



MODELAGEM, ANÁLISE E OTIMIZAÇÃO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS BASEDOS EM ENZIMAS

Sabrina Garcia Secchi

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador(es): Tito Lívio Moitinho Alves
Helen Conceição Ferraz

Rio de Janeiro

Março de 2017

MODELAGEM, ANÁLISE E OTIMIZAÇÃO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS BASEDOS EM ENZIMAS

Sabrina Garcia Secchi

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr., D.Sc.

Dr^a. Neuman Solange de Resende, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2017

Secchi, Sabrina Garcia

Modelagem, análise e otimização de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas/ Sabrina Garcia Secchi. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XVIII, 108 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

Helen Conceição Ferraz

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 91-100.

1. Biossensores eletroquímicos. 2. Modelagem. 3. Análise. 4. Otimização I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores Tito e Helen pela orientação, prontidão na ajuda e incentivo durante toda a realização desse trabalho.

Agradeço ao meu pai Argimiro pela grande ajuda e por estar constantemente transmitindo seus vastos conhecimentos, auxiliando na minha formação.

Agradeço à minha mãe por estar sempre ao meu lado, não importando as circunstâncias. À minha irmã Karina por sempre me incentivar a dar o meu melhor.

Agradeço ao Laboratório de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) por todo o suporte para a realização desta dissertação. Aos colegas do GRIFIT, em especial à Amanda, Nathália, João e Carla, pela disponibilidade de tempo, auxiliando-me atenciosamente sempre que precisei.

Agradeço ao Laboratório de Bioprocessos, pela ajuda na condução de alguns experimentos, principalmente à Mônica. Ao Laboratório PAM, principalmente à Thaís, pela ajuda com o MEV.

Agradeço às minhas grandes amigas Fernanda, Meire e Thaís por terem dividido comigo experiências inesquecíveis e por tornarem meus dias mais divertidos.

Agradeço às minhas grandes amigas Cassiele e Mariana por incontáveis anos de amizade incondicional.

Agradeço à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na elaboração desse trabalho.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

MODELAGEM, ANÁLISE E OTIMIZAÇÃO DE BIOCENSORES
ELETROQUÍMICOS BASEDOS EM ENZIMAS

Sabrina Garcia Secchi

Março/2017

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves
Helen Conceição Ferraz

Programa: Engenharia Química

Nesse trabalho, foram desenvolvidos modelos matemáticos para descrever o comportamento de biossensores amperométricos de segunda e terceira geração baseados em enzimas. Dados experimentais foram coletados utilizando biossensores baseados em peroxidase de raiz forte (HRP) para representar os biossensores de terceira geração, e biossensores baseados em glicose oxidase (GOx) para representar os de segunda geração. Os modelos propostos tiveram seus parâmetros estimados e foram validados com esses dados experimentais. Os altos coeficientes de determinação obtidos indicam que os modelos foram capazes de descrever adequadamente o comportamento dos biossensores. Simulações foram realizadas utilizando os modelos propostos e os resultados mostraram que ambos os sistemas são limitados pela difusão. Por fim, foram realizadas análises de sensibilidade via construção de superfícies de resposta simulada e otimizações dos desempenhos dos biossensores. Os resultados mostraram que, para ambos os tipos de biossensores estudados, uma alta concentração de enzima na menor espessura possível de filme polimérico fornece um biossensor com alta sensibilidade.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

MODELING, ANALYSIS AND OPTIMIZATION OF ENZYME-BASED
ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Sabrina Garcia Secchi

March/2017

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

Helen Conceição Ferraz

Department: Chemical Engineering

In this work, mathematical models were developed to describe the behavior of second and third generation enzyme-based amperometric biosensors. Experimental data were collected using horseradish peroxidase (HRP)-based biosensors to represent third generation biosensors, and glucose oxidase (GOx)-based biosensors to represent second generation biosensors. The proposed models had their parameters estimated and were validated with these experimental data. The obtained high determination coefficients indicate that the models were able to adequately describe the behavior of the biosensors. Simulations were performed using the proposed models and the results showed that both systems are limited by diffusion. Finally, sensitivity analysis via simulated response surfaces and optimizations of biosensors performances were performed. The results showed that, for both types of biosensors studied, a high concentration of enzyme in the smallest possible thickness of polymeric film provides a biosensor with high sensitivity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biossensores.....	4
2.1.1. Breve histórico dos biossensores	6
2.1.2. Classificação dos biossensores	10
2.1.3. Técnicas de imobilização do biorreceptor	15
2.2. Peroxidase de Raiz Forte (HRP).....	18
2.3. Glicose Oxidase (GOx).....	21
2.4. Modelagem matemática de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas..	24
2.5. Comentários Finais	29
3. METODOLOGIA	31
3.1. Parte Experimental.....	32
3.1.1. Soluções de HRP, GOx e mediador	32
3.1.2. Dosagem de proteínas.....	32
3.1.3. Determinação das atividades específicas da HRP e da GOx.....	34
3.1.4. Imobilização das enzimas	35
3.1.5. Preparo dos biossensores	37
3.1.6. Determinação da espessura do filme polimérico.....	38
3.1.7. Técnicas eletroquímicas	38
3.2. Parte Teórica	40
3.2.1. Modelagem matemática dos biossensores.....	40
3.2.2. Simulações numéricas	40
3.2.3. Estimação de parâmetros e validação dos modelos.....	41
3.2.4. Análise de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores	42

4. MODELAGEM MATEMÁTICA.....	44
4.1. Biossensores amperométricos de terceira geração.....	44
4.1.1. Adimensionamento.....	46
4.2. Biossensores amperométricos de segunda geração.....	49
4.2.1. Adimensionamento.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	54
5.1. Determinação da Espessura do Filme Polimérico	54
5.2. Determinação dos Potenciais de Pico	55
5.3. Convergência de Malha	58
5.4. Biossensores Amperométricos de Terceira Geração	60
5.4.1. Estimação de parâmetros	60
5.4.2. Validação do modelo	64
5.4.3. Análises de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores.....	68
5.5. Biossensores amperométricos de segunda geração.....	72
5.5.1. Estimação de parâmetros	72
5.5.2. Validação do modelo	76
5.5.3. Análises de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores.....	80
5.6. Comentários Finais	84
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	86
6.1. Conclusões.....	86
6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO A	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema de funcionamento de um biossensor (Adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	5
Figura 2.2. Mercado de biossensores em 2016 (perspectiva) (Adaptado de BASAVARAJU <i>et al.</i> , 2015).	9
Figura 2.3. Representação esquemática das três gerações de biossensores (Adaptado de PUTZBACH & RONKAINEN, 2013).....	14
Figura 2.4. Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de biomoléculas. B: Biomolécula. (Adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012).....	16
Figura 2.5. Representação da estrutura tridimensional da HRP C. Grupo heme: em vermelho. Íons cálcio: esferas azuis. (VEITCH, 2004).....	19
Figura 2.6. Mecanismo catalítico da HRP na presença de H ₂ O ₂ (NAVES, 2008).....	20
Figura 2.7. Representação da estrutura tridimensional da glicose oxidase (Adaptado de SUMAIYA & TRIVEDI, 2015).	22
Figura 2.8. Mecanismo catalítico da glicose oxidase.	22
Figura 3.1. Eletrodo impresso utilizado para o preparo dos biossensores.....	37
Figura 3.2. Potenciostato PalmSens.	38
Figura 4.1. Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de terceira geração.	46
Figura 4.2. Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de segunda geração.	50
Figura 5.1. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um eletrodo de trabalho modificado com 6 µL de Nafion [®]	54
Figura 5.2. Voltamogramas cíclicos para eletrodo não modificado em tampão (linha pontilhada) e para o biossensor baseado em HRP na ausência de H ₂ O ₂ (linha tracejada) e na presença de 0,2 mM de H ₂ O ₂ (linha contínua).....	56
Figura 5.3. Voltamogramas cíclicos para eletrodo não modificado em tampão (linha pontilhada) e para o biossensor baseado em GOx na ausência de glicose (linha tracejada) e na presença de 5 mM de glicose (linha contínua).....	57
Figura 5.4. Corrente adimensional em função do tempo para diferentes números de pontos de interpolação e de elementos finitos.	58

Figura 5.5. Corrente de resposta em função do tempo para diferentes números de pontos de interpolação utilizados na colocação ortogonal.	59
Figura 5.6. Ajuste do modelo para biossensores de terceira geração aos dados experimentais.....	61
Figura 5.7. Tempo de resposta dos biossensores baseados em HRP.....	62
Figura 5.8. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 4 com biossensor baseado em HRP.....	65
Figura 5.9. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 5 com biossensor baseado em HRP.....	66
Figura 5.10. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 6 com biossensor baseado em HRP.....	66
Figura 5.11. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 7 com biossensor baseado em HRP.....	67
Figura 5.12. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 8 com biossensor baseado em HRP.....	67
Figura 5.13. Perfil de concentração de substrato adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $ET = 0,05 \text{ mM}$, $L = 15 \mu\text{m}$ e $\alpha = 0,0654$	69
Figura 5.14. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de terceira geração em função da espessura do filme e da concentração total de enzima. $\alpha = 0,0654$	70
Figura 5.15. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de terceira geração em função da fração de enzima eletroquimicamente ativa e da concentração total de enzima. $L = 10 \mu\text{m}$	71
Figura 5.16. Ajuste do modelo para biossensores de segunda geração aos dados experimentais.....	73
Figura 5.17. Tempo de resposta dos biossensores baseados em GOx.....	74
Figura 5.18. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 4 com biossensor baseado em GOx.....	77
Figura 5.19. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 5 com biossensor baseado em GOx.....	78
Figura 5.20. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 6 com biossensor baseado em GOx.....	78
Figura 5.21. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 7 com biossensor baseado em GOx.....	79

Figura 5.22. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 8 com biossensor baseado em GOx.....	79
Figura 5.23. Perfil de concentração de substrato adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $ET = 0,05 \text{ mM}$, $MT = 50 \text{ mM}$ e $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$	81
Figura 5.24. Perfil de concentração da forma oxidada do mediador adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $ET = 0,05 \text{ mM}$, $MT = 50 \text{ mM}$ e $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$	81
Figura 5.25. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de segunda geração em função da espessura do filme e da concentração total de enzima. $MT = 100 \text{ mM}$. 82	
Figura 5.26. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de segunda geração em função da concentração total de mediador e da concentração total de enzima. $L = 5 \text{ }\mu\text{m}$	83
Figura A.1.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 1.....	101
Figura A.2.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 2.	101
Figura A.3.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 3.	102
Figura A.4.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 4.	102
Figura A.5.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 5.	103
Figura A.6.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 6.	103
Figura A.7.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 7.	104
Figura A.8.Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 8.	104
Figura A.9.Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 1.	105
Figura A.10. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 2.	105
Figura A.11. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 3.	106

Figura A.12. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 4.....	106
Figura A.13. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 5.....	107
Figura A.14. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 6.....	107
Figura A.15. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 7.....	108
Figura A.16. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 8.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Biossensores disponíveis comercialmente no mercado mundial (Adaptado de BAHADIR & SEZGINTÜRK, 2015).....	8
Tabela 3.1. Condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em HRP	36
Tabela 3.2. Condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em GOx	36
Tabela 4.1. Modelo matemático para biossensores amperométricos de terceira geração	47
Tabela 4.2. Variáveis e parâmetros adimensionais e constantes de tempo do modelo para biossensores de terceira geração	47
Tabela 4.3. Modelo matemático para biossensores amperométricos de terceira geração após adimensionamento.....	48
Tabela 4.4. Modelo matemático para biossensores amperométricos de segunda geração	51
Tabela 4.5. Variáveis e parâmetros adimensionais e parâmetros dimensionais do modelo para biossensores de segunda geração	52
Tabela 4.6. Modelo matemático para biossensores amperométricos de segunda geração após adimensionamento.....	53
Tabela 5.1. Especificações para as soluções numéricas	59
Tabela 5.2. Condições experimentais dos três primeiros experimentos com biossensores baseados em HRP	60
Tabela 5.3. Informações estatísticas do ajuste do modelo para biossensores de terceira geração aos dados experimentais.....	61
Tabela 5.4. Valores dos parâmetros estimados.....	63
Tabela 5.5. Valores dos parâmetros adimensionais calculados.....	63
Tabela 5.6. Valores dos parâmetros dimensionais calculados.....	64
Tabela 5.7. Condições experimentais dos experimentos 4 a 8 com biossensores baseados em HRP	64
Tabela 5.8. Coeficientes de determinação do modelo do biossensor de terceira geração para os conjuntos de dados experimentais usados na validação.....	68

Tabela 5.9. Resultados da otimização do desempenho de biossensores de terceira geração.....	71
Tabela 5.10. Condições experimentais dos três primeiros experimentos com biossensores baseados em GOx.....	72
Tabela 5.11. Informações estatísticas do ajuste do modelo para biossensores de segunda geração aos dados experimentais.....	73
Tabela 5.12. Valores dos parâmetros estimados.....	75
Tabela 5.13. Valores dos parâmetros calculados.....	75
Tabela 5.14. Valores dos parâmetros dimensionais calculados.....	76
Tabela 5.15. Condições experimentais dos experimentos 4 a 8 com biossensores baseados em GOx.....	76
Tabela 5.16. Coeficientes de determinação do modelo do biossensor de segunda geração para os conjuntos de dados experimentais usados na validação.....	80
Tabela 5.17. Resultados da otimização do desempenho de biossensores de segunda geração.....	84

NOMENCLATURA

Símbolo	Unidade	Descrição
A	m^2	Área superficial do eletrodo de trabalho
a		Concentração adimensional da forma oxidada do mediador
B_S	$A\ m^3/mol$	Sensibilidade do biossensor
b		Concentração adimensional da forma reduzida do mediador
D_M	m^2/s	Coeficiente de difusão do mediador
D_S	m^2/s	Coeficiente de difusão do substrato
d	m	Diâmetro da enzima
F	C/mol	Constante de Faraday
f		Função que descreve o modelo da variável medida
$[E]$	mol/m^3	Concentração da enzima livre
$[E]_o$	mol/m^3	Concentração total de enzima
$[E_{ox}]$	mol/m^3	Concentração da forma oxidada da enzima
$[E_{ox}]_A$	mol/m^3	Concentração da forma oxidada da enzima eletroquimicamente ativa
$[E_{ox}]_N$	mol/m^3	Concentração da forma oxidada da enzima eletroquimicamente inativa
$[E_{rd}]$	mol/m^3	Concentração da forma reduzida da enzima
$[E_{rd}]_A$	mol/m^3	Concentração da forma reduzida da enzima eletroquimicamente ativa
$[E_{rd}]_N$	mol/m^3	Concentração da forma reduzida da enzima eletroquimicamente inativa
$[ES]$	mol/m^3	Concentração do complexo enzima-substrato
$[E_T]$	mol/m^3	Concentração total de enzima
I		Corrente de resposta adimensional

i	A	Corrente de resposta
i_{max}	A	Corrente máxima de resposta
i_R		Corrente normalizada em relação à amplitude da resposta ente os estados estacionários $k - 1$ e k
i_{ss}	A	Corrente de resposta estacionária
K_m	mol/m ³	Constante de Michaelis-Menten
K_S		Coefficiente de partição filme-solução do substrato
k_1	m ³ /(mol s)	Constante cinética da reação
k_{-1}	s ⁻¹	Constante cinética da reação reversa
k_2	s ⁻¹	Constante cinética da reação
k_2	m ³ /(mol s)	Constante cinética da reação
L	m	Espessura do filme polimérico
$[M_{ox}]$	mol/m ³	Concentração da forma oxidada do mediador
$[M_{rd}]$	mol/m ³	Concentração da forma reduzida do mediador
$[M_T]$	mol/m ³	Concentração total de mediador
m		Número de parâmetros
N		Número de experimentos
N_{Av}	mol ⁻¹	Constante de Avogadro
n		Número de elétrons envolvidos na reação que ocorre na superfície do eletrodo
n_e		Número de elementos finitos
n_p		Número de pontos de interpolação
p		Vetor de parâmetros estimados
$[P]$	mol/m ³	Concentração de produto
R		Taxa adimensional de formação de produto
R^2		Coefficiente de determinação

r_p	mol/(m ³ s)	Taxa de formação de produto
r_{pmax}	mol/(m ³ s)	Taxa máxima de formação de produto
$[S]$	mol/m ³	Concentração de substrato
$[S]_{\infty}$	mol/m ³	Concentração de substrato em solução
$[S]_{\infty ref}$	mol/m ³	Máxima concentração de substrato em solução na qual a resposta amperométrica do biossensor permanece linear
s		Concentração adimensional de substrato
t	s	Tempo
V_{Nafion}	m ³	Volume de Nafion [®] depositado sob o eletrodo de trabalho
V_T	m ³	Volume total de solução depositado sob o eletrodo de trabalho
v	mol/(m ³ s)	Taxa de formação de produto
v_m	mol/(m ³ s)	Taxa máxima de formação de produto
x	m	Coordenada axial no filme polimérico
y		Vetor da variável medida

LETRAS GREGAS

α		Fração molar de enzima eletroquimicamente ativa
$\hat{\alpha}$		Parâmetro da função peso do polinômio de Jacobi
$\hat{\beta}$		Parâmetro da função peso do polinômio de Jacobi
γ		Parâmetro adimensional
δ		Nível de confiança
ε	m	Espessura do filme polimérico obtido com a deposição de 6 μ L de Nafion [®]
κ_1		Módulo de Thiele
κ_2		Módulo de Thiele

λ	A	Constante de proporcionalidade entre a corrente de resposta e o fluxo adimensional de mediador
μ		Parâmetro adimensional
σ_y^2		Variabilidade dos dados experimentais
$\hat{\sigma}_y^2$		Variabilidade residual
τ_1	s	Constante de tempo
τ_2	s	Constante de tempo
τ_3	s	Constante de tempo
ϕ		Concentração adimensional da forma oxidada da enzima
ϕ_A		Concentração adimensional da forma reduzida da enzima eletroquimicamente ativa
ϕ_N		Concentração adimensional da forma reduzida da enzima eletroquimicamente inativa
ϕ_R		ϕ_A normalizado em relação à amplitude da resposta ente os estados estacionários $k - 1$ e k
χ		Coordenada axial adimensional no filme polimérico

ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BDF	<i>Backward Differentiation Formulae</i>
BSA	Albumina de soro bovino
DIRECT	<i>Dividing Rectangles</i>
EMSO	<i>Environment for Modeling, Simulation and Optimization</i>
GOx	Glicose oxidase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Tampão fosfato-salino

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o monitoramento e a detecção de diversas substâncias são imprescindíveis em várias áreas. Por conseguinte, o desenvolvimento de uma metodologia analítica simples que permita um teste rápido, barato e preciso é o foco de numerosos estudos (KISSINGER, 2005). À vista disso, o interesse por biossensores vêm crescendo significativamente, já que, devido às suas características particulares como sensibilidade, seletividade, resposta rápida e acurácia, esses dispositivos representam uma alternativa interessante aos métodos de detecção tradicionais. Os métodos analíticos convencionais, embora bastante acurados, são demorados, onerosos, requerem pré-tratamento da amostra, e demandam profissionais experientes e qualificados para a operação, manutenção e análise dos resultados (MOREIRA *et al.*, 2010).

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos compostos por um elemento de reconhecimento biológico ou de origem biológica, denominado biorreceptor, em contato íntimo com um transdutor físico-químico. Em um biossensor, o elemento de biorreconhecimento interage seletivamente com o analito de interesse, presente em solução, gerando, conseqüentemente, uma resposta físico-química, a qual é convertida em um sinal elétrico, que é, portanto, proporcional à concentração do analito (VADGAMA, 1990).

