n. 0, p. 528-533.
- Yoo, E.-H., Lee, S.-Y. (2010). Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors*. 10, 4558-4576.
- Zhang, M., Yuan, D.X., Chen, G.H., Li, Q.L., Zhang, Z., Liang, Y. (2008). Design of a field flow system for the on-line spectrophotometric determination of phosphate, nitrite and nitrate in natural water and wastewater. *Microchim. Acta* 160:461.
- Zhang, Z. et al. (2009). A novel nitrite biosensor based on conductometric electrode modified with cytochrome c nitrite reductase composite membrane. *Biosensors & bio-electronics* 24, 1574-9.

Zhang, Z.; Rusling, J.F. (1997). Electron transfer between myoglobin and electrodes in thin films of phosphatidylcholines and dihexadecylphosphate. *Biophys Chem.*, 63, 133-146.

Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 533-616.



## 6. Anexos

### A.1 Eletroquímica

Muitas das reações químicas que ocorrem nos seres vivos são do tipo oxidação-redução e delas fazem parte as reações que fornecem energia necessária para a preservação da vida.

A eletroquímica envolve o estudo da resposta química de um sistema a um estímulo elétrico. Os processos eletroquímicos são reações redox (oxidação – redução) nas quais a energia libertada por uma reação espontânea é convertida em eletricidade ou nas quais a eletricidade é usada para forçar a ocorrência de uma reação química não espontânea. Estas reações envolvem cargas elétricas que se deslocam entre os elétrodos e um eletrólito (ou espécies iônicas em solução), e podem fornecer informações sobre a concentração, cinética, mecanismos de reação, estado químico da espécie em solução. Assim, a eletroquímica trata da interação entre a energia elétrica e reações químicas [Brett e Oliveira-Brett, 1996; Brett e Oliveira-Brett, 1998].

Num ensaio eletroquímico, os elétrodos estão ligados por meios condutores, quer externamente através de fios condutores (fios elétricos, etc.), quer no interior da solução através do eletrólito de suporte (transporte iônico), de tal modo que a carga possa ser transportada. Nos processos eletroquímicos, a reação ocorre sempre no eletrodo de trabalho, especificamente na camada fina de solução adjacente à superfície do eletrodo, isto é, a interface eletrodo - eletrólito de suporte. O potencial do eletrodo de trabalho é controlado através do eletrodo de referência e com a ajuda de um potenciostato. O eletrodo de referência utilizado no ensaio eletroquímico deve possuir uma impedância elevada de modo a não passar corrente por ele. A corrente da célula eletroquímica flui entre o eletrodo de trabalho e o contra - eletrodo através do eletrólito de suporte. Em todos os ensaios eletroquímicos é possível medir um ou mais dos quatro parâmetros: potencial (E), corrente (I), carga (Q) e tempo (t) [Brett e Oliveira-Brett, 1996; Brett e Oliveira-Brett, 1998].

Para se descrever qualquer processo eletroquímico deve considerar-se em primeiro, o transporte da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo e segundo, a reação que ocorre no eletrodo. O transporte de massa da solução ao eletrodo de trabalho é conduzido por processos de transferência de massa: a migração, a convecção e a difusão. O transporte de massa por migração resulta de forças exercidas por um campo elétrico em partículas com carga elétrica, só afeta espécies carregadas e o seu efeito é minimizado com recurso a uma quantidade elevada de eletrólito inerte. A convecção surge devido a efeitos térmicos, mecânicos ou quaisquer outras perturbações da solução, e ainda devido a variações de densidade perto da superfície do eletrodo. A difusão é o processo de transferência de massa mais largamente estudado e ocorre como resultado de gradientes de concentração, sendo que este processo faz parte de todas as medições eletroquímicas. Na proximidade da superfície do eletrodo as espécies eletroativas são transportadas só através da difusão, exceto no caso em que a espécie eletroativa está adsorvida [Skoog e Leary, 1992].