Desde a criação do primeiro biossensor em 1962, numerosos biossensores foram desenvolvidos para determinar diversas substâncias, como glicose, colesterol, lactato, dentre outras, em fluidos biológicos (sangue, soro, urina), para análises de toxicidade em monitoramento ambiental, para controle de qualidade em alimentos, para o diagnóstico de doenças na área médica, para o controle de processos fermentativos, etc. Atualmente, os diagnósticos *point-of-care* ocupam a maior parcela no mercado de biossensores, o qual, segundo a pesquisa de mercado elaborada pela MARKETS AND MARKETS (2015), irá testemunhar um proeminente crescimento nos próximos anos. Em 2013, o mercado de biossensores foi avaliado em US\$ 11.39 bilhões e espera-se que alcance US\$ 22.68 bilhões em 2020.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o método de transdução ou de acordo com o elemento de biorreconhecimento utilizado. A especificidade ou seletividade de um biossensor, que é a habilidade para discriminar um entre diferentes componentes, é uma das características mais importantes de um biossensor e é fornecida pelo elemento biológico, que interage com o substrato de modo altamente específico. Uma vasta variedade de elementos de reconhecimento pode ser empregada nos biossensores como: enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, microrganismos, células, tecidos, organelas, receptores e moléculas orgânicas (SASSOLAS *et al.*, 2012). Os elementos biológicos mais regularmente empregados são as enzimas, as quais possuem alta seletividade e efeito catalítico (GALLI, 2009).

Já o transdutor é o elemento responsável por converter o sinal biológico em um sinal elétrico, com alta sensibilidade e com mínima perturbação do sinal. Dependendo do sistema de transdução utilizado, os biossensores podem ser classificados em: eletroquímicos, ópticos, acústicos (ou piezoelétricos), calorimétricos e magnéticos (MEHROTRA, 2016). Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais frequentemente citados na literatura, pois são simples, econômicos, sensíveis e de resposta rápida (LOWE, 2007). Eles se baseiam na detecção de um sinal eletroquímico produzido pelo consumo ou geração de espécies eletroquímicas durante o processo de bio-interação (NICOLINI, 2013). Dependendo do princípio de mediação, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. Os amperométricos, os quais são os mais utilizados, medem a corrente resultante de uma reação redox sob a aplicação de um potencial constante no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência. A corrente resultante é diretamente correlacionada com a concentração do analito.

No desenvolvimento de biossensores, são perseguidas as seguintes características: seletividade, sensibilidade, estabilidade, acurácia e precisão, resposta rápida, facilidade de uso, baixo custo, robustez, usar pequena quantidade de amostra e ser pequeno e portátil (NASCIMENTO & ANGNES, 1998). Por tudo isso, os biossensores eletroquímicos baseados em enzimas, em particular os amperométricos, são os mais empregados e serão, portanto, o foco dessa pesquisa.

A compreensão do processo que ocorre em um biossensor permite o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam seu comportamento,

tornando, assim, possível prever e racionalmente melhorar o desempenho de um biossensor. Os modelos, portanto, são úteis para o projeto de novos biossensores, para a predição de suas respostas e para a otimização de seus desempenhos (BARLETT & PRATT, 1993).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo geral realizar a modelagem, análise e otimização de biossensores amperométricos baseados em enzimas.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Realizar a modelagem matemática de biossensores amperométricos baseados em enzimas;
- Implementar os modelos no simulador de processos EMSO;
- Realizar experimentos com biossensores a fim de coletar dados para a estimação de parâmetros;
- Estimar os parâmetros dos modelos pelo método da máxima verossimilhança;
- Realizar novos experimentos com o propósito de coletar dados para a validação dos modelos;
- Realizar a validação cruzada dos modelos;
- Realizar a análise de sensibilidade dos biossensores via construção da superfície de resposta simulada;
- Otimizar o desempenho dos biossensores.

Essa dissertação foi dividida em seis capítulos. O presente capítulo apresentou uma introdução ao assunto e citou os objetivos dessa dissertação. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o assunto, abordando biossensores, suas classificações, e mostrando o estado da arte sobre a modelagem de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas. A metodologia empregada neste trabalho, tanto na parte experimental quanto na parte teórica, foi descrita no Capítulo 3. Os modelos propostos são expostos no Capítulo 4. Os resultados e discussões foram apresentados no Capítulo 5 e as conclusões e sugestões para trabalhos futuros no Capítulo 6.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biossensores

Sensores químicos são dispositivos que convertem uma informação química, tal como a concentração de um componente específico ou a composição de uma solução, em um sinal elétrico. Basicamente, são compostos por um sistema de reconhecimento químico, ou receptor, e por um transdutor físico-químico. Nos casos em que o receptor se trata de um elemento de natureza biológica, os sensores químicos passam a ser denominados biossensores (THÉVENOT *et al.*, 2001). Biossensores são, portanto, dispositivos analíticos que incorporam um elemento de reconhecimento biológico ou de origem biológica em contato íntimo com um transdutor que converte o sinal biológico em um sinal elétrico (MEHROTRA, 2016).

Como esquematizado na Figura 2.1, em um biossensor, o elemento de reconhecimento, chamado de biorreceptor, interage seletivamente com o analito de interesse, presente em solução. Como consequência dessa interação, é gerada uma resposta biológica, ocorrendo, assim, uma variação de um parâmetro físico, como luz, calor, pressão, dentre outros. O transdutor integrado, por sua vez, converte essa variação em um sinal elétrico quantificável e processável, gerando, assim, o sinal de saída (PERUMAL & HASHIM, 2014).

Os biossensores podem ser considerados como ferramentas alternativas aos métodos analíticos convencionais, como a cromatografia, a espectrometria de massa e a eletroforese, devido às suas características únicas, como especificidade, simplicidade, relativo baixo custo, resposta rápida e possibilidade de miniaturização (SASSOLAS *et al.*, 2012; KISSINGER, 2005).

A especificidade ou seletividade de um biossensor, que é a habilidade para discriminar um entre diferentes componentes, se deve ao elemento biológico, que interage com o substrato de modo altamente específico, evitando interferências de outras substâncias, como acontece em outros métodos analíticos (SILVA, 2010; NICOLINI, 2013).

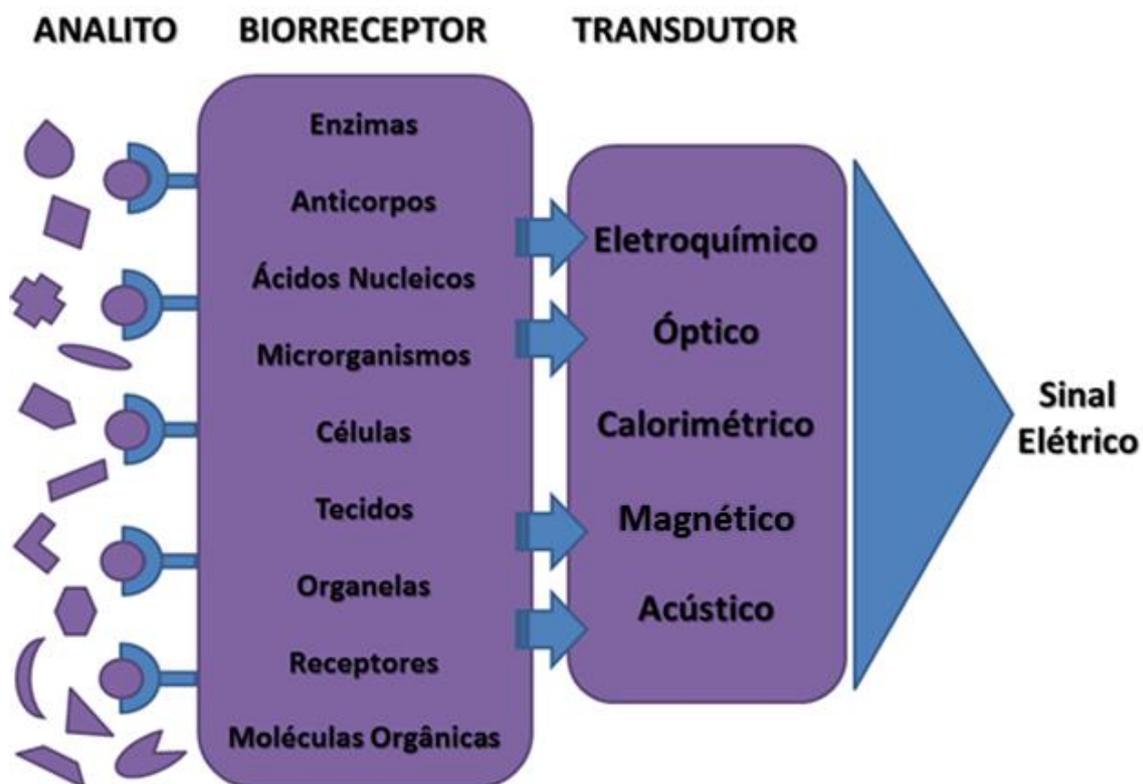


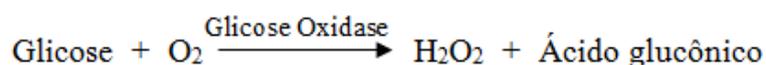
Figura 2.1. Esquema de funcionamento de um biossensor (Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

Outra vantagem dos biossensores sobre os métodos analíticos convencionais é a possibilidade de realizar análises diretas em amostras complexas, sem a necessidade de longos e custosos pré-tratamentos, utilizando apenas uma pequena quantidade de amostra. Além disso, os biossensores são portáteis e de fácil utilização, não demandando pessoal capacitado para seu manuseio.

Entretanto, os biossensores apresentam certos inconvenientes, como a baixa estabilidade do material biológico, determinação de um único analito, pouca disponibilidade comercial e falta de padronização (MOZAZ *et al.*, 2004; NICOLINI, 2013). Por isso, em aplicações ambientais, por exemplo, os biossensores não competem com métodos analíticos convencionais, eles os complementam. Tanto as autoridades regulatórias, quanto a indústria, utilizam os biossensores, em sua maioria, para uma avaliação preliminar das amostras. Caso for necessário, essas amostras são, então, mandadas aos laboratórios para uma análise química mais detalhada. Dessa forma, os custos dos programas de monitoramento são reduzidos consideravelmente (MOZAZ *et al.*, 2004).

2.1.1. Breve histórico dos biossensores

O termo *biossensor* começou a aparecer na literatura científica no final dos anos 1970s (LOWE, 2007). Entretanto, o primeiro biossensor foi desenvolvido por CLARK & LYONS em 1962, o qual foi denominado como "eletrodo enzimático". Com o propósito de criar um dispositivo que quantificasse diretamente a concentração de glicose em uma amostra, Clark e Lyons imobilizaram a enzima glicose oxidase entre uma membrana de diálise semipermeável e a membrana permeável a gás de um eletrodo amperométrico de oxigênio (CLARK & LYONS, 1962). Dessa forma, quando o dispositivo era imerso em uma solução que continha glicose, ocorria a seguinte reação catalítica:



Assim, a redução na concentração de oxigênio dissolvido era detectada pelo eletrodo e se mostrava proporcional à concentração de glicose na amostra.

Mais tarde, UPDIKE & HICKS (1967) usaram um segundo eletrodo de oxigênio para corrigir variações de oxigênio na amostra.

Em 1969, GUIBAULD & MONTALVO desenvolveram o primeiro eletrodo enzimático potenciométrico. Tratava-se de um sensor para a detecção de ureia, principal componente da urina, baseado na enzima urease imobilizada em um eletrodo seletivo ao íon amônio.

Em 1974, foi proposto o uso de transdutores calorimétricos em biossensores, sendo os novos dispositivos denominados como sondas térmicas enzimáticas ou termístores enzimáticos (PATACAS, 2007).

Em 1975, foi criado o primeiro biossensor de glicose para fins comerciais. Tais biossensores eram produzidos pela empresa Yellow Springs Instrument Company (Estados Unidos) e eram baseados na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio (SILVA, 2011).

No mesmo ano, foi desenvolvido o primeiro biossensor baseado na imobilização de um microrganismo, no caso a bactéria *Acetobacter zylinum* e tinha, como finalidade, a detecção de etanol (JOSHI, 2006).

Em 1977, RECHNITZ *et al.* desenvolveram um eletrodo seletivo para arginina através da imobilização de microrganismos na superfície de um eletrodo sensor de NH₃, e usaram a expressão “sensor biosseletivo” para denominá-lo. Essa expressão foi subsequentemente reduzida para “biossensor”, que permanece sendo o termo mais popular para se referir a dispositivos analíticos que combinem um sistema de reconhecimento de origem biológica com um transdutor físico-químico (LOWE, 2007).

Em 1983, LIEDBERG *et al.* descreveram o uso de ressonância plasmônica de superfície (SPR) em imunossensores. Diferentemente de muitos outros imunossaios, um imunossensor SPR não requer uma molécula marcadora para a detecção do analito. Os sistemas Biacore, lançados em 1990 pela empresa Pharmacia (Suécia), são baseados nessa tecnologia. Atualmente, a Biacore pertence à GE Healthcare.

Em 1984, destacou-se o desenvolvimento do primeiro biossensor amperométrico mediado. Ferroceno e seus derivados foram imobilizados juntamente com oxidoredutases, e atuaram como mediadores, transportando os elétrons entre o biorreceptor e o transdutor. Esses componentes foram cruciais na construção de eletrodos enzimáticos econômicos, e formaram a base para os eletrodos enzimáticos impressos lançados, em 1987, pela empresa MediSense (comprada pela Abbott em 1996), os quais eram destinados ao monitoramento domiciliar de glicose no sangue (JOSHI, 2006).

Desde então, numerosos sensores enzimáticos tem sido desenvolvidos para determinar diversas substâncias, como glicose, colesterol, lactato, dentre outras, em fluidos biológicos (sangue, soro, urina), para análises de toxicidade em monitoramento ambiental, para controle de qualidade em alimentos, para o diagnóstico de doenças na área médica, para o controle de processos fermentativos, etc. A Tabela 2.1 apresenta biossensores disponíveis comercialmente no mercado mundial.

Atualmente, os diagnósticos *point-of-care* ocupam a maior parcela no mercado de biossensores, como mostrado na Figura 2.2. Isso tem impulsionado os avanços nessa área, possibilitando o desenvolvimento de novos dispositivos, como, por exemplo, os smartphones biossensores. Devido ao crescente uso de smartphones pelo mundo todo, os smartphones biossensores apresentam grande potencial como plataformas *point-of-care* e *point-of-need* para cuidados com saúde, segurança alimentar, monitoramento ambiental, e biossegurança, especialmente em áreas remotas e rurais. Esses dispositivos

têm sido explorados usando diferentes abordagens, ora utilizando o smartphone como detector ora utilizando como interface instrumental (RODA *et al.*, 2016; ZHANG & LIU, 2016).

Tabela 2.1. Biossensores disponíveis comercialmente no mercado mundial (Adaptado de BAHADIR & SEZGINTÜRK, 2015).

Biossensores Comerciais		
<p>Análises Clínicas</p> <p>Cl⁻, Na⁺ Glicose, Insulina Ureia Cetona Etanol Lactato Ácido Úrico Creatinina Hematócrito Gases sanguíneos Hemoglobina G6PD Colesterol Triglicerídeos <i>E. coli</i> HIV <i>Helicobacter pylori</i> Vírus Influenza <i>Streptococcus</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>Cryptosporidium, Giardia</i> Mosquito <i>Anopheles</i> Adenovírus, Rotavírus <i>Legionella</i> PSA, CEA, AFP Sangue oculto nas fezes CA125, CA19-9, CA15-3 Teste de gravidez Teste de ovulação Troponina Mioglobina Creatina quinase</p>	<p>Biodefesa</p> <p>Antraz Enterotoxina estafilocócica Ricina Vírus Vaccinia <i>F. tularensis</i> <i>Coxiella burnetti</i> <i>Brucella</i> Toxina botulínica <i>Y. pestis</i> Encefalite equina venezuelana <i>V. cholerae</i> <i>Salmonella</i> <i>Listeria</i> <i>E. coli</i></p>	<p>Segurança e Qualidade Alimentar</p> <p><i>Salmonella</i> <i>Campylobacter</i> Toxina botulínica Atrazina Esporos <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>Enterococcus</i> Antibióticos Metais pesados Etanol, Metanol Glicose, Sacarose Lactose, Galactose Ácido ascórbico Oxalato Amido H₂O₂ Colina Vitaminas solúveis em água Lactato Glutamato, Glutamina Glicerol Alérgenos do amendoim</p>
	<p>Controle de Processos Fermentativos</p> <p>Glicose, Glicerol Glutamato Lactose, Galactose Etanol, Metanol Dióxido de carbono Maltose Frutose, Sacarose Lactato Aminoácidos totais Xilose Leucina, Isoleucina Tirosina Antibióticos Ureia</p>	<p>Monitoramento Ambiental</p> <p>Demanda Bioquímica de Oxigênio 5 Nitrato Dioxina <i>E. coli</i></p>

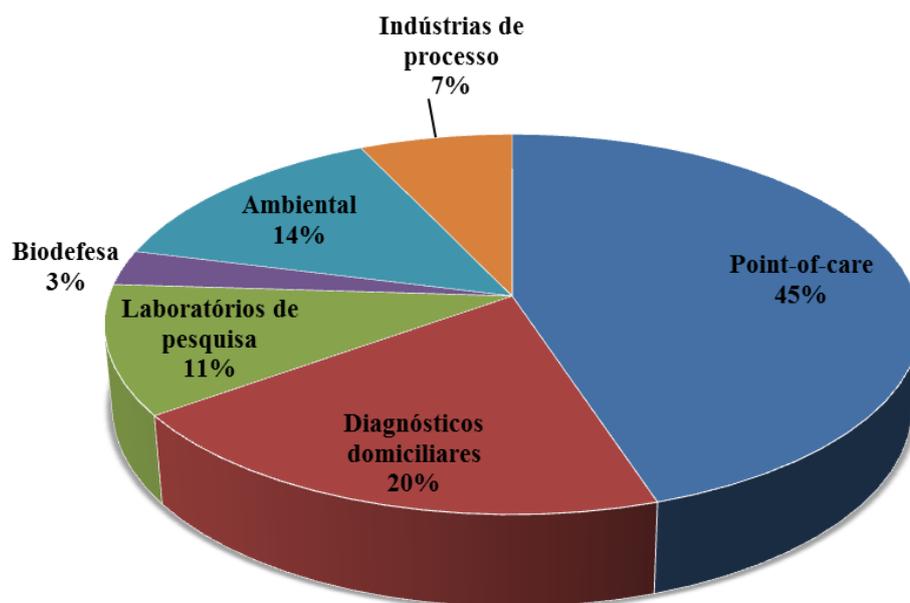


Figura 2.2. Mercado de biossensores em 2016 (perspectiva) (Adaptado de BASAVARAJU *et al.*, 2015).

Segundo a pesquisa de mercado elaborada pela MARKETS AND MARKETS (2015), o mercado de biossensores irá testemunhar um proeminente crescimento nos próximos anos. Em 2013, o mercado de biossensores foi avaliado em US\$ 11.39 bilhões e espera-se que alcance US\$ 22.68 bilhões em 2020. Esse é um mercado diversificado e competitivo que inclui um grande número de empresas atuando no setor. Dentre as principais, podem ser citadas: F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Suíça), LifeScan Inc. (Estados Unidos), Bayer Healthcare AG (Alemanha), Abbott Point-of-Care Inc. (Estados Unidos), Medtronic (Estados Unidos), Siemens Healthcare (Alemanha), GE Healthcare Life Sciences (Estados Unidos), Bio-Rad Laboratories Inc. (Estados Unidos), dentre outras.

Os fatores que serão primordiais para o crescimento do mercado de biossensores são: emergência da nanotecnologia/nano-biossensores, avanços tecnológicos significativos nos últimos anos, monitoramento de glicose para pacientes diabéticos, e aumento da demanda por dispositivos para cuidados domiciliares e *point-of-care*. Alguns fatores, entretanto, atuam como repressores do crescimento do mercado, como lenta taxa de comercialização, altos custos de pesquisa e desenvolvimento, e relutância em relação à adoção de novas técnicas de tratamento (MARKETS AND MARKETS, 2015).

2.1.2. Classificação dos biossensores

Biossensores podem ser classificados de acordo com o método de transdução ou de acordo com o elemento de biorreconhecimento. A determinação do biorreceptor e do método de transdução mais adequados deve ser feita com base nas características de cada sistema específico. A escolha da técnica de imobilização do biorreceptor deve ser ponderada da mesma forma, pois também afeta o desempenho do biossensor.

2.1.2.1. Elementos de transdução

O transdutor é definido como um dispositivo que converte um tipo de energia (eletricidade, som, luz, magnetismo, calor, ou mecânica) em outro (geralmente elétrica) (LOWE, 2007). Em um biossensor, é essencial que o transdutor possua alta sensibilidade, pois, dessa forma, uma pequena variação da concentração do analito alvo é suficiente para que ocorra uma alteração no sinal elétrico de saída.

Dependendo do sistema de transdução utilizado, os biossensores podem ser classificados em: eletroquímicos, ópticos, acústicos (ou piezoelétricos), calorimétricos e magnéticos (MEHROTRA, 2016).

Biossensores baseados em transdutores eletroquímicos são os mais comuns e mais frequentemente citados na literatura, pois são simples, econômicos, sensíveis e de resposta rápida (LOWE, 2007). Eles se baseiam na detecção de um sinal eletroquímico produzido pelo consumo ou geração de espécies eletroquímicas durante o processo de bio-interação (NICOLINI, 2013). Dependendo do princípio de mediação, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos.

Os amperométricos se baseiam na medição da corrente resultante da oxidação ou da redução eletroquímica de uma espécie eletroativa, sob a manutenção de um potencial constante entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. A corrente resultante é diretamente correlacionada à concentração do analito em solução (THÉVENOT *et al.*, 2001).

Os potenciométricos se baseiam na determinação da diferença de potencial entre um eletrodo de referência e um eletrodo de trabalho, quando não há corrente significativa fluindo entre eles. Geralmente, são utilizados eletrodos sensíveis a gases ou eletrodos íons seletivos. Essa diferença de potencial é criada pela geração ou consumo de espécies químicas ou íons (MELO, 2008).

Os condutimétricos, por sua vez, se baseiam na medição da variação da condutividade do eletrólito em uma célula eletroquímica, decorrente da produção ou do consumo de espécies iônicas (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

Dentre os três tipos de biossensores eletroquímicos, os condutimétricos são os menos utilizados, pois são menos seletivos, apresentam uma pobre razão sinal/ruído e são fortemente dependentes da temperatura. O sensor amperométrico é mais rápido, mais sensível e preciso que o potenciométrico, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja alcançado e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito (SILVA, 2010).

Os biossensores ópticos são baseados na medição de luz absorvida ou emitida como consequência de uma reação bioquímica. Os métodos de transdução óptica têm atraído atenção no campo de biossensores por diversas razões, como: eles têm uma longa história de uso em análises químicas e bioquímicas; trabalham bem em soluções aquosas; não são destrutivos; podem ser usados para análises em tempo real e para medições cinéticas; e são sensíveis (LOWE, 2007). Um dos métodos mais populares disponíveis para biossensores ópticos é a ressonância plasmônica de superfície (SPR), que usa ondas plasmônicas de superfície (ondas eletromagnéticas) para detectar mudanças quando o analito alvo interage com o elemento de biorreconhecimento do sensor. Quando o biossensor SPR é exposto a qualquer mudança, são induzidas variações no índice de refração, o qual é usado para medir ou observar a reação. O sucesso da técnica de SPR para aplicações biotecnológicas deve-se ao fato de essa técnica permitir o cálculo das cinéticas de interações biomoleculares em tempo real com um alto grau de sensibilidade (PERUMAL & HASHIM, 2014; VIEIRA, 2006).

Os biossensores acústicos ou piezoelétricos operam com o princípio de que todos os cristais piezoelétricos vibram na presença de um campo elétrico e que cada cristal possui uma frequência de oscilação característica. Dessa forma, em um biossensor piezoelétrico, o transdutor é feito de material piezoelétrico, como quartzo, e

o elemento de biorreconhecimento é imobilizado nele. Assim, a ligação do analito ao biorreceptor aumenta a massa do cristal e altera sua frequência de oscilação característica. A variação da frequência é, portanto, proporcional à massa do analito de interesse. Os biossensores acústicos apresentam um custo relativamente baixo e são capazes de dar uma resposta rápida. Entretanto, seu principal inconveniente é a interferência da umidade atmosférica na medida (VIEIRA, 2006).

Transdutores eletroquímicos, ópticos e acústicos provavelmente representam mais de 90% da literatura publicada sobre biossensores. Entretanto, duas outras abordagens, baseadas nos princípios térmico e magnético, valem ser mencionadas, já que apresentam ampla aplicação comercial (LOWE, 2007).

Os biossensores calorimétricos se baseiam na medição da variação de temperatura decorrente da geração ou absorção de calor pela reação bioquímica entre o biorreceptor e o analito alvo. Essa variação pode ser correlacionada com a quantidade de substrato consumido ou de produto formado (PERUMAL & HASHIM, 2014). Os biossensores calorimétricos apresentam algumas desvantagens, como complexidade e baixa especificidade na análise, já que toda variação de entalpia contribui para o resultado final, ocasionando possíveis erros de análise (MELO, 2008).

Os biossensores magnéticos se baseiam na medição da variação da permeabilidade magnética decorrente da captura de biomoléculas marcadas com nanopartículas magnéticas na presença de um campo magnético. O ideal é que as nanopartículas magnéticas sejam feitas de material superparamagnético, pois, assim, apresentariam alto momento magnético e maior susceptibilidade magnética, possibilitando sua magnetização em um pequeno campo magnético. Geralmente, os biossensores magnéticos são imunossensores, isto é, utilizam anticorpos como elementos de biorreconhecimento. Para esses tipos biossensores, tanto o analito quanto o segundo anticorpo (em imunoenaios do tipo anticorpo-antígeno-anticorpo) podem ser marcados com as nanopartículas magnéticas (LARSSON *et al.*, 1999; ROCHA-SANTOS, 2014).

2.1.2.2. Elementos de biorreconhecimento

O componente biológico proporciona a seletividade do biossensor, que é uma das características mais importantes de um biossensor.

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha do elemento de biorreconhecimento, como disponibilidade de um sítio ativo que possa reagir ou interagir com o analito, estabilidade nas condições do meio e possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho (MELO, 2008).

Muitas biomoléculas podem ser empregadas em biossensores, como enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, microrganismos, células, tecidos, organelas, receptores de membrana e moléculas orgânicas de origem biológica.

Os elementos de biorreconhecimento podem ser divididos em dois grupos, segundo o tipo de interação com o analito alvo: por biocatálise ou por bioafinidade (LOWE, 2007).

Os biocatalisadores, como as enzimas e os microrganismos, interagem com o analito alvo e catalisam a transformação desse composto em outro.

Já os biorreceptores por afinidade se ligam ao analito de interesse, sem ocorrência de reação. A ligação do analito ao bioligante, que está imobilizado, resulta numa alteração conformacional da biomolécula e/ou mudança nas propriedades do meio. Fazendo parte desse grupo, podem ser citados os anticorpos e os ácidos nucleicos (PATACAS, 2007).

2.1.2.3. Classificação dos biossensores amperométricos baseados em enzimas

Dependendo do mecanismo de transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo, os biossensores amperométricos podem ser classificados em primeira, segunda e terceira geração (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002).

A Figura 2.3 mostra uma representação esquemática das três diferentes abordagens no desenvolvimento de biossensores amperométricos.

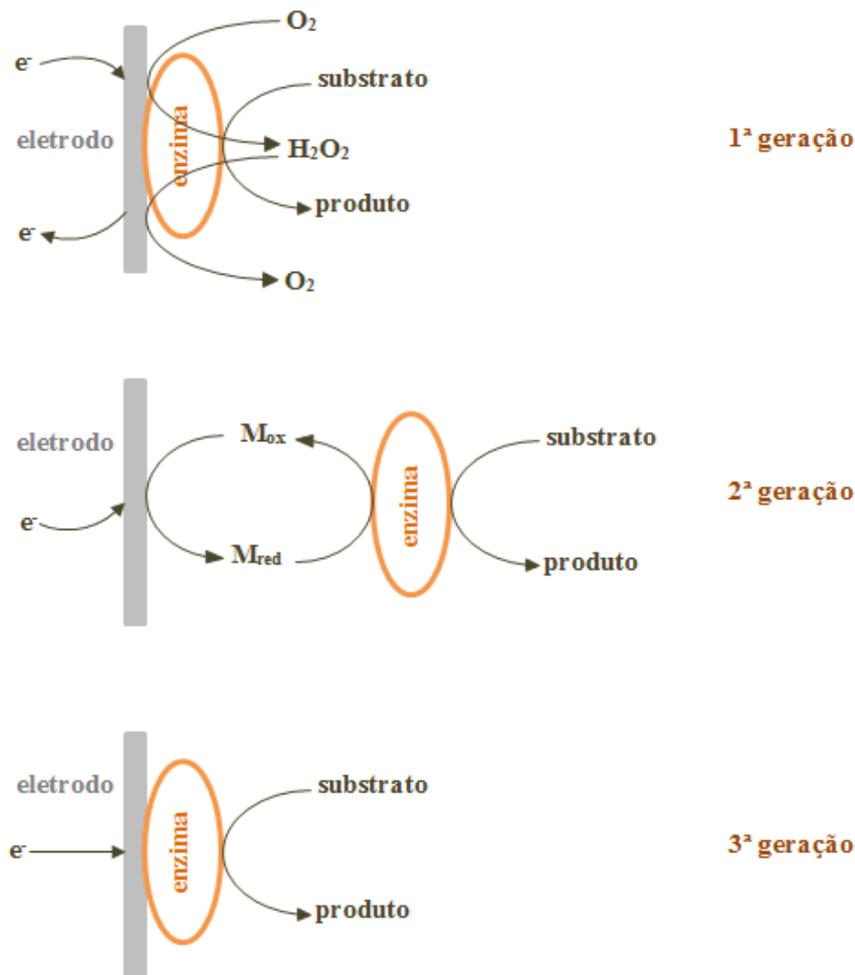


Figura 2.3. Representação esquemática das três gerações de biossensores (Adaptado de PUTZBACH & RONKAINEN, 2013).

Nos biossensores de primeira geração, o acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo é baseado na eletroatividade do substrato da enzima ou do produto formado na reação bioquímica. Em biossensores de glicose de primeira geração, por exemplo, monitora-se o consumo de O_2 ou a produção de H_2O_2 . Nessa abordagem, a necessidade de aplicação de potenciais muito altos faz com que interferentes também sejam oxidados ou reduzidos, comprometendo, assim, a especificidade do elemento de biorreconhecimento (ÁVILA, 2014; FREIRE *et al.*, 2003).

Nos biossensores de segunda geração, são utilizados mediadores livres em solução ou imobilizados juntamente com a biomolécula. Os mediadores são pequenas moléculas redox ativas, como derivados de ferroceno, ferricianetos, metilpirrolidona, azul de metileno e quinonas, que realizam o transporte de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo. Os mediadores atuam como compostos intermediários,

minimizando o caminho de detecção, pois, em alguns casos, o centro redox da enzima está localizado em seu interior, tornando a relação direta de troca de elétrons com o eletrodo inviável. Essa abordagem acarreta numa considerável diminuição de interferentes eletroquímicos, já que o potencial aplicado é significativamente reduzido (CHAUBEY & MALHOTRA, 2002; FREIRE *et al.*, 2003; NICOLINI, 2013).

Nos biossensores de terceira geração, a transferência eletrônica entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo é realizada de forma direta, evitando etapas intermediárias. O maior obstáculo a ser superado na construção de biossensores de terceira geração é a otimização da transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Uma configuração de eletrodo otimizada deve garantir que a distância de transferência de elétrons entre a biomolécula redox imobilizada e a superfície do eletrodo seja a menor possível. Além disso, a enzima imobilizada deve ter uma orientação apropriada, a fim de facilitar a comunicação entre seu centro ativo e a superfície do eletrodo. Por isso, o desempenho de um biossensor de terceira geração depende fortemente do procedimento de imobilização utilizado (FREIRE *et al.*, 2003).

2.1.3. Técnicas de imobilização do biorreceptor

Na construção de um biossensor, a imobilização do componente biológico é uma etapa crítica. A escolha adequada da técnica de imobilização é um fator chave para o desenvolvimento de biossensores eficientes, que apresentem um bom desempenho, estabilidade, altas sensibilidade e seletividade, resposta rápida e reprodutibilidade (NICOLINI, 2013; SILVA, 2010).

Após a imobilização, a biomolécula deve manter sua estrutura, sua função, conservar sua atividade biológica, e não desorver da superfície durante o uso do biossensor. Além disso, um biossensor ideal deve manter sua estabilidade para uso em longo prazo (SASSOLAS *et al.*, 2012).

Várias estratégias de imobilização têm sido usadas na construção de biossensores, dentre elas destacam-se: adsorção, ligação covalente, oclusão, ligações cruzadas e afinidade, esquematizadas na Figura 2.4 (SASSOLAS *et al.*, 2012).

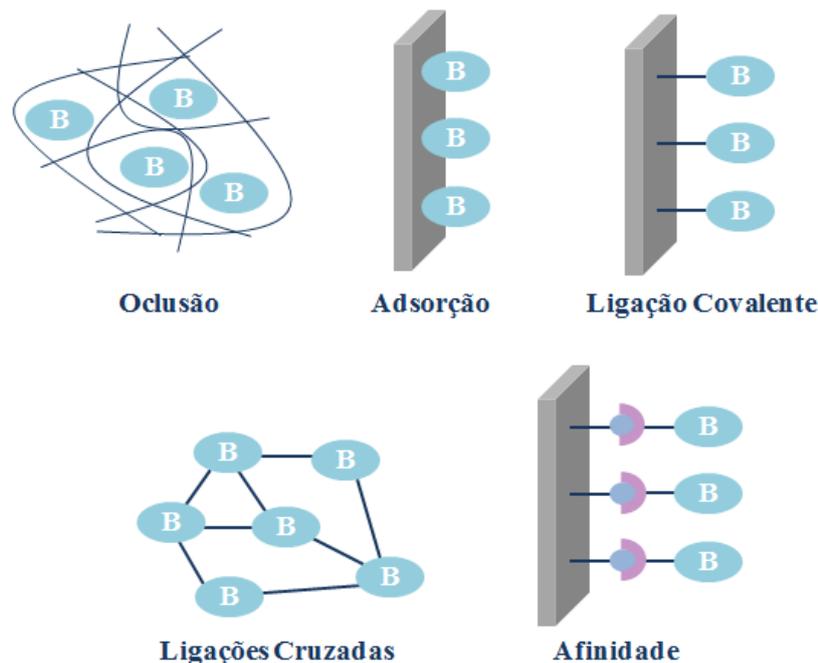


Figura 2.4. Representação esquemática dos principais métodos de imobilização de biomoléculas. B: Biomolécula. (Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).

A adsorção é uma das técnicas mais utilizadas devido a sua simplicidade. Trata-se de um método físico, baseado em ligações fracas, tais como forças de van der Waals e interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Nessa técnica, a biomolécula em solução é posta em contato com o suporte sólido por um determinado período de tempo. A enzima não adsorvida é, então, removida por lavagem com tampão. Esse método não envolve nenhuma funcionalização do suporte e, geralmente, não afeta a atividade biológica da biomolécula (SASSOLAS *et al.*, 2012; VIEIRA, 2006).

Apesar da simplicidade, a adsorção de biomoléculas para o projeto de biossensores pode levar a uma baixa estabilidade operacional, uma vez que, como elas estão fracamente ligadas ao suporte, com o decorrer do tempo, ocorre uma dessorção progressiva dessas biomoléculas devido a variações de temperatura, pH e força iônica (MELO, 2008; VIEIRA, 2006).

A imobilização de biomoléculas por ligação covalente é um método químico, que consiste na formação de ligações covalentes entre grupos funcionais não ativos da biomolécula, ou seja, não essenciais para sua atividade biológica, e grupos funcionais presentes na superfície do suporte sólido. Inicialmente, a superfície do suporte sólido é

ativada usando reagentes multifuncionais, como o glutaraldeído. Depois de ativado, o suporte pode, então, reagir com grupos particulares da biomolécula, formando ligações covalentes (NICOLINI, 2013; SILVA, 2010).

Esse método fornece um aumento da estabilidade do elemento biológico, e evita perdas da biomolécula, já que essa está fortemente ligada ao suporte. Entretanto, trata-se de uma técnica complexa e de alto custo. Além disso, pode ocorrer perda da atividade biológica devido à imobilização (PATACAS, 2007).

A técnica de oclusão consiste no confinamento do material biológico em matrizes tridimensionais, como matrizes poliméricas ou membranas semipermeáveis. Trata-se de um método físico de fácil execução, em que altas concentrações de biomoléculas ativas são imobilizadas. Como não ocorre modificação da biomolécula, a atividade biológica é preservada durante o procedimento de imobilização. Entretanto, esse processo apresenta algumas limitações, como lixiviação do biocomponente pelos poros dos polímeros ou membranas, barreiras difusionais, e impedimentos estéricos para o substrato interagir com a biomolécula, quando os poros das matrizes são menores que as moléculas (GALLI, 2009; SASSOLAS *et al.*, 2012).

O método de imobilização por ligações cruzadas baseia-se na formação de ligações covalentes entre as biomoléculas, formando uma ampla rede tridimensional. Nesse processo, as biomoléculas são adsorvidas no suporte e, em seguida, são reticuladas pela utilização de agentes bi ou multifuncionais. Essa técnica é atrativa em razão da sua relativa simplicidade e das fortes ligações químicas formadas entre as biomoléculas. A principal desvantagem é a possível perda de atividade biológica devido à distorção na conformação da biomolécula e devido a alterações químicas no sítio ativo causadas pelas ligações cruzadas (MELO, 2008; SASSOLAS *et al.*, 2012; SILVA, 2010; VIEIRA, 2006).

A técnica de afinidade, por sua vez, consiste na imobilização sítio-específica da biomolécula. Esse método se baseia na criação de ligações por afinidade entre um suporte ativado (com lectina, avidina, metais quelantes, etc.) e um grupo específico (marcador) presente na sequência da biomolécula (como resíduo de carboidrato, histidina e biotina). Esse método permite o controle da orientação da biomolécula, o que reduz a possibilidade de desativação e/ou bloqueio de seu sítio ativo. A biomolécula pode conter marcadores de afinidade em sua sequência, porém, em alguns casos, o

marcador de afinidade deve ser acoplado à sequência da biomolécula por métodos de engenharia genética. A principal desvantagem dessa técnica de imobilização é sua complexidade (MACHADO, 2015; SASSOLAS *et al.*, 2012).

2.2. Peroxidase de Raiz Forte (HRP)

As oxirredutases são enzimas que têm sido bastante aplicadas na construção de biossensores eletroquímicos, já que catalisam reações químicas redox, envolvendo transferência de elétrons. Pertencendo à classe das oxirredutases, as peroxidases são enzimas que catalisam a redução de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena e a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos (HANSEN, 2011).

A peroxidase de raiz forte (do inglês *horseradish peroxidase* - HRP) é a peroxidase mais usada em química analítica por ser estável por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em uma ampla faixa de pH, e por estar disponível comercialmente em diferentes graus de pureza (SILVA, 2010).