### A.2 Voltametria

Dos vários métodos existentes para estudar os processos eletroquímicos, as técnicas de voltametria são as mais utilizadas e têm sido usadas para identificar espécies presentes em solução de forma a obter dados quantitativos e qualitativos e para estudar a natureza e os mecanismos das reações que ocorrem no sistema eletroquímico.

A voltametria é classificada como uma técnica dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ( $i > 0$ ) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial [Skoog e Leary, 1992]. Assim, as informações sobre a espécie eletroativa são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica no eletrodo de

trabalho ao fazer-se variar o potencial [Greef *et al.*, 1985].

O registo da corrente em função do potencial, é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de eletrões durante um processo redox, pode ser relacionada com a quantidade de espécie eletroactiva presente na interface do eléctrodo e consequentemente, na célula eletroquímica.

As técnicas de voltametria mais usadas são:

- Técnicas de varrimento cíclico de potencial – incluem a voltametria cíclica (CV) e consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um potencial, que varia de forma cíclica com o tempo;
- Técnicas de degrau e impulso – incluem a voltametria de impulso diferencial (DP) e de onda quadrada (SW) e consistem na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente que altera instantaneamente o sistema.

### **A.2.1 Voltametria cíclica**

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente utilizada para adquirir informações sobre os processos eletroquímicos, tais como determinar a estabilidade dos produtos da reação e a presença de intermediários nas reações redox, a cinética da transferência de eletrões e a reversibilidade de uma reação [Riley e Watson, 1987; Nicholson, 1965; DuVall e McCreery, 1999; Bond e Feldberg, 1998]. Deve salientar-se, que a técnica gera, em muitas situações, somente resultados qualitativos das reações eletroquímicas. Quanto às medidas quantitativas mais precisas, estas são normalmente obtidas com a utilização de técnicas de degrau e impulso [Crow, 1994].

O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox a que o composto em questão é sujeito no eléctrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos [Wang, 1985].

Neste tipo de voltametria, os sistemas eletroquímicos podem ser de dois tipos: reversíveis ou irreversíveis. O sistema eletroquímico tem início com a redução da espécie eletroactiva presente na superfície do eléctrodo de trabalho, onde o varrimento do potencial decorre no sentido negativo, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto (pico catódico). Quando o potencial atinge um valor ao qual nenhuma reação de redução é observada, o potencial é varrido no sentido inverso, até o valor inicial. Num sistema eletroquímico reversível (Figura A.1), a espécie reduzida que ainda se encontra junto da superfície do eléctrodo será oxidada, gerando um pico simétrico ao pico da redução (pico anódico).

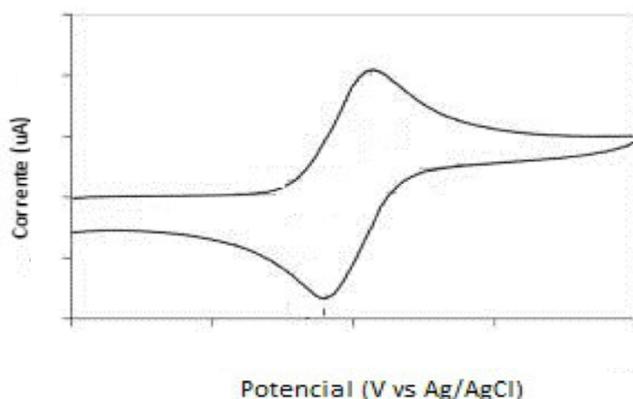


Figura A.1 - Voltamograma cíclico de um sistema eletroquímico reversível [adaptado de Pletcher *et al.*, 2001].

Num sistema eletroquímico irreversível (Figura A.2), a velocidade de transferência dos elétrons não mantém o equilíbrio das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, o que leva consequentemente, a que a forma do voltamograma cíclico seja diferente de um sistema reversível, observando-se a ausência do pico catódico [Pletcher *et al.*, 2001].