A HRP é uma glicoproteína globular extraída das raízes da *Armoracia rusticana*, que contém vários tipos de isoenzimas, sendo a isoenzima C (HRP C) a mais abundante dentre elas (VEITCH, 2004). Essa isoenzima é constituída de 308 resíduos de aminoácidos, um grupo prostético Fe(III) protoporfirina IX (grupo heme), dois íons cálcio e oito cadeias laterais neutras de carboidratos que se ligam à cadeia polipeptídica através dos resíduos de asparagina. A massa molecular da HRP C se encontra entre 40 e 45 kDa, sendo que a 18 a 22% dessa massa corresponde à porção de carboidratos (WELINDER, 1976).

Sua estrutura tridimensional, representada na Figura 2.5, é composta de dois domínios similares, o distal e o proximal, entre os quais o grupo heme se localiza. Cada domínio contém um íon cálcio, cuja função está relacionada à atividade enzimática e à estabilidade térmica da enzima (VEITCH, 2004).

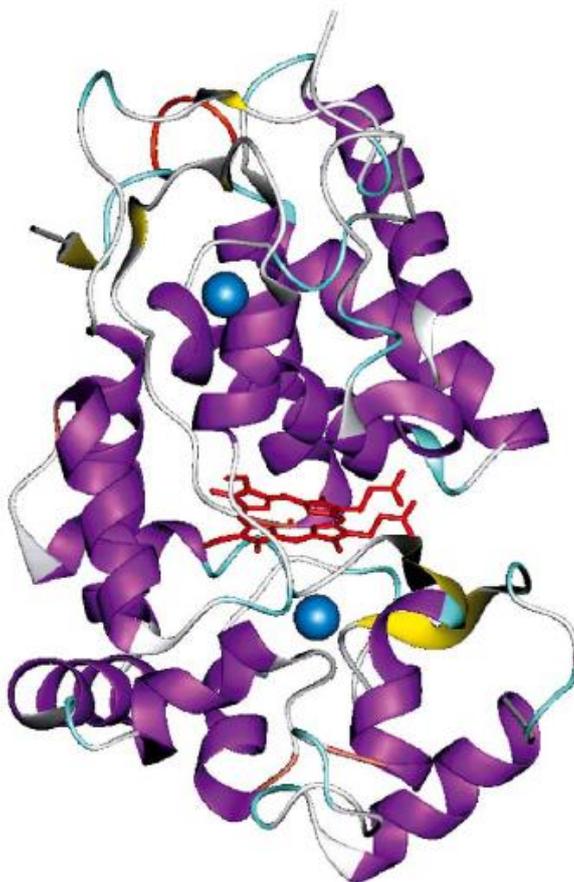
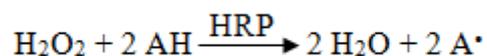


Figura 2.5. Representação da estrutura tridimensional da HRP C. Grupo heme: em vermelho. Íons cálcio: esferas azuis. (VEITCH, 2004).

A maioria das reações catalisadas pela HRP pode ser expressa pela equação abaixo, em que AH e A[•] representam, respectivamente, o substrato redutor e o radical formado. Substratos redutores típicos incluem fenóis aromáticos, ácidos fenólicos, indóis, aminas e sulfonatos (VEITCH, 2004).



O mecanismo catalítico da HRP pode ser dividido em três etapas, conforme apresentado na Figura 2.6. Na primeira etapa, o grupo prostético heme da HRP sofre oxidação pelo H₂O₂, que, por sua vez, é reduzido. Essa etapa resulta na formação de uma molécula de água e do composto I, um composto intermediário. Na segunda etapa, ocorre a redução do composto I pela doação de um elétron proveniente do substrato redutor (AH), o que leva à formação do composto intermediário II e de um radical livre (A[•]). Na última etapa, outra molécula de AH doa um elétron ao composto II, restituindo

a enzima ao seu estado fundamental e gerando outro radical livre (A^\bullet) e outra molécula de água (H_2O) (HOCEVAR, 2011).

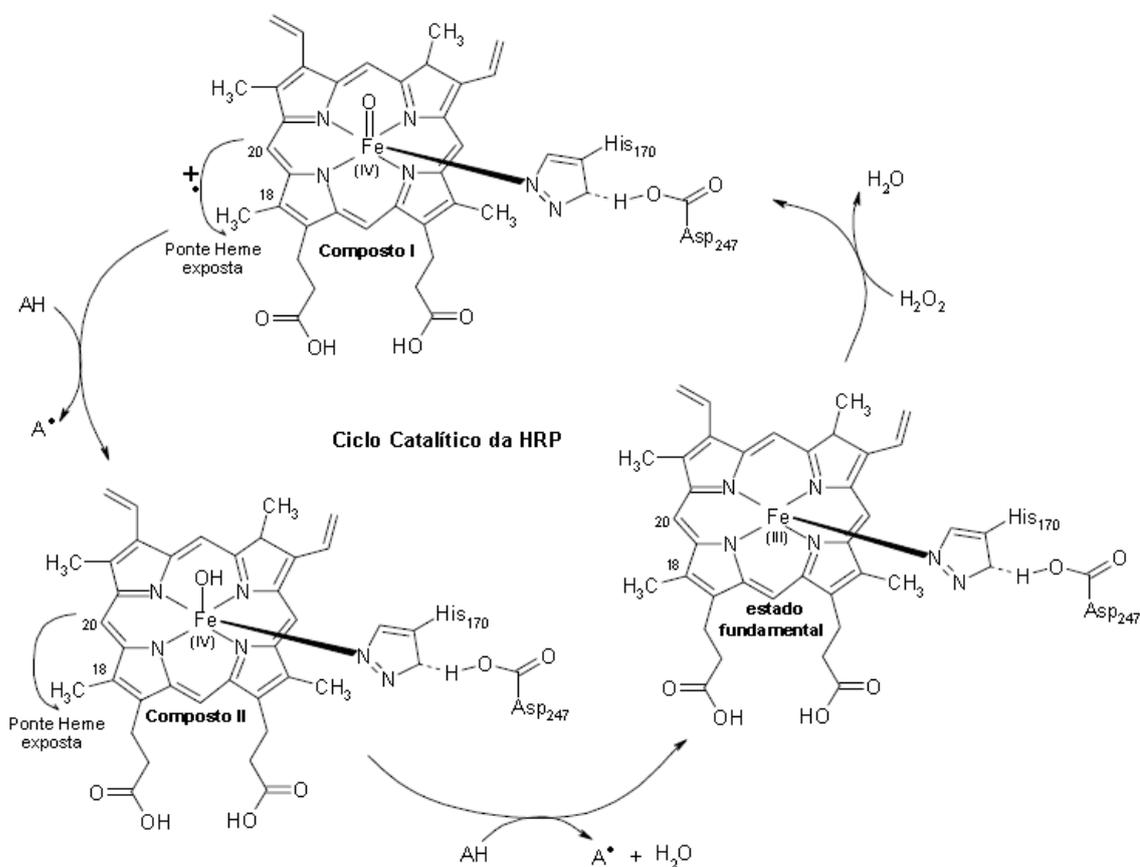


Figura 2.6. Mecanismo catalítico da HRP na presença de H_2O_2 (NAVES, 2008).

Nos casos em que a enzima peroxidase está imobilizada na superfície de um eletrodo, como em biossensores eletroquímicos, os intermediários oxidados da enzima, composto I e composto II, podem ser reduzidos de volta ao seu estado fundamental por duas formas: transferência eletrônica direta ou mediada. Na transferência direta de elétrons, as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo, enquanto que, na transferência mediada, a enzima recebe elétrons do mediador (ROSATTO *et al.*, 2001).

A enzima peroxidase tem sido utilizada em biossensores para a detecção de peróxido de hidrogênio, hidroperóxidos orgânicos, compostos fenólicos e catecólicos (como a dopamina). A HRP também pode ser co-imobilizada com a glicose oxidase para a detecção de glicose e de drogas oxidáveis (MACHADO, 2015; ROSATTO *et al.*, 2001; SASSOLAS *et al.*, 2012). Ademais, estudos têm mostrado o emprego de

biossensores baseados em peroxidase na detecção de levetiracetam, que é uma droga antiepilética (ALONSO-LOMILLO *et al.*, 2009). Além disso, encontram-se estudos da co-imobilização da HRP com uricase para determinação de ácido úrico (WANG & HASEBE, 2012) e da co-imobilização da HRP com xantina oxidase e superóxido dismutase para detecção de xantina (SALINAS-CASTILLO *et al.*, 2008).

2.3. Glicose Oxidase (GOx)

Assim como as peroxidases, a glicose oxidase (GOx) também pertence à classe das oxirredutases. Essa enzima catalisa a oxidação de β -D-glicose em glucono- δ -lactona, utilizando oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, com a simultânea produção de peróxido de hidrogênio (BANKAR *et al.*, 2009).

A glicose oxidase pode ser isolada de diversas fontes, como algas vermelhas, frutas cítricas, insetos, bactérias e fungos. A mais comumente utilizada é a glicose oxidase proveniente do fungo *Aspergillus niger* (WILSON & TURNER, 1992).

Como representado na Figura 2.7, a enzima GOx é uma glicoproteína dimérica ligeiramente alongada constituída de duas subunidades idênticas de cadeias polipeptídicas, covalentemente ligadas entre si via ligações de dissulfeto (SUMAIYA & TRIVEDI, 2015). Cada subunidade possui 583 resíduos de aminoácidos e carrega uma molécula de cofator ligada. O cofator da GOx é o dinucleótido de flavina e adenina (FAD), que atua como acceptor inicial de elétrons na reação catalítica (LESKOVAC *et al.*, 2005). A massa molecular da GOx varia entre 130 e 175 kDa, sendo que 10-16% dessa massa corresponde à porção de carboidratos (BANKAR *et al.*, 2009).

O mecanismo catalítico da glicose oxidase, apresentado na Figura 2.8, pode ser dividido em duas etapas. Na primeira etapa, a GOx catalisa a oxidação da β -D-glicose em glucono- δ -lactona, e o cofator FAD é reduzido a FADH₂. Subsequentemente, a glucono- δ -lactona se hidrolisa espontaneamente a ácido glucônico. Na segunda etapa da catálise, ocorre a rápida oxidação da forma reduzida da enzima pelo oxigênio molecular, o que produz peróxido de hidrogênio e faz a enzima retornar ao seu estado fundamental (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2011).

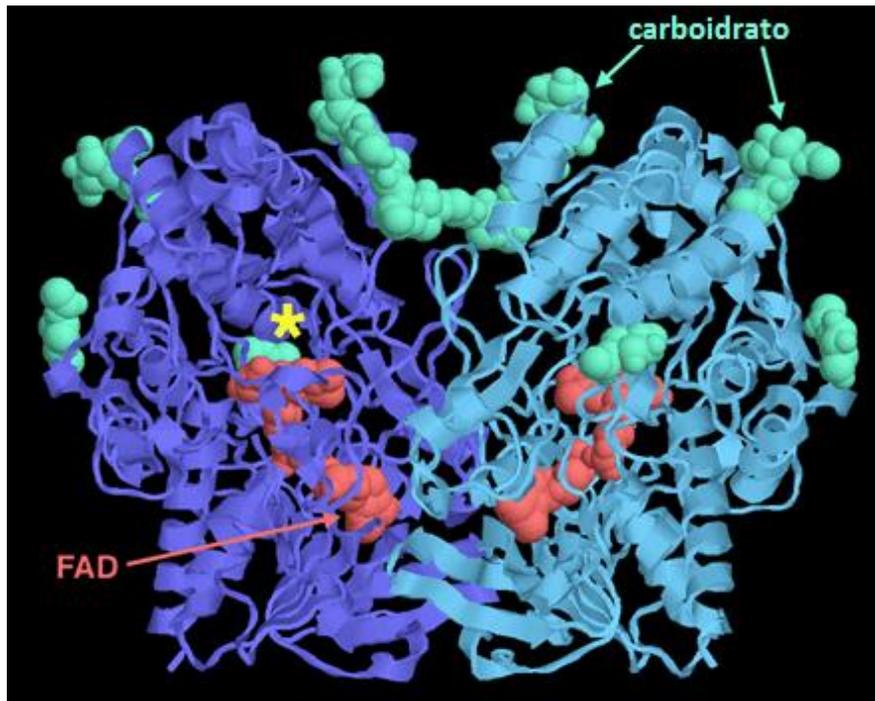


Figura 2.7. Representação da estrutura tridimensional da glicose oxidase (Adaptado de SUMAIYA & TRIVEDI, 2015).

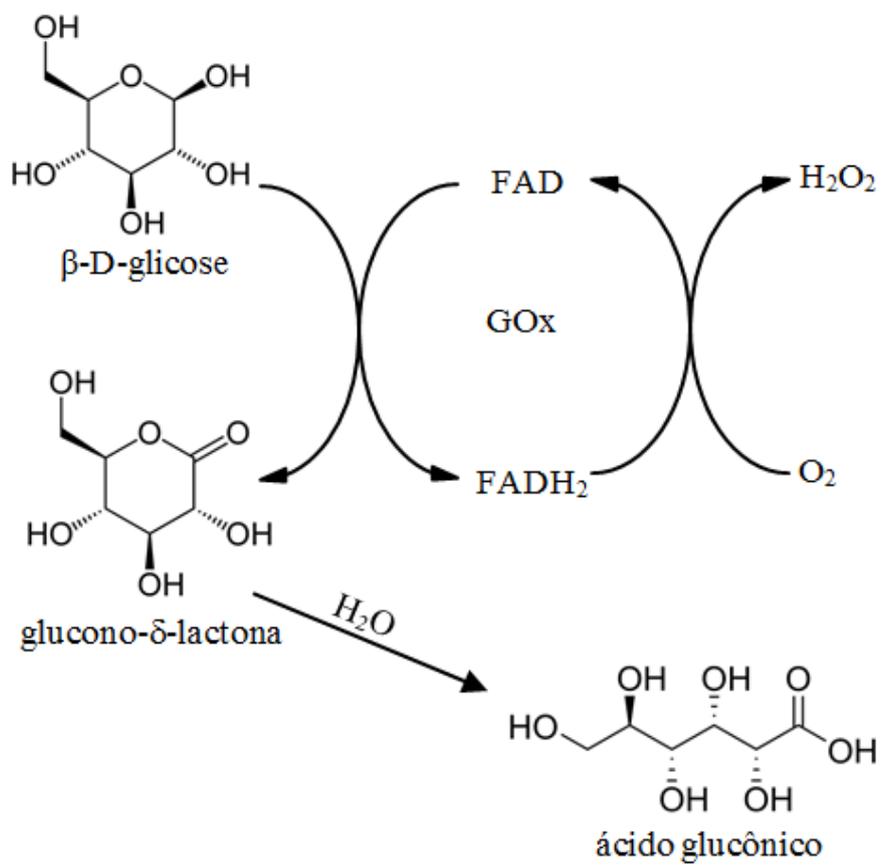


Figura 2.8. Mecanismo catalítico da glicose oxidase.

Os substratos da glicose oxidase podem ser divididos em dois grandes grupos: os doadores de elétrons e os aceptores de elétrons. Como a GOx é altamente seletiva à β -D-glicose, esse é o principal substrato doador de elétrons, apesar de outros açúcares e derivados de D-glicose também poderem atuar como substratos da glicose oxidase, mas com reduzida especificidade. O segundo grupo de substratos compreende os aceptores de elétrons, dentre os quais, podem ser citados: oxigênio molecular, benzoquinonas, naftoquinonas, ferroceno e seus derivados, ferricianeto de potássio, azul de metileno, N-metil fenazina, etc. (LESKOVAC *et al.*, 2005).

Em biossensores eletroquímicos, a transferência eletrônica entre o sítio ativo da GOx e o eletrodo é mediada pelo substrato aceptor de elétrons (biossensores de segunda geração). Evita-se o uso de oxigênio molecular como mediador em biossensores para que as medições não sejam dependentes da concentração de oxigênio. Sob circunstâncias normais, a transferência eletrônica direta entre o sítio ativo da GOx e o eletrodo ocorre lentamente ou nem ocorre. Isso acontece porque o espaço entre o sítio ativo e o eletrodo é muito grande para os elétrons atravessarem (WILSON & TURNER, 1992).

Biossensores baseados em glicose oxidase para a determinação do nível de glicose no sangue são os biossensores com maior disponibilidade comercial. Esses biossensores apresentam um enorme mercado, pois a medição rotineira do teor de glicose no sangue possui um papel vital no tratamento da diabetes, que é um distúrbio metabólico que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não consegue usar a insulina efetivamente, e estima-se que 422 milhões de pessoas no mundo tenham essa doença (BAHADIR & SEZGINTÜRK, 2015).

Os biossensores baseados em GOx para detecção de glicose também são amplamente empregados na indústria alimentícia, no controle de qualidade de alimentos e bebidas. Uma aplicação alternativa da GOx na construção de biossensores é sua co-imobilização com hexoquinase para detecção de ATP (LIU & SUN, 2007).

2.4. Modelagem matemática de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas

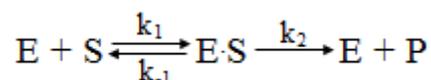
Diversos estudos têm sido realizados visando à modelagem matemática de biossensores, especialmente dos eletroquímicos baseados em enzimas, os quais são os mais empregados até então. Apenas através da compreensão do processo que ocorre em um biossensor, da sua modelagem e da determinação das taxas das diferentes etapas, torna-se possível prever e racionalmente melhorar o desempenho de um biossensor. Modelos são, portanto, úteis para o projeto de biossensores, para a predição de suas respostas, para a otimização do desempenho de biossensores e para a determinação das causas de flutuações e de diminuições na resposta com o tempo (BARLETT & PRATT, 1993).

Em um biossensor eletroquímico baseado em enzima, ocorrem basicamente dois fenômenos: a difusão através do filme polimérico e a reação catalítica. A difusão pode ser descrita pela segunda lei de Fick, que considera que o fluxo de uma determinada espécie tem sentido oposto ao seu gradiente de concentração, e é expressa da seguinte forma:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c \quad 2.1$$

Em que D é o coeficiente de difusão da espécie de concentração c .

Já a reação catalítica, em geral, pode ser descrita baseando-se na cinética de Michaelis-Menten. A cinética de Michaelis-Menten admite que, inicialmente, a enzima e o substrato interagem reversivelmente, formando um complexo enzima-substrato, que, por sua vez, ou se decompõe ou reage com outra substância, liberando, assim, a enzima livre, conforme a reação abaixo:



Onde E é a enzima, S é o substrato, $E \cdot S$ é o complexo enzima-substrato, P é o produto e k é a constante de velocidade da reação. Admitindo-se que as etapas envolvidas são elementares, os balanços de massa das espécies podem ser expressos pelas seguintes equações diferenciais (BISSWANGER, 2002):

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad 2.2$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad 2.3$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad 2.4$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = v \quad 2.5$$

A velocidade de reação v é definida como a taxa de aumento da concentração do produto e é diretamente proporcional à concentração do complexo ES. Entretanto, [ES] depende das concentrações dos reagentes. Assim, para resolver tais equações diferenciais, as variações das concentrações das espécies com o tempo devem ser conhecidas, o que é inviável, especialmente para [E] e [ES]. Por isso, considera-se a aproximação do estado *quasi-estacionário*, que admite que a concentração de um ou mais intermediários reacionais não varia rapidamente com o tempo. Isto significa que as taxas de produção e consumo das espécies intermediárias são aproximadamente iguais. Dessa forma, considera-se que [ES] permanece constante ao longo do tempo:

$$\frac{d[ES]}{dt} \approx 0 \quad 2.6$$

Essa é uma boa aproximação quando a concentração inicial de enzima é muito menor que a concentração inicial de substrato, o que geralmente acontece, ou quando a concentração do complexo ES é muito baixa, ou quando há um suprimento contínuo de reagentes e uma remoção contínua de produtos. Com isso, tem-se que:

$$k_1[E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad 2.7$$

Segundo o princípio de conservação de massa: $[E]_o = [E] + [ES]$, onde $[E]_o$ é a concentração total de enzima. Assim, tem-se que:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_o[S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad 2.8$$

Substituindo a equação acima no balanço de massa do produto, obtém-se:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[E]_o[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \quad 2.9$$

O termo $(k_{-1} + k_2) / k_1$ é denominado constante de Michaelis, K_m , e $v_m = k_2[E]_o$ é a taxa máxima de formação de produto, que corresponde a toda enzima na forma de complexo, $[E]_o = [ES]$. Com isso, tem-se a equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{v_m[S]}{K_m + [S]} \quad 2.10$$

Por essa equação, pode-se notar que a velocidade da reação aumenta com a concentração de substrato. Isso ocorre até o momento em que todos os sítios ativos das enzimas ficam ocupados, isto é, quando se atinge a saturação das enzimas. Depois disso, mesmo que seja adicionado mais substrato, a velocidade de reação não aumentará, tendo, portanto, alcançado a velocidade máxima possível, v_m .

Dessa forma, em um biossensor eletroquímico baseado em uma enzima que obedece à cinética de Michaelis-Menten, o balanço de massa para o substrato, por exemplo, pode ser escrito da seguinte maneira:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_s \nabla^2[S] - \frac{v_m[S]}{K_m + [S]} \quad 2.11$$

Em que $[S]$ é uma função do tempo e do espaço. Muitos estudos tomaram isso como base para modelar matematicamente biossensores eletroquímicos baseados em enzimas.

Em 1971, RACINE & MINDT utilizaram um modelo simplificado, considerando apenas a região linear da cinética de Michaelis-Menten e estado estacionário, com o propósito de investigar a influência da difusão do substrato em um eletrodo enzimático similar ao de Clark e Lyons, em que uma membrana semipermeável separa a solução contendo o analito alvo da camada de enzima. A teoria foi comparada com dados experimentais obtidos com um eletrodo enzimático para lactato. Os autores concluíram que, se a difusão através da membrana é estabelecida como etapa limitante de todo processo, a linearidade do eletrodo enzimático é melhorada. Além disso, o trabalho deles mostrou que a partição das espécies entre as fases (membrana e solução)

é uma importante consideração, fato que foi negligenciado em diversos trabalhos posteriores.

Em 1975, MELL & MALOY modelaram e simularam a resposta de biossensores amperométricos de primeira geração baseados em glicose oxidase, similares ao biossensor de Updike e Hicks. O modelo desenvolvido previu satisfatoriamente a corrente de resposta estacionária do biossensor. Dois tipos de curvas de calibração (corrente de resposta estacionária em função da concentração do analito alvo em solução) foram preditas, tanto para o caso em que o processo era controlado pela cinética enzimática, quanto para o caso em que a etapa limitante era a difusão.

BRADY & CARR (1980) realizaram uma avaliação teórica da resposta estacionária de eletrodos enzimáticos potenciométricos. As equações diferenciais ordinárias do modelo desenvolvido foram discretizadas pelo método de colocação ortogonal. Pelas simulações, pôde-se observar que a resposta linear do biossensor é estendida com o aumento da atividade enzimática.

Em 1987, TSE & GOUGH realizaram a modelagem de um biossensor de primeira geração baseado na co-imobilização da glicose oxidase com a catalase para detecção de glicose. Os autores analisaram a resposta transiente do biossensor a variações nas concentrações de glicose e de oxigênio, através de simulações e de experimentos. Eles perceberam que, quando as concentrações de ambos os substratos são mudadas simultaneamente, a corrente transiente passa por uma inflexão antes de atingir o estado estacionário. Além disso, foi concluído que o tempo de resposta transiente pode ser reduzido com a diminuição da espessura da membrana e com o aumento da atividade enzimática.

TATSUMA & WATANABE (1992) modelaram um biossensor de segunda geração baseado em uma monocamada de glicose oxidase. Como mediador, foi utilizado oxigênio molecular. Os autores avaliaram a resposta estacionária do biossensor através de simulações e compararam com dados experimentais. Eles notaram que a resposta do biossensor é afetada pela distância entre a superfície do eletrodo e o plano onde se encontram os centros ativos das enzimas.

Em 1996, SHEPPARD *et al.* modelaram e validaram experimentalmente um biossensor condutimétrico para detecção de ureia. A hidrólise enzimática da ureia

produz íons, como os íons amônio e bicarbonato, o que faz com que a condutividade elétrica da solução próxima ao eletrodo aumente. Assim, o modelo desenvolvido combina a transferência de massa e hidrólise enzimática da ureia com um modelo de campos elétricos que descreve a condutância entre os eletrodos.

Em 2004, BARONAS *et al.* modelaram biossensores amperométricos com amplificação química por conversão cíclica do substrato. Nesses biossensores, o substrato é convertido eletroquimicamente ao produto. Esse último, por sua vez, sofre uma reação catalítica com a enzima imobilizada e é convertido de volta ao substrato. As simulações mostraram que a conversão cíclica aumenta a sensibilidade do biossensor em algumas dezenas de vezes, especialmente em baixas concentrações de substrato.

Em 2010, LOGHAMBAL & RAJENDRAN realizaram a modelagem de biossensores amperométricos de segunda geração, considerando estado estacionário. Os autores usaram o método da perturbação homotópica para obter soluções analíticas aproximadas para as equações diferenciais não-lineares do modelo.

BARONAS *et al.* (2012) desenvolveram um modelo para biossensores amperométricos de terceira geração baseados em enzimas imobilizadas em nanotubos de carbono. O modelo foi validado com dados experimentais nos regimes estacionário e transiente. As simulações numéricas foram executadas utilizando a técnica de diferenças finitas para a discretização das equações diferenciais. As simulações mostraram que a sensibilidade do biossensor aumenta significativamente com o aumento da concentração de enzima. Além disso, observou-se que a porção linear da curva de calibração é maior quando o processo é limitado pela difusão do que quando é controlado pela reação enzimática.

Em 2014, ASERIS *et al.* modelaram biossensores amperométricos baseados em glicose desidrogenase utilizando conversão sinérgica de substratos. Nesse sistema, a reação da glicose desidrogenase com a glicose é seguida pela oxidação da forma reduzida da enzima tanto pelo ferricianeto quanto pelo outro mediador orgânico presente. Paralelamente, ocorre uma reação cruzada entre o ferricianeto e o mediador reduzido. Por fim, a oxidação do ferrocianeto e do mediador reduzido na superfície do eletrodo gera a corrente a ser medida. Através de simulações, foi possível concluir que a presença do outro mediador (conversão sinérgica de substratos) aumentou a corrente de

resposta estacionária em cerca de 16 vezes e a sensibilidade do biossensor à glicose em cerca de 22 vezes.

Baseando-se no modelo proposto por ROMERO *et al.* (2012) para biossensores amperométricos do tipo sanduíche, COLOMBO *et al.* (2015) otimizaram a matriz enzimática de um biossensor do tipo sanduíche para detecção de glicose. O modelo utilizado considera que a enzima catalisa a oxidação do substrato e a redução do mediador de acordo com o mecanismo ping-pong. Segundo esse mecanismo, primeiramente, a enzima reage com um substrato, passando a um estado intermediário e liberando um produto. Em seguida, a forma intermediária da enzima reage com o outro substrato, retornando ao seu estado original e liberando outro produto. Assim, utilizando esse modelo, COLOMBO *et al.* realizaram simulações e compararam os resultados com dados experimentais para determinar a quantidade ótima de enzima e a composição ótima da matriz. Para o preparo da matriz enzimática, a glicose oxidase era misturada com mucina e albumina, e, a essa mistura, era adicionado glutaraldeído para a formação de ligações cruzadas. Essa matriz era aprisionada entre duas membranas de policarbonato (biossensor do tipo sanduíche). O biossensor que apresentou melhor desempenho foi o que tinha uma matriz enzimática com a composição de 30% (w/w) de mucina, 70% (w/w) de albumina, 1,35 U de GOx e glutaraldeído diluído a 3%. Esse biossensor apresentou baixo tempo de resposta, altas sensibilidade e estabilidade, e boa reprodutibilidade.

2.5. Comentários Finais

Além dos trabalhos acima citados, na literatura, podem ser encontrados diversos outros que também visaram à modelagem de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas (ASERIS & BARONAS, 2010; BRITZ *et al.*, 2009; GAJOVIC *et al.*, 1999; LIU, 2012; LUCISANO & GOUGH, 1988; MARTENS & HALL, 1994; MEENA & RAJENDRAN, 2010; ROSSOKHATY & ROSSOKHATA, 2002; YOKOYAMA & KAYANUMA, 1998). Entretanto, são escassos os trabalhos que utilizaram o modelo proposto para otimizar o desempenho do biossensor investigado.

Dessa forma, o presente trabalho se propõe a elaborar um estudo mais completo, através da modelagem, análise e otimização de biossensores amperométricos de segunda e terceira geração baseados em enzimas, com o propósito de direcionar o planejamento de experimentos durante o desenvolvimento de novos biossensores, diminuindo, assim, o número de experimentos necessários e o tempo e custo de desenvolvimento.

Esse trabalho dá continuidade a uma linha de pesquisa em biossensores do Laboratório de Fenômenos Interfaciais (GRIFIT) do Programa de Engenharia Química da COPPE. Em 2009, GUIMARÃES realizou um estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett visando o desenvolvimento de um biossensor de colesterol. Em 2013, NICOLINI desenvolveu biossensores baseados em peroxidase imobilizada em nanotubos de titanato para detecção do peróxido de hidrogênio. Em 2015, MACHADO desenvolveu biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato. O conhecimento experimental adquirido pelo grupo com a realização desses trabalhos foi essencial para elaborar o presente trabalho, o qual é, portanto, o primeiro do grupo que visou à modelagem matemática de biossensores.

3. METODOLOGIA

Nesse trabalho, inicialmente, foram propostos modelos matemáticos para descrever o comportamento de biossensores amperométricos de segunda e terceira geração. Em seguida, com o propósito de estimar os parâmetros dos modelos e também validar tais modelos, foram realizados experimentos com biossensores baseados na enzima peroxidase de raiz forte (HRP) para representar os biossensores amperométricos de terceira geração e biossensores baseados na enzima glicose oxidase (GOx) para representar os biossensores de segunda geração.

Foram preparados seis diferentes biossensores baseados em HRP, variando a concentração total de enzima no biossensor e a espessura do filme polimérico, e seis diferentes biossensores baseados em GOx, variando a concentração total de enzima no biossensor e a concentração de mediador. Após a construção desses biossensores, técnicas eletroquímicas foram utilizadas para avaliar as respostas amperométricas desses biossensores na presença de seus respectivos analitos, os quais se tratam do peróxido de hidrogênio para os biossensores baseados em HRP e da glicose para os biossensores baseados em GOx. Com isso, foi possível obter a corrente resultante do processo redox que ocorre entre a enzima e o analito em função do potencial aplicado, da concentração do analito em solução e do tempo decorrido. Assim, utilizando os dados experimentais obtidos por essas técnicas eletroquímicas, os modelos propostos foram ajustados e validados. Por fim, a partir dos modelos desenvolvidos, foram feitas análises de sensibilidade e os desempenhos dos biossensores foram otimizados.

Dessa forma, esse capítulo foi dividido em duas partes: parte experimental e parte teórica. Na primeira parte, são apresentados os materiais e métodos utilizados nos experimentos realizados, explicando como os biossensores utilizados foram preparados e caracterizados e como suas respostas eletroquímicas foram avaliadas. Já na segunda parte, foi detalhada a metodologia empregada na parte teórica do trabalho (modelagem, simulação, estimação, validação, análise e otimização).

3.1. Parte Experimental

3.1.1. Soluções de HRP, GOx e mediador

Foram preparadas soluções de peroxidase de raiz forte (HRP tipo VI, 253 U/mg sólido, Sigma-Aldrich), em tampão fosfato-salino (PBS) 0,1 M pH 7,0, nas concentrações de 2 mg/mL e 4 mg/mL (NICOLINI *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2006; TENG *et al.*, 2009). Já as soluções de glicose oxidase (GOx tipo X-S de *Aspergillus niger*, 128,2 U/mg sólido, Sigma-Aldrich) foram preparadas nas concentrações de 5 mg/mL e 10 mg/mL (FIORITO & TORRESI, 2001; GHICA & BRETT, 2005; RISHPON *et al.*, 1994).

Como mediador, nos biossensores de segunda geração, foi utilizado o ferricianeto de potássio, $K_3[Fe(CN)_6]$, pois é um bom acceptor de elétrons para a GOx e pode ser aprisionado juntamente com a enzima no filme polimérico. Dessa forma, foram preparadas soluções de ferricianeto de potássio, em PBS 0,1 M pH 7,0, nas concentrações de 0,1 M, 0,2 M e 0,3 M (ARSLAN & BESKAN, 2014).

Todas as soluções utilizadas nesse trabalho foram preparadas com água ultrapura (tipo Milli-Q), que se trata de uma água deionizada que foi purificada em um sistema Milli-Q (Millipore Corporation).

3.1.2. Dosagem de proteínas

A fim de determinar as concentrações reais das soluções enzimáticas preparadas, foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976), o qual se baseia na ligação do corante Azul Brillhante de Coomassie com as proteínas presentes em solução. Essa ligação provoca um deslocamento no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm. Assim, a absorbância em 595 nm é medida para quantificar as proteínas totais de uma amostra.

3.1.2.1. Solução de azul brilhante de coomassie

Para o preparo de 1 L de solução de corante com concentração de 100 mg/L, primeiramente, foram pesados 100 mg de azul brilhante de coomassie G (Vetec) e dissolvidos em 50 mL de etanol 95% sob agitação constante por 20 minutos. Logo depois, foram adicionados 100 mL de ácido ortofosfórico 85%, mantendo a solução sob agitação contínua por mais 1h para completa homogeneização. A solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 1 L e o volume foi aferido com água Milli-Q. Devido à fotossensibilidade do reagente, a solução era armazenada em frasco âmbar a 4°C, e sempre filtrada antes do uso.

3.1.2.2. Soluções de Albumina de Soro Bovino (BSA – *Bovine Serum Albumin*)

Para a construção da curva de calibração, foram preparadas soluções de BSA (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 g/L. Para isso, foram pesados 10 mg de BSA e dissolvidos em água Milli-Q. Em um balão volumétrico, o volume foi ajustado para 100 mL. A partir dessa solução de 0,1 g/L, foram obtidas as demais soluções por meio de diluições. Todas essas soluções eram preparadas a cada dia de análise.

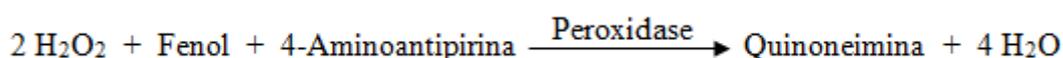
3.1.2.3. Curva padrão e determinação da concentração de proteína na amostra

Foi misturado 1 mL da solução de Azul Brilhante de Coomassie a 0,1 mL das soluções de BSA. Após 10 minutos de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. Assim, foi construída a curva de calibração (absorbância em função da concentração de proteína).

Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado, mas substituindo as soluções de BSA pelas soluções enzimáticas. Dessa forma, com o auxílio da curva padrão, as absorbâncias medidas foram relacionadas com a concentração de proteína e, assim, foram determinadas as concentrações reais das soluções de HRP e GOx.

3.1.3. Determinação das atividades específicas da HRP e da GOx

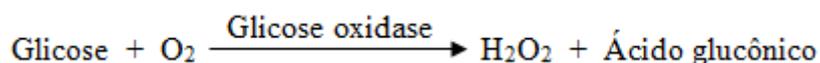
Por definição, 1 unidade (1 U) de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de consumo de substrato de 1 μmol por minuto. Assim, para a determinação das atividades específicas das enzimas HRP e GOx, foi utilizado o método colorimétrico proposto por TRINDER (1969). Nesse ensaio, a peroxidase catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com 4-aminoantipirina e fenol que resulta na formação de um complexo de cor vermelha, a quinoneimina, segundo a seguinte reação:



Portanto, a taxa de geração de cor, a qual absorve a 510 nm, é proporcional à taxa de consumo de H_2O_2 . Dessa forma, para a determinação da atividade específica da HRP, primeiramente, 1,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,0017 M foi adicionado a 1,4 mL de solução de 4-aminoantipirina 0,0025 M com fenol 0,17 M. A mistura foi incubada em espectrofotômetro em 510 nm, estabelecendo, assim, o branco. Em seguida, 0,1 mL da amostra contendo a enzima foi adicionado e o aumento da absorbância foi registrado por 5 minutos. Com isso, a atividade específica (U/mg proteína) da HRP é dada pela equação 3.1.

$$U/mg = \frac{\Delta Abs(510 \text{ nm})/min}{6,58 * \frac{mg \text{ enzima}}{3 \text{ mL}}} \quad 3.1$$

Para a determinação da atividade específica da GOx foi utilizado o mesmo método, apenas substituindo a solução de H_2O_2 por uma solução de glicose e adicionando, além da GOx, uma solução de HRP. Assim, a glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose, resultando na formação de peróxido de hidrogênio, conforme a reação abaixo.



O peróxido de hidrogênio, por sua vez, com o auxílio da HRP, reage com 4-aminoantipirina e fenol, conforme explicado acima. Dessa forma, a taxa de geração de cor é proporcional à taxa de consumo de H_2O_2 , que é proporcional à taxa de consumo de glicose.

3.1.4. Imobilização das enzimas

Para a imobilização de ambas as enzimas, foi escolhido o método de oclusão, pois é uma técnica simples, rápida e que preserva a atividade enzimática. No entanto, com o decorrer do tempo, pode haver perda da biomolécula por lixiviação. Entretanto, os biossensores construídos para a realização desse trabalho não precisavam ter um longo tempo de vida útil, já que eram utilizados logo que preparados e seu uso visava apenas à coleta de dados.

Assim, para a imobilização das enzimas foi utilizado o Nafion[®], que é um polieletrólito aniônico perfluorossulfonado que tem boa condutividade elétrica, altas estabilidades química e mecânica e boa biocompatibilidade (TENG *et al.*, 2009).

Para a imobilização da HRP, as soluções da enzima livre foram misturadas com a solução alcoólica de Nafion[®] 5% (Sigma-Aldrich) nas proporções volumétricas de 1:1, 4:1 e 7:1 (HRP : Nafion[®]). Dessa forma, foi possível construir seis biossensores diferentes, variando tanto a concentração total de enzima no biossensor quanto a espessura do filme polimérico, resultando em um total de oito experimentos, nos quais os três primeiros foram réplicas para a obtenção do erro experimental. A Tabela 3.1 apresenta as condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em HRP. As respostas amperométricas dos diferentes biossensores construídos foram avaliadas por técnicas eletroquímicas, que serão explicadas mais adiante. Os resultados obtidos nos experimentos 1 a 3 (réplicas) foram utilizados para a estimação dos parâmetros do modelo proposto, enquanto que os resultados obtidos nos demais experimentos foram utilizados para validar tal modelo.

Já para a imobilização da GOx, primeiramente, as soluções de GOx livre foram misturadas com as soluções de ferricianeto de potássio na proporção volumétrica de 1:1 e, a essa mistura, foi adicionada a solução alcoólica de Nafion[®] 5% na proporção volumétrica de 4:1 (GOx/Mediador : Nafion[®]). Assim sendo, tanto a concentração total de enzima quanto a concentração de mediador no biossensor foram variadas, possibilitando a construção de seis biossensores diferentes, resultando em oito experimentos, nos quais os três primeiros foram réplicas. A Tabela 3.2 apresenta as condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em GOx. Assim como para a HRP, os resultados obtidos nos experimentos 1 a 3 (réplicas) foram

utilizados para a estimação dos parâmetros do modelo desenvolvido e os resultados obtidos para os demais experimentos foram utilizados para validar esse modelo.