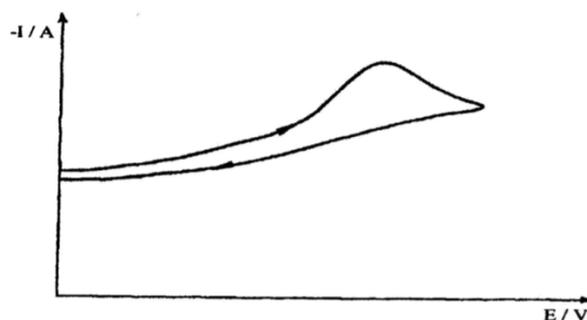


Figura A.2 - Voltamograma cíclico para um sistema eletroquímico irreversível [adaptado de Pletcher *et al.*, 2001].

Em voltametria cíclica pretende-se que o transporte de massa se dê apenas por difusão. Por este motivo, a solução contendo a espécie eletroativa encontra-se em repouso (elimina-se assim a convecção), e o fenómeno da migração é eliminado com a utilização do eletrólito de suporte. Este, ao mesmo tempo que previne a migração da espécie eletroativa em estudo, assegura a condutividade da solução [Plambeck, 1982].

Com esta técnica torna-se assim possível escolher as melhores condições experimentais a serem utilizadas posteriormente com outros métodos, uma vez que, é possível fazer variar um vasto conjunto de parâmetros, como por exemplo, o tipo de eletrodo de trabalho e de referência, o tipo de eletrólito de suporte bem como o valor da sua concentração, o tipo de solvente, a velocidade de varrimento do potencial e a temperatura [Bard e Faulkner, 2000].

### A.3 Células eletroquímicas

As células eletroquímicas são do tipo eletrolítico e podem ter dois ou três elétrodos. Em sistemas muito condutores em que as intensidades de correntes produzidas são muito baixas, é suficiente a utilização de dois elétrodos para as medições voltamétricas: o eletrodo de trabalho que é sujeito às variações de potencial e o eletrodo de referência. Os elétrodos de referência mais frequentemente usados são de prata-cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) e o eletrodo saturado de calomelanos ( $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ). Nas células eletroquímicas com dois elétrodos, o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho face ao eletrodo de referência, de modo a que o eletrodo de trabalho é o único polarizado. Mas este sistema apresenta alguns inconvenientes, pois a corrente resultante do varrimento de potencial percorre o eletrodo de referência; quando a resistência da célula aumenta, como no caso de um meio não aquoso, a corrente que passa através dos elétrodos, aumentará, o que irá provocar distorções nos voltamogramas, tornando inviável a utilização da técnica nestas condições. Para ultrapassar estes inconvenientes, as células eletroquímicas com três elétrodos (Figura 8.3) são empregues mais frequentemente. O terceiro eletrodo é denominado contra-elétrodo, podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo, etc, e é por onde circulam os eletrões envolvidos nos processos de redução e/ou oxidação. Este eletrodo é introduzido na célula eletroquímica para que quando é aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, a resistência do eletrodo de referência aumente e a do contra-elétrodo diminua. Assim, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o contra-elétrodo, evitando que ocorram perturbações no eletrodo de referência. A célula de três elétrodos é a mais adequada para soluções diluídas e com uma elevada resistência [Plambeck, 1982; Skoog *et al.*, 1990].

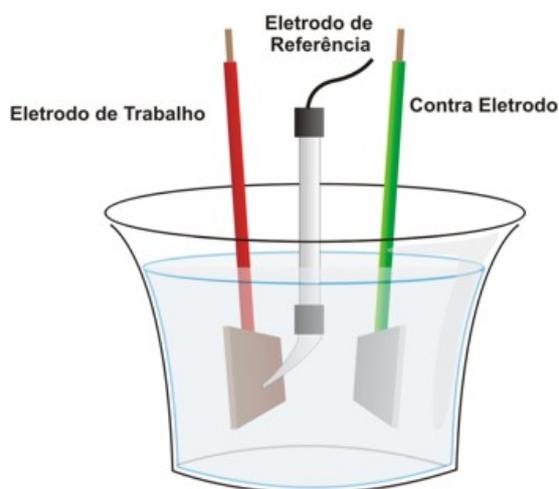


Figura A.3 -Representação esquemática mostrando a célula eletroquímica com três elétrodos [https://pt.wikipedia.org/wiki/Potenciostato].