Tabela 3.1. Condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em HRP

Experimento	Concentração da solução de HRP (mg/mL)	Proporção volumétrica HRP: Nafion[®]
1	2	4:1
2	2	4:1
3	2	4:1
4	2	1:1
5	2	7:1
6	4	1:1
7	4	4:1
8	4	7:1

Tabela 3.2. Condições dos experimentos realizados com biossensores baseados em GOx

Experimento	Concentração da solução de GOx (mg/mL)	Concentração da solução de mediador (M)
1	5	0,1
2	5	0,1
3	5	0,1
4	5	0,2
5	5	0,3
6	10	0,1
7	10	0,2
8	10	0,3

3.1.5. Preparo dos biossensores

Para o preparo dos biossensores, optou-se pelo uso de eletrodos impressos, os quais contêm os eletrodos de trabalho, auxiliar e de referência impressos no mesmo suporte. Os eletrodos impressos, ou *screen-printed electrodes*, são produzidos pela tecnologia de *screen-printing*, também conhecida como *silk screen*, que permite a produção simples, rápida e barata de sensores. Dessa forma, possibilita a produção em massa de eletrodos a um custo reduzido, sendo, por isso, apropriada para a produção de eletrodos descartáveis (NASCIMENTO & ANGNES, 1998).

O processo de *screen-printing* consiste na deposição de camadas de tinta condutora em um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. Depois, é aplicada uma camada de material isolante, deixando livre uma área para ser usada como contato elétrico e outra área para ser a superfície do eletrodo propriamente dita (MACHADO, 2015).

Nesse trabalho, foram usados eletrodos impressos (ItalSens Sensors IS-C) com eletrodo de trabalho (W.E.) de carbono grafite (3 mm de diâmetro, 0,071 cm² de área), contra eletrodo (C.E.) de pasta polimérica de carbono e eletrodo de referência (R.E.) de pasta de prata, impressos sob um suporte de poliéster, conforme mostrado na Figura 3.1.

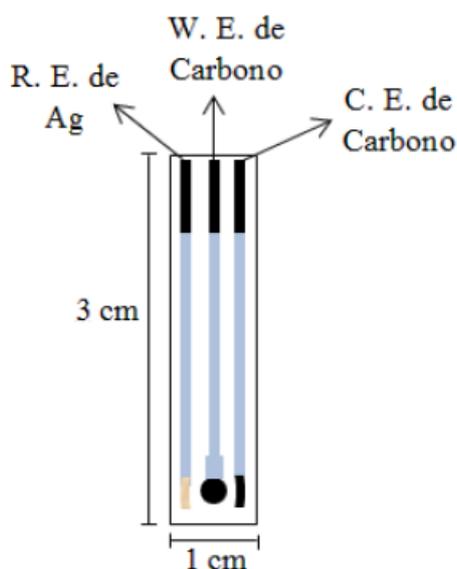


Figura 3.1. Eletrodo impresso utilizado para o preparo dos biossensores.

Assim, para o preparo de um biossensor, a superfície do eletrodo de trabalho foi modificada com 6 µL de uma das soluções de HRP/Nafion[®], para o caso dos

biossensores de terceira geração, ou com 6 μL de uma das soluções de GOx/Mediador/Nafion[®], para os de segunda geração. Por fim, o biossensor foi mantido em estufa a 35°C *overnight* para secagem.

3.1.6. Determinação da espessura do filme polimérico

Com o propósito de estimar as espessuras dos filmes poliméricos dos diferentes biossensores construídos, um eletrodo de trabalho foi modificado com 6 μL de Nafion[®] e, após a secagem, a amostra foi metalizada por deposição de uma fina camada de ouro e analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), com a utilização de microscópio FEI Company, modelo Quanta 200.

3.1.7. Técnicas eletroquímicas

Com o intuito de avaliar as respostas dos biossensores preparados, foram realizadas voltametrias cíclicas e cronoamperometrias, utilizando o potenciostato PalmSens (Figura 3.2) e ao software PStTrace 2.5.2.



Figura 3.2. Potenciostato PalmSens.

3.1.7.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica que investiga a relação da corrente com o potencial aplicado. Para isso, é feita uma varredura do potencial e é medida a intensidade da corrente resultante dos fenômenos que ocorrem na interface eletrodo de trabalho e solução (SKOOG *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, a técnica de voltametria cíclica foi utilizada com a finalidade de determinar o potencial no qual o processo redox ocorre. Assim, o potencial aplicado foi variado de -2 V a 2 V, com uma velocidade de varredura de 0,1 V/s, e a corrente gerada foi medida. As análises foram feitas em PBS 0,1 M pH 7,0, em H₂O₂ 0,2 mM (biossensores de terceira geração) e em glicose 5 mM (biossensores de segunda geração).

3.1.7.2. Cronoamperometria

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica na qual se aplica um potencial fixo e a corrente que flui através do eletrodo de trabalho é monitorada em função do tempo.

Dessa forma, a cronoamperometria foi utilizada com a finalidade de avaliar as respostas transientes e estacionárias dos biossensores preparados. Para isso, o potencial determinado pela técnica de voltametria cíclica foi aplicado, e foram feitas adições sucessivas, em determinados intervalos de tempo, de 40 ou 80 µL H₂O₂ 0,02 M (biossensores de terceira geração) ou de 80 µL glicose 0,1 M (biossensores de segunda geração) em 10 mL de PBS 0,1 M pH 7,0, sob uma agitação constante de 400 rpm. Com isso, além de obter a corrente em função do tempo (resposta transiente), foi possível construir as curvas analíticas dos biossensores, as quais relacionam a corrente de resposta estacionária com a concentração do analito em solução.

Essa técnica foi essencial para a realização desse trabalho, já que os dados obtidos pelas cronoamperometrias foram utilizados na estimativa de parâmetros e na validação dos modelos. Para a estimativa de parâmetros foram utilizados os resultados das cronoamperometrias realizadas com os biossensores construídos nos experimentos 1 a 3 (Tabelas 3.1 e 3.2) e, para a validação dos modelos, foram utilizados os resultados das cronoamperometrias realizadas com os biossensores preparados nos experimentos 4 a 8 (Tabelas 3.1 e 3.2).

3.2. Parte Teórica

3.2.1. Modelagem matemática dos biossensores

Nesse trabalho, foram desenvolvidos modelos matemáticos para descrever o comportamento de biossensores amperométricos de segunda e terceira geração. As hipóteses consideradas para a formulação dos modelos foram: regime transiente; difusão unidimensional; sistema isotérmico; sem resistência à transferência de massa na superfície externa da membrana; coeficientes de difusão constantes; interface filme-solução em equilíbrio termodinâmico; enzimas imobilizadas ao longo do filme polimérico, não podendo se mover; e mediador (biossensor de segunda geração) confinado dentro do filme. Com isso, os modelos obtidos são dinâmicos, não lineares, determinísticos e microscópicos (há variação espacial), constituídos por equações diferenciais parciais, que descrevem os fenômenos de difusão e reação que ocorrem nos biossensores.

3.2.2. Simulações numéricas

Os modelos propostos foram implementados no simulador de processos baseado em equações EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*) (SOARES & SECCHI, 2003). As simulações foram realizadas utilizando, como algoritmo de resolução dos sistemas de equações algébricas, o NLSolver, que utiliza o método de Newton-Raphson, e, como algoritmo de resolução de sistemas de equações algébrico-diferenciais, o DASSLC (SECCHI, 2012), que faz uso do método BDF - *Backward Differentiation Formulae* (ASCHER & PETZOLD, 1997). Para os dois algoritmos, já incluídos no simulador, foram definidas as tolerâncias relativa e absoluta em 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente. As equações diferenciais parciais foram discretizadas pelo método de colocação ortogonal (VILLADSEN & STEWART, 1967) para os biossensores de segunda geração e pelo método da colocação ortogonal em elementos finitos para os biossensores de terceira geração, aproximando as funções por polinômios de Jacobi por partes e utilizando, como pontos de colocação, as raízes desses polinômios.

3.2.3. Estimação de parâmetros e validação dos modelos

A estimação dos parâmetros dos modelos foi realizada utilizando o método da máxima verossimilhança, o qual se baseia na maximização da função de verossimilhança, que, por sua vez, indica a probabilidade de se produzir os dados observados em função de possíveis valores de parâmetros (MONTGOMERY, 2012).

A fim de avaliar a qualidade da estimação, foram calculados os intervalos de confiança dos parâmetros estimados, suas significâncias, o coeficiente de determinação do modelo ajustado aos dados experimentais e a significância desse modelo.

O coeficiente de determinação, R^2 , mede a variabilidade relativa da variável de saída ajustada pelo modelo e é calculado pela equação 3.2.

$$R^2 = 1 - \frac{\hat{\sigma}_y^2}{\sigma_y^2} \quad 3.2$$

No qual σ_y^2 é a variabilidade dos dados experimentais e $\hat{\sigma}_y^2$ é a variabilidade residual, ou seja, a variância calculada a partir dos desvios do modelo em relação aos dados experimentais, obtida pela seguinte equação:

$$\hat{\sigma}_y^2 = \min_p \frac{1}{N - m} \sum_{i=1}^N [y_i - f(x_i; p)]^2 \quad 3.3$$

Em que p é o vetor de parâmetros estimado, m é o número de parâmetros, N é o número de experimentos, y é o vetor da variável medida, x é o vetor da variável independente e f é a função que descreve o modelo da variável medida.

O grau de significância (1-p-valor) do ajuste é dado pelo teste estatístico F, descrito abaixo, baseado na comparação entre a variabilidade da variável medida que foi explicada pelo ajuste e a variabilidade residual.

$$\frac{1 - \delta}{2} < P(F < F^*) < \frac{1 + \delta}{2} \quad 3.4$$

$$F = \frac{\hat{\sigma}_y^2}{\sigma_y^2} \quad 3.5$$

No qual P é a função distribuição de probabilidade acumulada de Fisher, F^* é o ponto crítico da distribuição F com $N - m$ graus de liberdade no numerador e N graus de liberdade no denominador e δ é o nível de confiança desejado, que, nesse trabalho, foi fixado em 95%.

O grau de significância (1-p-valor) do parâmetro estimado é dado pelo teste t baseado na comparação entre o parâmetro estimado e sua variância:

$$t = \frac{\hat{p}_i}{\sqrt{V[\hat{p}_i]}} \quad 3.6$$

Em que \hat{p}_i é o parâmetro estimado e $V[\hat{p}_i]$ é a variância desse parâmetro.

O intervalo de confiança, por sua vez, reflete a faixa de erro do parâmetro estimado para um determinado nível de confiança:

$$\hat{p}_i - \eta\sigma_i \leq p_i \leq \hat{p}_i + \eta\sigma_i \quad 3.7$$

Para um nível de confiança de 95%, $\eta \cong 2$.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar sua capacidade de generalização, foi feita a validação cruzada dos modelos. A técnica de validação cruzada se baseia na divisão do conjunto total de dados em subconjuntos mutualmente exclusivos, e na utilização de alguns desses subconjuntos para a estimação de parâmetros e o restante dos subconjuntos para a validação do modelo (KOHAVI, 1995). Dessa forma, foi utilizado um subconjunto, composto pelos dados experimentais dos três primeiros experimentos (réplicas), para a estimação de parâmetros e os demais subconjuntos, formados pelos outros dados, foram usados para a validação do modelo.

3.2.4. Análise de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores

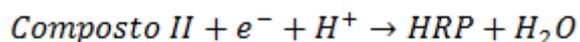
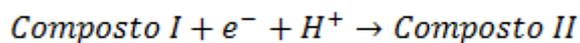
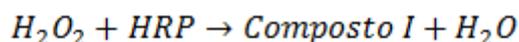
Após a validação dos modelos, foram realizadas as análises de sensibilidade via construção das superfícies de resposta simulada. Com isso, foi possível avaliar o efeito da variação de parâmetros como concentração total de enzima, espessura do filme ou concentração total de mediador, na resposta dos biossensores.

Por fim, tomando como base os resultados das análises de sensibilidade, foi realizada a otimização do desempenho dos biossensores, através da maximização de suas sensibilidades (variação da corrente de resposta estacionária com a variação da concentração do analito em solução), utilizando o método DIRECT (*Dividing Rectangles*), que consiste em um método determinístico de busca do ótimo global (FINKEL, 2003). A fim de maximizar a função objetivo, esse método divide o domínio em hiper-retângulos e avalia o valor da função objetivo no centro desses hiper-retângulos. Os hiper-retângulos que possuem a maior probabilidade de produzir um valor para a função objetivo mais alto que o maior valor atual são selecionados e subdivididos em hiper-retângulos menores. Esse processo continua até que esses hiper-retângulos sejam suficientemente pequenos.

4. MODELAGEM MATEMÁTICA

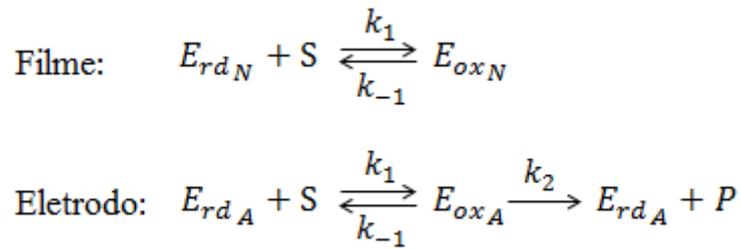
4.1. Biossensores amperométricos de terceira geração

Com o intuito de representar os biossensores amperométricos de terceira geração, foram utilizados biossensores baseados na enzima HRP (*horseradish peroxidase*), nos quais as formas oxidadas da enzima são reduzidas por elétrons doados do próprio eletrodo (transferência direta de elétrons). Assim, o ciclo catalítico da HRP imobilizada na superfície do eletrodo envolve as seguintes reações:



Entretanto, os métodos de imobilização levam, geralmente, à formação de camadas de enzimas orientadas aleatoriamente, como é o caso da oclusão. Por isso, deve ser considerado que apenas uma fração da quantidade total de enzima presente no biossensor tem seu sítio ativo em contato direto com o eletrodo. Dessa forma, no modelo, foi incluído o parâmetro α ($0 \leq \alpha \leq 1$) que se refere à fração molar de enzima eletroquimicamente ativa. O parâmetro α será igual a 1 apenas nos casos em que houvera a formação de uma monocamada orientada (FREIRE *et al.*, 2003), o que pode ser alcançado com o uso de certas técnicas de imobilização, como ligações covalentes, afinidade ou adsorção de filmes de Langmuir-Blodgett (GUIMARÃES, 2009), se delineadas de modo apropriado.

Assim sendo, $1 - \alpha$ corresponde à fração molar de enzima que pode reagir com o substrato, mas que não é capaz de receber elétrons do eletrodo. Portanto, as reações que ocorrem em um biossensor de terceira geração podem ser escritas da seguinte forma:



Nas quais S é o substrato, P é o produto, E_{rd_N} e E_{ox_N} são as formas reduzida e oxidada da enzima que não está em contato direto com o eletrodo, e E_{rd_A} e E_{ox_A} são as formas reduzida e oxidada da enzima eletroquimicamente ativa, respectivamente.

A Figura 4.1 mostra uma representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de terceira geração. Como pode ser observado, o substrato, que está em equilíbrio termodinâmico na interface filme-solução (partição), se difunde através do filme e é reduzido pela forma reduzida da enzima. Caso essa enzima esteja em contato direto com o eletrodo, ela retorna à sua forma reduzida através da doação de elétrons provenientes do próprio eletrodo. Entretanto, caso essa enzima não seja eletroquimicamente ativa, só poderá retornar à sua forma reduzida pela reação reversa. No entanto, sabe-se que a reação entre a HRP e o H_2O_2 é praticamente irreversível, $k_{-1} \ll k_1$, fato comprovado pela estimativa de parâmetros, fazendo com que as enzimas eletroquimicamente inativas permaneçam na sua forma oxidada, não podendo reagir novamente com o substrato.

A partir disso, foi proposto o modelo matemático apresentado na Tabela 4.1, no qual D_S é o coeficiente de difusão do substrato no filme polimérico, $[E_T]$ é a concentração inicial de enzima no biossensor, K_S é o coeficiente de partição filme-solução do substrato, e $[S]_\infty$ é a concentração de substrato na solução. Esse modelo considera que a corrente é proporcional à taxa de formação de produto e que a corrente máxima de resposta ocorre quando toda enzima eletroquimicamente ativa está em sua forma oxidada, isto é, quando se atinge a saturação dessas enzimas.

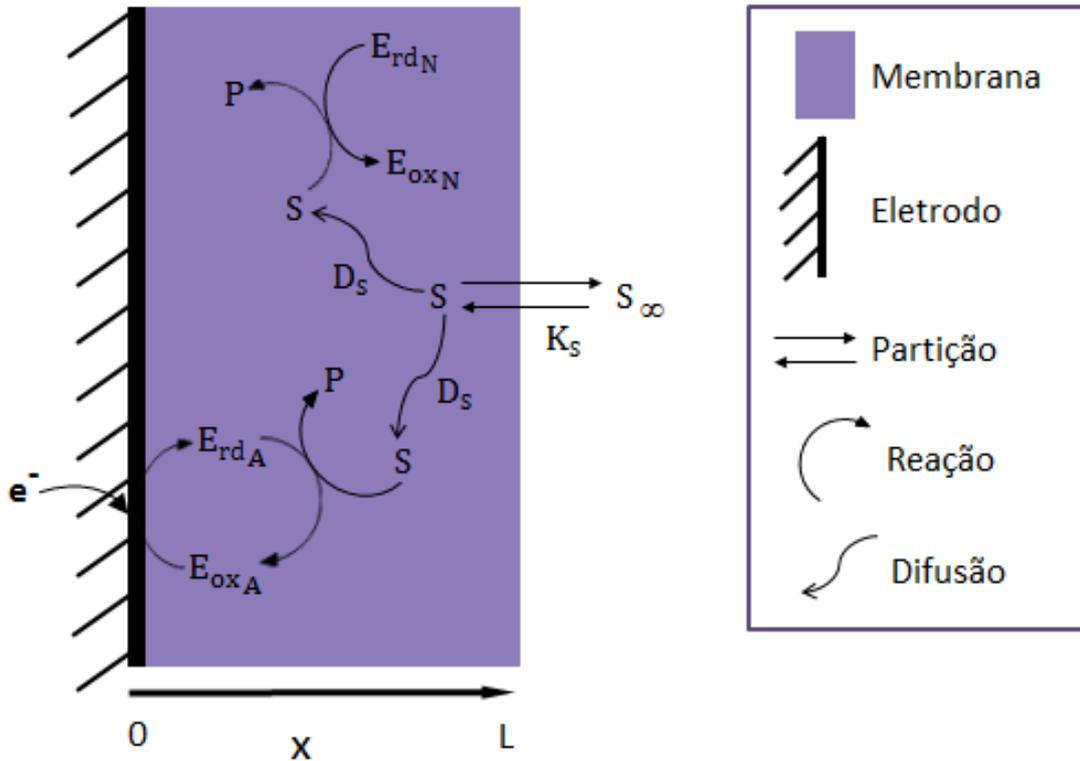


Figura 4.1. Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de terceira geração.