## B.1 Eléttodos *Screen-Printed*

No contexto da aplicaço em biossensores eletroquímicos, a miniaturizaço de elttodos foi utilizada para obter várias vantagens fundamentais e práticas em relao aos materiais e instrumentos volumosos usados nos protocolos de análise, tais como uma reduço drástica no volume de amostra usada, a portabilidade e a eficiência de custos. Para atender às necessidades da análise rápida das amostras no próprio local de recolha,  necessário deslocar elttodos, células e equipamentos, o que se torna impraticável [Hayat e Marty,2014]. A construo de dispositivos impressos em suportes tem permitido o desenvolvimento de uma vasta gama de novos sistemas de elttodos. A tecnologia de impresso em tela de elttodos (*Electrode Screen-Printing (SPE)*)  uma técnica bastante apropriada para a produo de sistemas de elttodos econmicos, portáteis, descartáveis e um baixo custo [Hayat *et al.*, 2013 (a); Hayat, Haider *et al.*, 2013 (b)]. Esta tecnologia permite que na mesma superfície, sejam impressos o elttodo de trabalho, o elttodo de referencia e o contra elttodo [Mettters *et al.*, 2011] – Figura B.1.

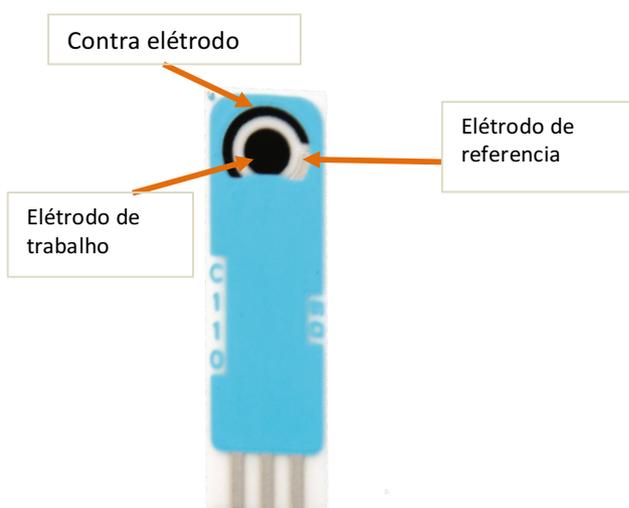


Figura B.1 - Ilustrao de um exemplo de um SPE. [adaptado de [http://www.dropsens.com/en/pdfs\\_productos/new\\_brochures/110-c110.pdf](http://www.dropsens.com/en/pdfs_productos/new_brochures/110-c110.pdf)]

Com a sociedade em constante desenvolvimento e crescimento, as exigências como a rapidez, a portabilidade e a exatido de análise têm vindo a aumentar. A tecnologia de impresso em tela oferece assim uma forma atraente de produzir sensores eletroquímicos de nova gerao. Como tal, a comunidade científica tem demonstrado interesse na conceo destes dispositivos devido  possibilidade de produo em massa e a baixo custo. Além disso, estes sensores permitem a modificao dos elttodos através de diferentes tintas comerciais, tornando estes altamente específicos para um analito alvo, sendo esta característica de extrema importância na área da investigao [Taleat *et al.*, 2014].

Neste trabalho foi feita uma tentativa de miniaturizao do biossensor de nitrito baseado no sistema SPE/ccNiR. Para tal, o elttodo de grafite pirolítica (PGE) foi substituído por elttodos impressos de pasta de carbono (SPE). Estes resultados foram obtidos com o sistema de remoo de O<sub>2</sub> em soluo.

### B.1.1 Biossensor de nitrito baseado em SPE

A resposta por voltametria cíclica do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR, na presença de concentrações crescentes de nitrito pode ser observada na Figura B.2. A Tabela B.1 resume os parâmetros analíticos do mesmo.

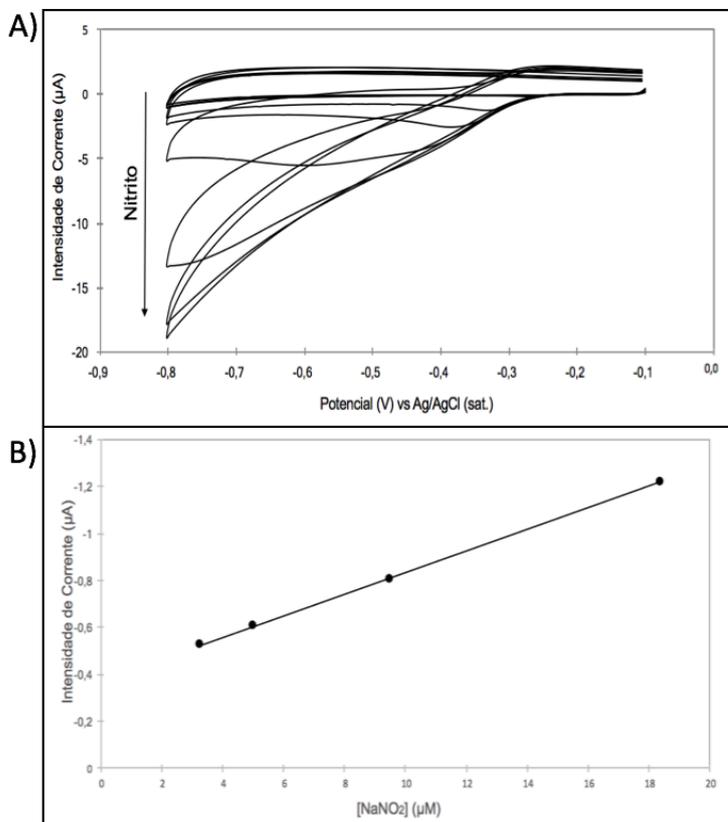


Figura B.2 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR (41,8 pmol) obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4  $\mu\text{M}$ ). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, com o sistema de remoção de  $\text{O}_2$  em Solução. Velocidade de varrimento =  $0,05 \text{ Vs}^{-1}$ . B) Curva de calibração ( $y = -0,046x - 1^{-7}$ ;  $r^2 = 0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a  $-0,8 \text{ V}$  vs Ag/AgCl.

Tabela B.1 - Parâmetros analíticos do biossensor de nitrito baseado no sistema SPE/ccNiR.

	Sensibilidade ( $\text{AM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ )	Intervalo de Linearidade ( $\mu\text{M}$ )
SPE/ccNiR (n=2)	0,5 ( $\pm 0,2$ )	3 - 18

A comparação dos parâmetros analíticos deste biossensor com os obtidos com bioelétrodo baseado no PGE mostram uma redução de 40% da sensibilidade e um intervalo de linearidade menos amplo (ver secção 3.1.1).

## B 1.2 ccNiR immobilizada na presença de DDM

A Figura B.3 mostra a resposta eletroquímica do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR+DDM, na presença de diferentes concentrações de nitrito. Os parâmetros analíticos estão compilados na Tabela B.2.