4.1.1. Adimensionamento

Com o propósito de simplificar a notação, facilitar a implementação dos métodos numéricos, e dar um significado às variáveis que não seja atrelado a um determinado sistema de unidades, foi realizado o adimensionamento das equações do modelo. Apenas o tempo foi mantido dimensional a fim de facilitar a comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais. Desse modo, foram definidas novas variáveis e parâmetros adimensionais, além das constantes de tempo (parâmetros dimensionais), os quais são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.1. Modelo matemático para biossensores amperométricos de terceira geração

Balço de massa para o substrato	$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - k_1[E_{rd}]_N[S] + k_{-1}[E_{ox}]_N$	4.1
Balço de massa para a forma reduzida da enzima	$\frac{d[E_{rd}]_A}{dt} = -k_1[E_{rd}]_A[S] _{x=0} + (k_{-1} + k_2)[E_{ox}]_A$	4.2
	$\frac{\partial[E_{rd}]_N}{\partial t} = -k_1[E_{rd}]_N[S] + k_{-1}[E_{ox}]_N$	4.3
Taxa de formação do produto	$r_p = k_2[E_{ox}]_A$	4.4
Taxa máxima de formação do produto	$r_{pmax} = k_2\alpha[E_T]$	4.5
Balço de massa para a enzima	$\alpha[E_T] = [E_{ox}]_A + [E_{rd}]_A$	4.6
	$(1 - \alpha)[E_T] = [E_{ox}]_N + [E_{rd}]_N$	4.7
Corrente de resposta	$i(t) \propto (-r_p)$	4.8
Corrente máxima de resposta	$i_{max} \propto (-r_{pmax})$	4.9
Condições de contorno	$x = 0: \quad \frac{D_S \partial[S]}{L \partial x} = k_1[E_{rd}]_A[S] - k_{-1}[E_{ox}]_A$	4.10
	$x = L: \quad [S] = K_S[S]_\infty$	4.11
Condição inicial	$t = 0: \quad [S] = 0$	4.12
	$[E_{rd}]_A = \alpha[E_T]$	4.13
	$[E_{rd}]_N = (1 - \alpha)[E_T]$	4.14

Tabela 4.2. Variáveis e parâmetros adimensionais e constantes de tempo do modelo para biossensores de terceira geração

Variáveis Adimensionais	$s = \frac{[S]}{K_S[S]_{\infty ref}} \quad \phi_N = \frac{[E_{rd}]_N}{(1 - \alpha)[E_T]} \quad \phi_A = \frac{[E_{rd}]_A}{\alpha[E_T]} \quad \chi = \frac{x}{L}$	4.15
	$R = \frac{r_p}{r_{pmax}} \quad I = \frac{i}{i_{max}}$	
Parâmetros Adimensionais	$\mu = \frac{k_1}{k_{-1}} K_S[S]_{\infty ref} \quad \gamma = \frac{k_1 K_S[S]_{\infty ref}}{(k_{-1} + k_2)}$	4.16
	$\kappa_1^2 = L^2 \frac{k_1[E_T]}{D_S} \quad \kappa_2^2 = L^2 \frac{k_{-1}[E_T]}{D_S K_S[S]_{\infty ref}}$	
Constantes de Tempo	$\tau_1(s) = \frac{L^2}{D_S} \quad \tau_2(s) = \frac{1}{(k_{-1} + k_2)} \quad \tau_3(s) = \frac{1}{k_{-1}}$	4.17

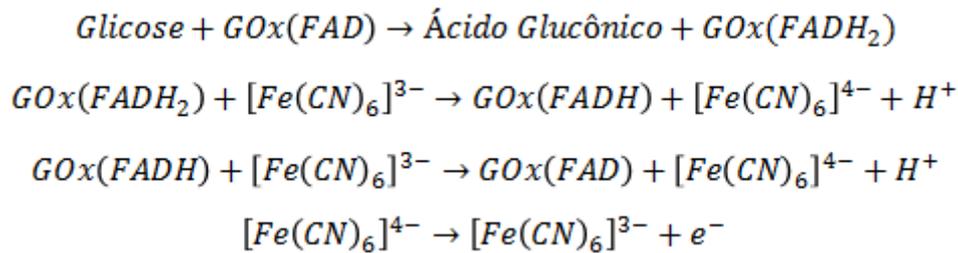
Pela Tabela 4.2, pode-se observar que, para o adimensionamento da variável referente à concentração de substrato, foi utilizado o parâmetro $[S]_{\infty ref}$, o qual se refere à máxima concentração de substrato na qual a resposta amperométrica do biossensor permanece linear. Além disso, nota-se que os parâmetros adimensionais κ_1 e κ_2 podem ser entendidos como módulos de Thiele, pois traduzem a razão entre a velocidade de uma reação química e o transporte de massa por difusão. Após o adimensionamento, o modelo assumiu a forma apresentada na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Modelo matemático para biossensores amperométricos de terceira geração após adimensionamento

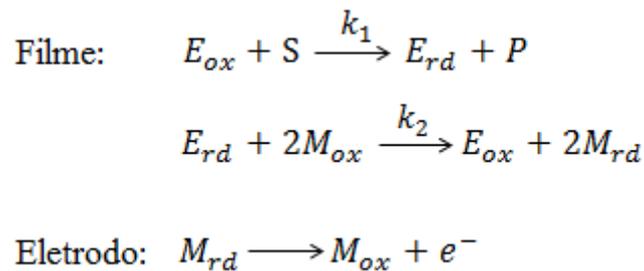
Balanco de massa para o substrato	$\tau_1 \frac{\partial s}{\partial t} = \frac{\partial^2 s}{\partial \chi^2} - \kappa_1^2 (1 - \alpha) \phi_N s + \kappa_2^2 (1 - \alpha) (1 - \phi_N)$	4.18
Balanco de massa para a forma reduzida da enzima	$\tau_2 \frac{d\phi_A}{dt} = -\gamma \phi_A s _{\chi=0} + (1 - \phi_A)$	4.19
	$\tau_3 \frac{\partial \phi_N}{\partial t} = -\mu \phi_N s + (1 - \phi_N)$	4.20
Taxa de formação do produto	$R = 1 - \phi_A$	4.21
Corrente de resposta	$I = R$	4.22
Condições de contorno	$\chi = 0: \quad \left. \frac{\partial s}{\partial \chi} \right _{\chi=0} = \kappa_1^2 \alpha \phi_A s _{\chi=0} - \kappa_2^2 \alpha (1 - \phi_A)$	4.23
	$\chi = 1: \quad s _{\chi=1} = \frac{[S]_{\infty}}{[S]_{\infty ref}}$	4.24
Condição inicial	$t = 0: \quad s = 0$	4.25
	$\phi_A = 1$	4.26
	$\phi_N = 1$	4.27

4.2. Biossensores amperométricos de segunda geração

Com a finalidade de representar os biossensores amperométricos de segunda geração, foram utilizados biossensores baseados na enzima GOx (glicose oxidase). Nesses biossensores, a transferência eletrônica entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo se dá com o auxílio de um mediador. Assim, as formas reduzidas da enzima são oxidadas por esse mediador, o qual retorna à sua forma oxidada pela perda de elétrons na superfície do eletrodo. Dessa forma, em um biossensor baseado em GOx, utilizando $K_3[Fe(CN)_6]$ como mediador, ocorrem as seguintes reações:



Essas reações podem ser reescritas de maneira simplificada:



Sendo S o substrato, P o produto, E_{ox} e E_{rd} as formas oxidada e reduzida da enzima, e M_{ox} e M_{rd} as formas oxidada e reduzida do mediador, respectivamente.

Na Figura 4.2, é mostrada uma representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de segunda geração. Conforme pode ser constatado, o substrato, que está em equilíbrio termodinâmico na interface filme-solução (partição), se difunde através do filme e é oxidado pela forma oxidada da enzima. A forma reduzida da enzima é, então, reoxidada pelo mediador, que, por sua vez, se reduz e difunde até a superfície do eletrodo, onde é rapidamente reoxidado.

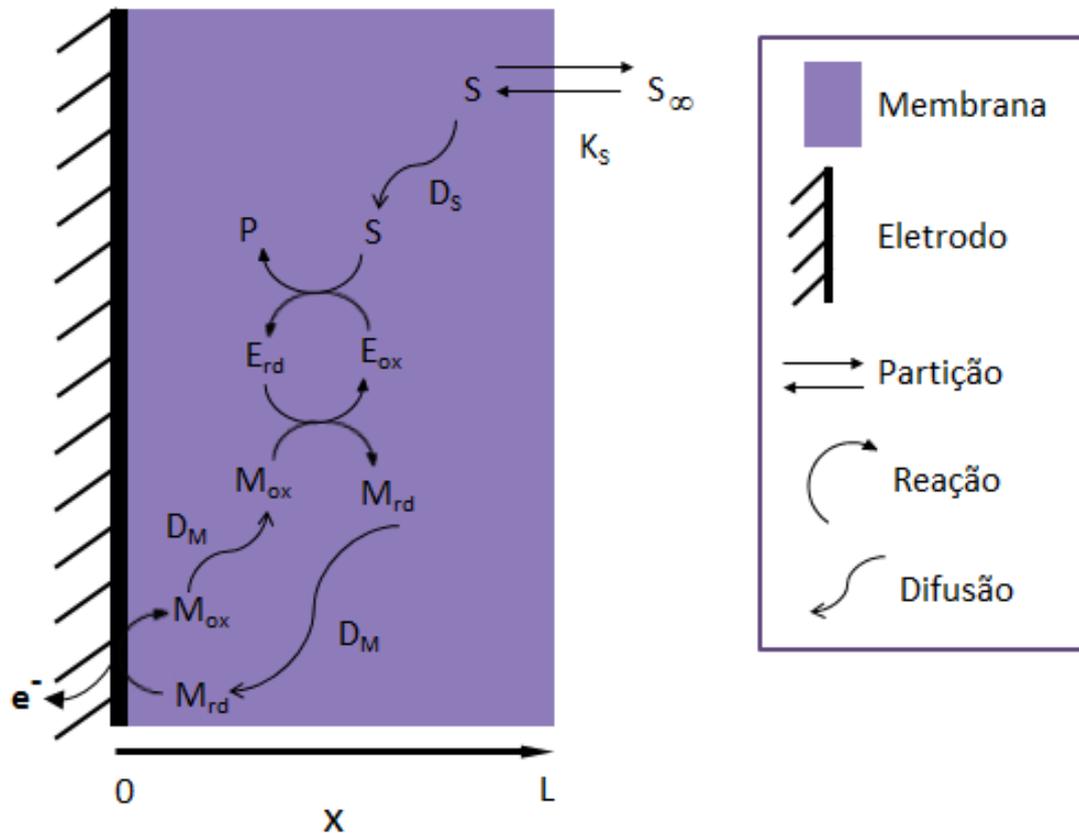


Figura 4.2. Representação esquemática dos fenômenos que ocorrem em um biossensor de segunda geração.

A Tabela 4.4 apresenta o modelo matemático desenvolvido, no qual D_S e D_M são os coeficientes de difusão do substrato e do mediador no filme polimérico, respectivamente, $[E_T]$ é a concentração inicial de enzima no biossensor, $[M_T]$ é a concentração inicial de mediador no biossensor, n é o número de elétrons necessários para reoxidar o mediador, que no caso do $K_3[Fe(CN)_6]$ é 1, F é a constante de Faraday, A é a área superficial do eletrodo de trabalho, K_S é o coeficiente de partição filme-solução do substrato, e $[S]_\infty$ é a concentração de substrato na solução.

Devido ao fato de a corrente ser gerada pela reoxidação do mediador, a corrente de resposta foi considerada proporcional ao fluxo de mediador na superfície do eletrodo. Além disso, analisando as condições de contorno na superfície do eletrodo ($x = 0$), pode-se perceber que esse modelo considera que a velocidade da reação eletroquímica que ocorre na superfície do eletrodo é tão alta, que a concentração da forma reduzida do mediador na superfície do eletrodo é permanentemente reduzida à zero.

Tabela 4.4. Modelo matemático para biossensores amperométricos de segunda geração

Balanco de massa para o substrato		$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_S \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - k_1[E_{ox}][S]$	4.28
Balanco de massa para a forma oxidada do mediador		$\frac{\partial[M_{ox}]}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2[M_{ox}]}{\partial x^2} - 2k_2[E_{rd}][M_{ox}]$	4.29
Balanco de massa para a forma reduzida do mediador		$\frac{\partial[M_{rd}]}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2[M_{rd}]}{\partial x^2} + 2k_2[E_{rd}][M_{ox}]$	4.30
Balanco de massa para a forma oxidada da enzima		$\frac{\partial[E_{ox}]}{\partial t} = k_2[E_{rd}][M_{ox}] - k_1[E_{ox}][S]$	4.31
Balanco de massa para a enzima		$[E_T] = [E_{ox}] + [E_{rd}]$	4.32
Corrente de resposta		$i(t) = nFAD_M \left(\frac{\partial[M_{rd}]}{\partial x} \right)_{x=0}$	4.33
Condições de contorno	$x = 0:$	$\frac{\partial[S]}{\partial x} = 0$	4.34
		$\frac{\partial[M_{ox}]}{\partial x} = - \frac{\partial[M_{rd}]}{\partial x}$	4.35
		$[M_{rd}] = 0$	4.36
	$x = L:$	$[S] = K_S[S]_\infty$	4.37
		$\frac{\partial[M_{ox}]}{\partial x} = 0$	4.38
		$\frac{\partial[M_{rd}]}{\partial x} = 0$	4.39
Condição inicial	$t = 0:$	$[S] = 0$	4.40
		$[M_{ox}] = [M_T]$	4.41
		$[M_{rd}] = 0$	4.42
		$[E_{ox}] = [E_T]$	4.43

4.2.1. Adimensionamento

Assim como o modelo para biossensores de terceira geração, esse modelo também foi adimensionado. Nesse caso, tanto o tempo, quanto a corrente foram mantidos dimensionais, a fim de facilitar a comparação entre os resultados simulados e

os dados experimentais. Para esse modelo, a corrente adimensional seria definida como $I = i/\lambda$, entretanto foi necessário estimar λ , pois o parâmetro D_M , que faz parte de sua definição, não era conhecido. Por isso, a fim de possibilitar a estimação de parâmetros, dispondo da corrente medida experimentalmente, essa não foi adimensionada.

A Tabela 4.5 apresenta as variáveis e os parâmetros adimensionais definidos, e também os parâmetros dimensionais, os quais incluem, além das constantes de tempo (τ_1 , τ_2 e τ_3), a constante de proporcionalidade entre a corrente de resposta e o fluxo adimensional de mediador (λ). A Tabela 4.6 apresenta as equações do modelo após o adimensionamento.

Conforme apresentado na Tabela 4.5, a variável adimensional referente à concentração de substrato é definida com o auxílio do parâmetro $[S]_{\infty_{ref}}$, o qual se refere à máxima concentração de substrato na qual a resposta amperométrica do biossensor permanece linear.

Além disso, analisando os parâmetros adimensionais do modelo, é possível notar que κ_1 e κ_2 expressam a razão entre a velocidade de uma reação química e o transporte de massa por difusão, sendo, portanto, denominados módulos de Thiele. Pode-se perceber que κ_1 se refere à reação da enzima com o substrato, e que κ_2 diz respeito à reação da enzima com o mediador.

Tabela 4.5. Variáveis e parâmetros adimensionais e parâmetros dimensionais do modelo para biossensores de segunda geração

Variáveis Adimensionais	$s = \frac{[S]}{K_S[S]_{\infty_{ref}}}$	$a = \frac{[M_{ox}]}{[M_T]}$	$b = \frac{[M_{rd}]}{[M_T]}$	
	$\phi = \frac{[E_{ox}]}{[E_T]}$	$\chi = \frac{x}{L}$		4.44
Parâmetros Adimensionais	$\kappa_1^2 = L^2 \frac{k_1[E_T]}{D_S}$	$\kappa_2^2 = L^2 \frac{k_2[E_T]}{D_M}$	$\gamma = \frac{k_2[M_T]}{k_1 K_S [S]_{\infty_{ref}}}$	4.45
Parâmetros Dimensionais	$\tau_1(s) = \frac{L^2}{D_S}$	$\tau_2(s) = \frac{L^2}{D_M}$		4.46
	$\tau_3(s) = \frac{1}{k_1 K_S [S]_{\infty_{ref}}}$	$\lambda(A) = \frac{nFAD_M[M_T]}{L}$		

Tabela 4.6. Modelo matemático para biossensores amperométricos de segunda geração após adimensionamento

Balço de massa para o substrato		$\tau_1 \frac{\partial s}{\partial t} = \frac{\partial^2 s}{\partial \chi^2} - \kappa_1^2 \phi s$	4.47
Balço de massa para a forma oxidada do mediador		$\tau_2 \frac{\partial a}{\partial t} = \frac{\partial^2 a}{\partial \chi^2} - 2\kappa_2^2(1 - \phi) a$	4.48
Balço de massa para a forma reduzida do mediador		$\tau_2 \frac{\partial b}{\partial t} = \frac{\partial^2 b}{\partial \chi^2} + 2\kappa_2^2(1 - \phi) a$	4.49
Balço de massa para a forma oxidada da enzima		$\tau_3 \frac{\partial \phi}{\partial t} = \gamma(1 - \phi)a - \phi s$	4.50
Corrente de resposta		$i(t) = \lambda \left. \frac{\partial b}{\partial \chi} \right _{\chi=0}$	4.51
Condições de contorno	$\chi = 0:$	$\frac{\partial s}{\partial \chi} = 0$	4.52
		$\frac{\partial a}{\partial \chi} = - \frac{\partial b}{\partial \chi}$	4.53
		$b = 0$	4.54
	$\chi = 1:$	$s = \frac{[S]_{\infty}}{[S]_{\infty ref}}$	4.55
		$\frac{\partial a}{\partial \chi} = 0$	4.56
		$\frac{\partial b}{\partial \chi} = 0$	4.57
	Condição inicial	$t = 0:$	$s = 0$
		$a = 1$	4.59
		$b = 0$	4.60
		$\phi = 1$	4.61

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Determinação da Espessura do Filme Polimérico

Conforme mostrado na Figura 5.1, a deposição de 6 μL de Nafion[®] sob um eletrodo de trabalho forneceu uma camada de filme polimérico com uma espessura de, aproximadamente, 10 μm , condizente com valores encontrados na literatura (BARONAS *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2005; LATIF *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2012).

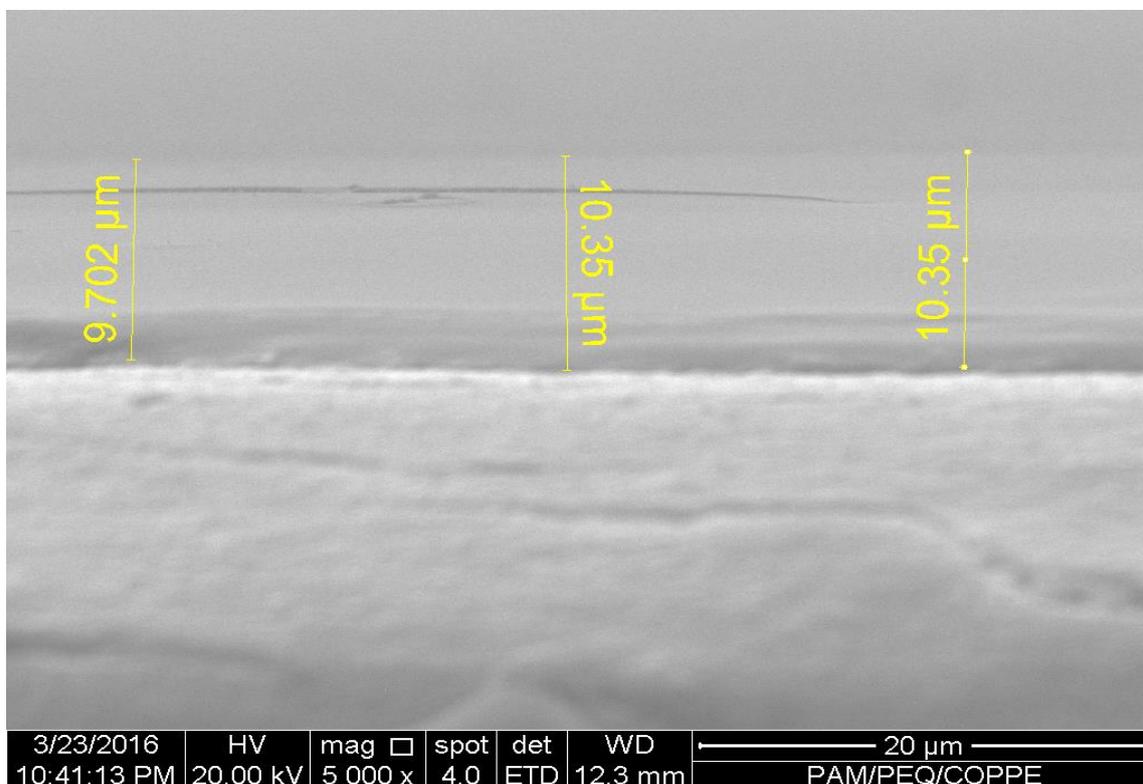


Figura 5.1. Imagem obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de um eletrodo de trabalho modificado com 6 μL de Nafion[®].