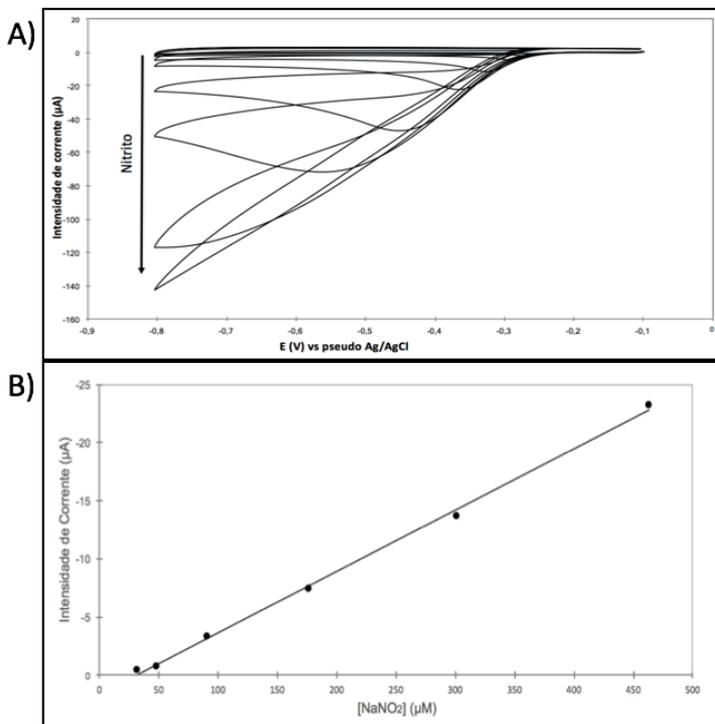


Figura B.3 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR+DDM obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4  $\mu\text{M}$ ). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, com o sistema de remoção de  $\text{O}_2$  em solução. Velocidade de varrimento = 0,05  $\text{Vs}^{-1}$ . B) Curva de calibração ( $y = -0,0529x + 2^{-6}$ ;  $r^2 = 0,998$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl.

Tabela B.2 - Parâmetros analíticos do biossensor de nitrito baseado no sistema SPE/ccNiR+DDM.

	Sensibilidade ( $\text{AM}^{-1}\text{cm}^{-2}$ )	Intervalo de Linearidade ( $\mu\text{M}$ )
ccNiR (n=2)	0,5 ( $\pm 0,2$ )	3 - 18
ccNiR+DDM (n=5)	0,364 ( $\pm 0,009$ )	10/18 - 463

A sensibilidade e o limite inferior do intervalo de linearidade foram sacrificados.

## B 1.3 Variação da quantidade de ccNiR

Os voltamogramas da Figura B.4, mostra a resposta catalítica do biossensor baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM preparado com diferentes quantidades de enzima (22; 33,3 e 44,7 pmol). Os respectivos parâmetros analíticos são apresentados na Tabela B.3.

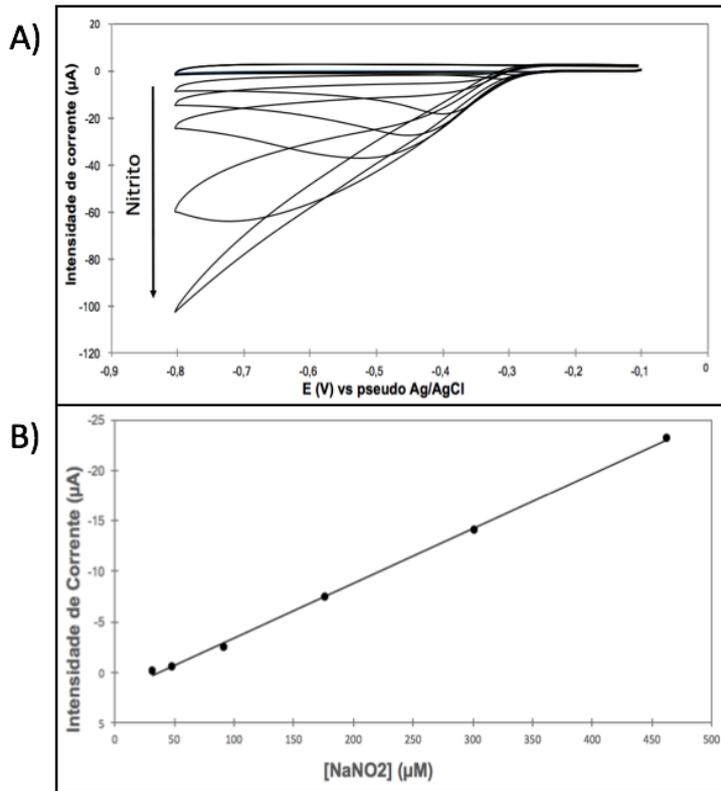


Figura B.4 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR(44,7pmol)+DDM obtidos na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, com o sistema de remoção de O<sub>2</sub> em em solução. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y = -0,0541x + 2^{-6}$ ;  $r^2 = 0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl.

Tabela B.3 - Parâmetros analíticos do biossensor de nitrito baseado no sistema SPE/ccNiR+DDM, com as diferentes quantidades de ccNiR, aplicadas no SPE.

Quantidade (pmol)	Sensibilidade (AM <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	Intervalo de Linearidade (µM)
22 (n=4)	0,34 (±0,01)	10/18 - 463
33,3 (n=5)	0,36 (±0,01)	10/18 - 463
44,7 (n=5)	0,40 (±0,02)	18/31 - 463

Da análise da Tabela B.3, conclui-se que a variação dos parâmetros analíticos não é significativamente dependente da quantidade de enzima.

#### B 1.4 Variação da temperatura

A resposta catalítica do biossensor por voltametria cíclica baseado no sistema PGE/ccNiR+DDM medida a diferentes temperaturas (10, 22, 30 e 40°C) pode ser observado na Figura B.5. A Tabela B.4 resume os parâmetros analíticos do mesmo.

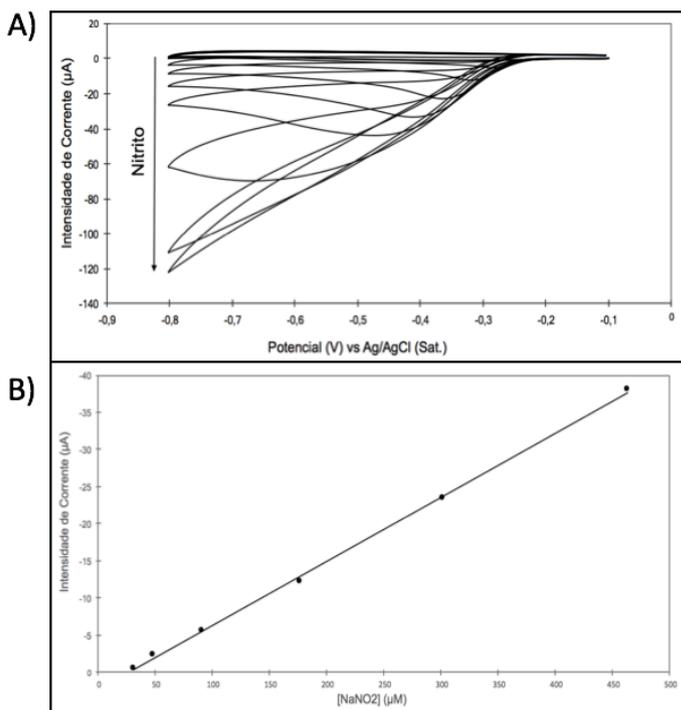


Figura B.5 - A) Voltamogramas cíclicos do biossensor baseado no sistema SPE/ccNiR(41,8 pmol)+DDM, a uma temperatura controlada de 40°C, na presença de concentrações crescentes de nitrito (0,05 - 844,4 µM). Eletrólito suporte Tris-HCl 100 mM pH 7,6 em KCl 100 mM KCl, com o sistema bienzimático em solução. Velocidade de varrimento = 0,05 Vs<sup>-1</sup>. B) Curva de calibração ( $y = -0,0863x + 2^{-6}$ ;  $r^2 = 0,999$ ) correspondente à variação da corrente catalítica em função da concentração de nitrito, a uma temperatura controlada de 40°C. Correntes catalíticas medidas no potencial de inversão a -0,8 V vs Ag/AgCl.

Tabela B.4 - Parâmetros analíticos do biossensor de nitrito baseado no sistema SPE/ccNiR(41,8 pmol)+DDM, com as diferentes temperaturas testadas.

Temperaturas (°C)	Sensibilidade(Am <sup>-1</sup> cm <sup>-2</sup> )	Intervalo de Linearidade (µM)
10°C (n=4)	0,37 (±0,03)	31/48 – 301/463
30°C (n=5)	0,46 (±0,02)	18/31 – 301/463
40°C (n=4)	0,5 (±0,1)	31/48 - 463

Ao analisar a Tabela B.4, conclui-se que aumentando a temperatura, de 10 para 40°C, os valores de sensibilidade aumentam gradualmente, mas não representam uma melhoria significativa que justifique o recurso a temperaturas de trabalho superiores à temperatura ambiente.