A partir desse valor, foi possível estimar as espessuras dos filmes dos diferentes biossensores construídos. Para isso, foi considerado o volume de Nafion[®] depositado sob o eletrodo de trabalho. Além disso, a concentração de enzima no biossensor foi utilizada para calcular o volume teórico ocupado pelas enzimas e, assim, estimar o

quanto as enzimas acrescentam na espessura. Dessa forma, as espessuras dos filmes foram estimadas utilizando a seguinte equação:

$$L = \frac{\varepsilon}{V_T} V_{Nafion} + \frac{V_T [E_T] N_{Av} \pi d^3}{6A} \quad 5.1$$

Na qual V_T é o volume total de solução depositado sob o eletrodo de trabalho (6 μL), ε é a espessura do filme polimérico obtido com a deposição de 6 μL de Nafion[®] (10 μm), V_{Nafion} é o volume de Nafion[®] depositado sob o eletrodo de trabalho, $[E_T]$ é a concentração de enzima no biossensor, N_{Av} é a constante de Avogadro, A é a área superficial do eletrodo de trabalho e d é o diâmetro da enzima, o qual foi utilizado o valor aproximado de 5 nm para a HRP (TENG *et al.*, 2009) e 6,3 nm para a GOX (LIBERTINO *et al.*, 2008).

5.2. Determinação dos Potenciais de Pico

Com o objetivo de determinar os potenciais nos quais os processos redox ocorrem, foram realizadas voltametrias cíclicas, nas quais o potencial foi variado de -2 V a 2 V, com uma velocidade de varredura de $0,1$ V/s.

A Figura 5.2 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos para o eletrodo impresso não modificado em tampão PBS $0,1$ M pH $7,0$, e para o biossensor (eletrodo modificado com HRP/Nafion[®]) em ausência e em presença de $0,2$ mM de H_2O_2 . Como pode ser observado, há um pico de redução em torno de $-0,75$ V vs. Ag para o biossensor, pico este que não aparece no voltamograma do eletrodo impresso não modificado. Esse pico refere-se à redução da HRP imobilizada. Já na presença de peróxido de hidrogênio, esse pico aumenta, mostrando que a redução do H_2O_2 tem origem na HRP imobilizada, e é deslocado para um potencial mais negativo ($-1,0$ V), sugerindo que há a formação de algum novo composto durante o processo redox, como um intermediário do processo eletrocatalítico da HRP (MACHADO, 2015). Dessa forma, o potencial do pico catódico de $-1,0$ V vs. Ag foi selecionado para ser utilizado durante as cronoamperometrias, o qual é condizente com o potencial de pico de $-0,98$ V vs. Ag encontrado por MACHADO (2015), que modificou eletrodos impressos

comerciais com HRP immobilizada em nanofios de titanato. Entretanto, a corrente de pico catódico obtida por MACHADO (2015), na mesma concentração de peróxido de hidrogênio, foi cerca de $-135 \mu\text{A}$, enquanto que a obtida nesse trabalho foi cerca de $-60 \mu\text{A}$. Isso é justificado pelo fato de que MACHADO utilizou nanoestruturas condutoras para imobilizar a enzima, aumentando, assim, a área superficial do eletrodo de trabalho.

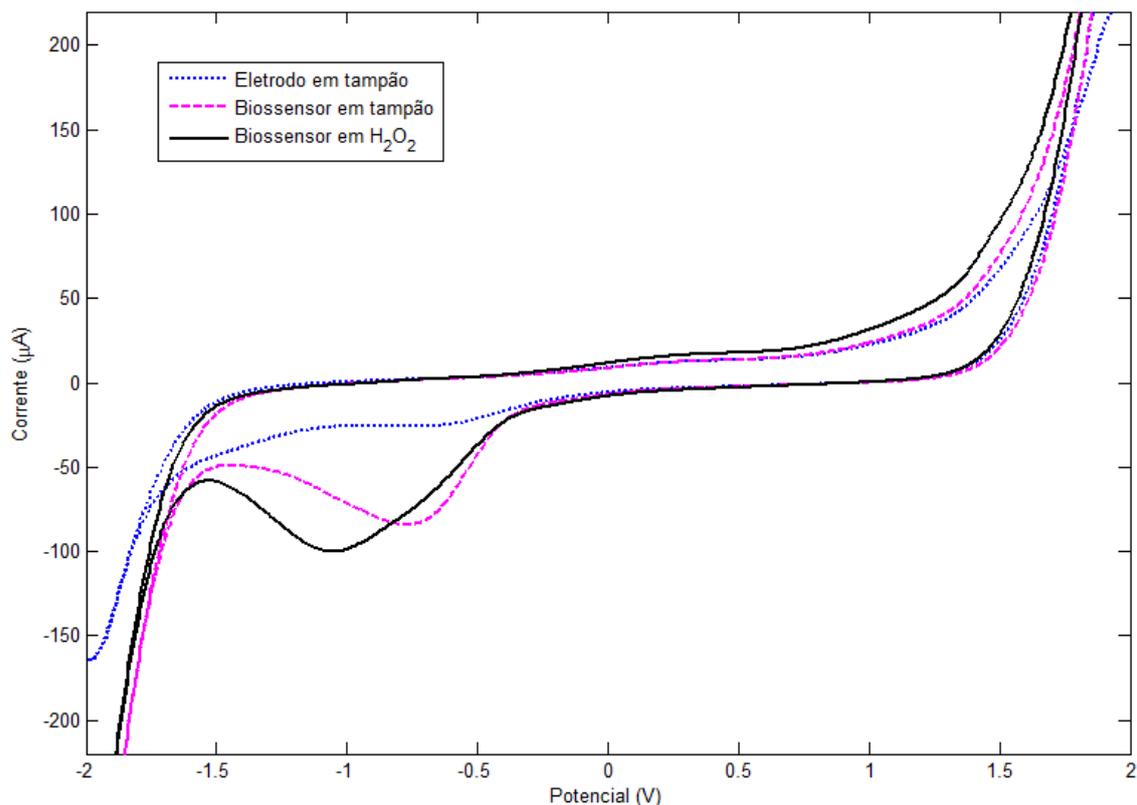


Figura 5.2. Voltamogramas cíclicos para eletrodo não modificado em tampão (linha pontilhada) e para o biossensor baseado em HRP na ausência de H_2O_2 (linha tracejada) e na presença de $0,2 \text{ mM}$ de H_2O_2 (linha contínua).

Na Figura 5.3, são apresentados os voltamogramas cíclicos para o eletrodo impresso não modificado em tampão PBS $0,1 \text{ M}$ pH $7,0$, e para o biossensor (eletrodo modificado com GOx/Mediador/Nafion[®]) em ausência e em presença de 5 mM de glicose. No voltamograma do biossensor em tampão (linha tracejada), pode ser observado um pico de redução em torno de $-0,6 \text{ V vs. Ag}$, referente à redução da forma oxidada do mediador pelo recebimento de elétrons provenientes do eletrodo. Como a reação de oxirredução $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ é reversível, com o aumento do

potencial, nota-se o aparecimento de um pico de oxidação em torno de 0,2 V vs. Ag, o qual se refere à reoxidação do mediador na superfície do eletrodo.

Na presença de glicose, ocorre a oxidação desse analito pela glicose oxidase, a qual é, por consequência, reduzida. Assim, a forma reduzida da enzima é reoxidada pela forma oxidada do mediador, que, por sua vez, é reduzido. Por isso, a concentração da forma oxidada do mediador diminui, o que faz com que uma menor quantidade de mediador seja reduzida na superfície do eletrodo e, portanto, o pico de redução do biossensor em glicose (linha contínua) é diminuído. Por outro lado, o pico de oxidação, na presença de glicose, aumenta significativamente, já que a concentração da forma reduzida do mediador aumenta. Dessa forma, o potencial do pico anódico de 0,2 V vs. Ag foi utilizado para a realização das cronoamperometrias dos biossensores baseados em GOx.

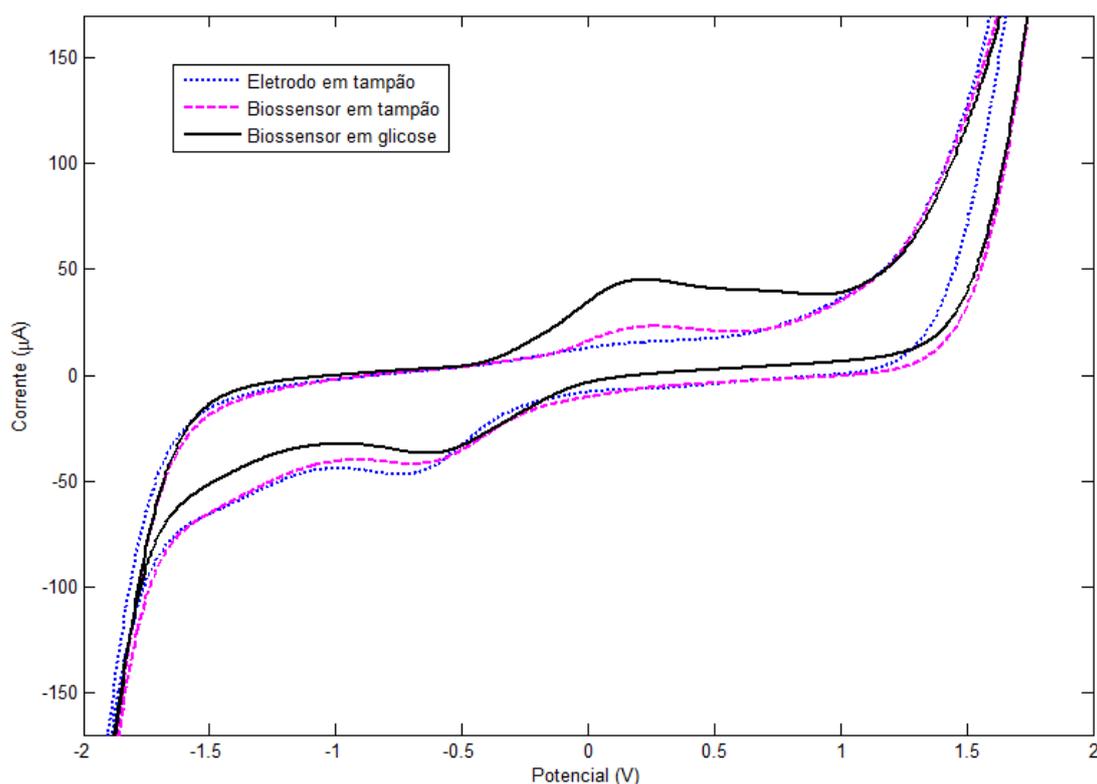


Figura 5.3. Voltamogramas cíclicos para eletrodo não modificado em tampão (linha pontilhada) e para o biossensor baseado em GOx na ausência de glicose (linha tracejada) e na presença de 5 mM de glicose (linha contínua).

5.3. Convergência de Malha

Foram testados diferentes números de pontos de interpolação (n_p) e de elementos finitos (n_e) para a discretização das equações diferenciais parciais do modelo pelo método da colocação ortogonal em elementos finitos para os biossensores de terceira geração e verificou-se que com 5 pontos de interpolação e 4 elementos finitos os resultados já estão suficientemente acurados, já que aumentando n_p para 10 e n_e para 8, observa-se que o perfil temporal da corrente não é alterado, conforme mostrado na Figura 5.4. Testou-se também o uso do método de colocação ortogonal ($n_p = 10$), mas isso acarretou em falsas oscilações em tempos iniciais, observadas para a curva pontilhada nessa figura, pois a aproximação de uma curva como esta, que tem o formato de uma resposta de primeira ordem com tempo morto, por um polinômio de alto grau, tende a gerar falsas oscilações na região que antecede a subida.

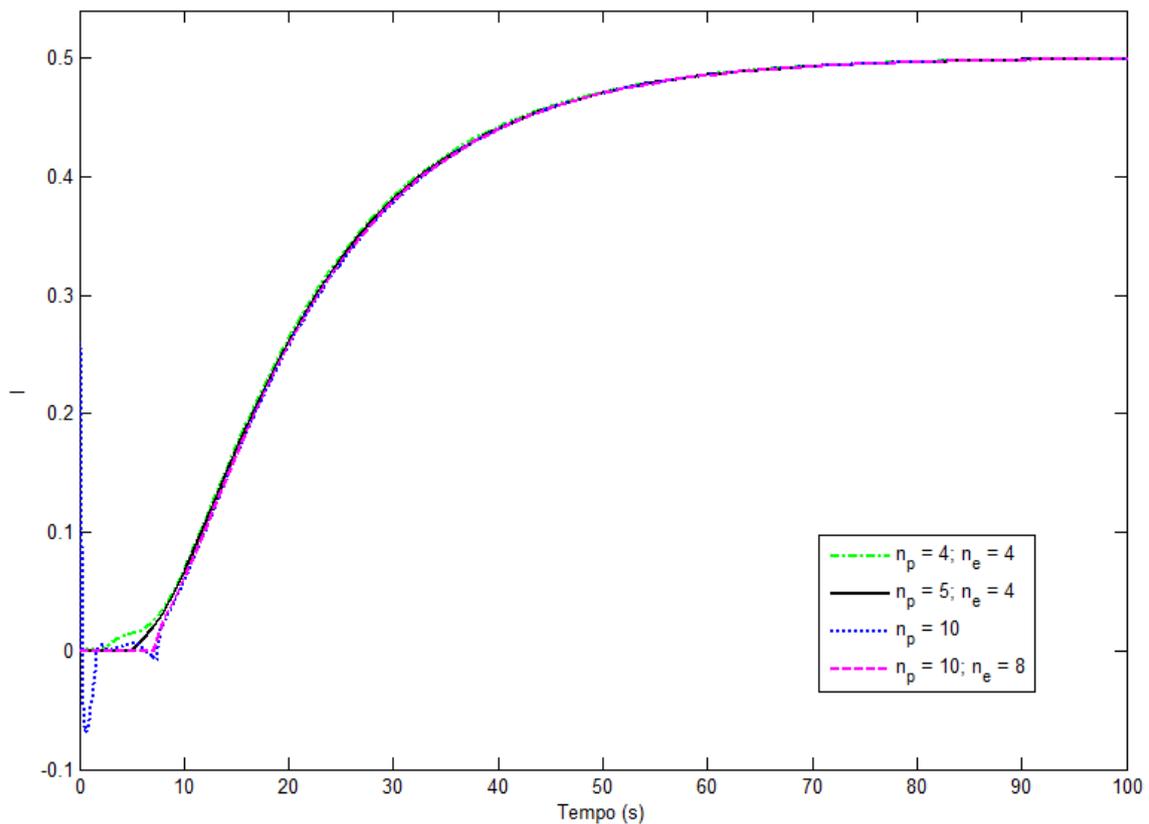


Figura 5.4. Corrente adimensional em função do tempo para diferentes números de pontos de interpolação e de elementos finitos.

O método da colocação ortogonal foi utilizado para a discretização das equações diferenciais parciais do modelo para biossensores de segunda geração e foi constatado que a malha converge com 7 pontos de interpolação, como mostrado na Figura 5.5.

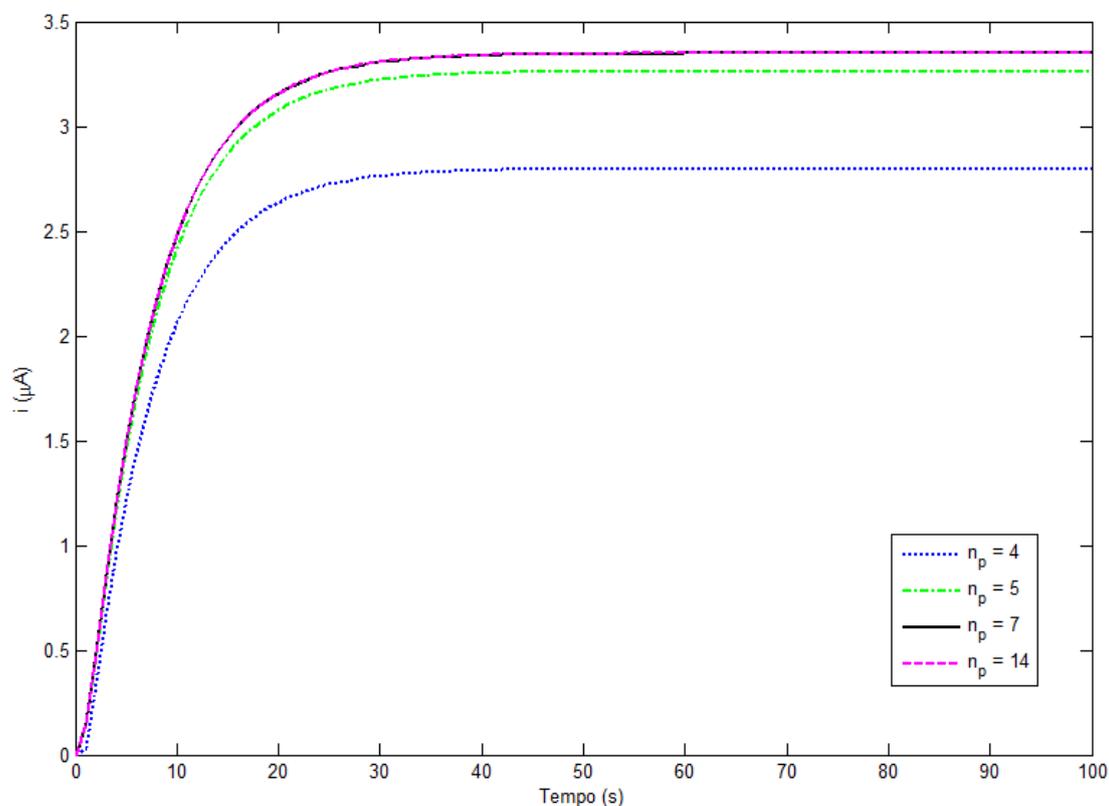


Figura 5.5. Corrente de resposta em função do tempo para diferentes números de pontos de interpolação utilizados na colocação ortogonal.

Dessa forma, as soluções numéricas dos modelos, para as malhas já convergidas, foram obtidas utilizando as especificações contidas na Tabela 5.1, em que $\hat{\alpha}$ e $\hat{\beta}$ são os parâmetros da função peso do polinômio de Jacobi, n_p é o número de pontos utilizados na interpolação e n_e é o número de elementos finitos utilizados.

Tabela 5.1. Especificações para as soluções numéricas

Especificação	Modelo para biossensores de 3 ^a	Modelo para biossensores de 2 ^a
	geração	geração
$\hat{\alpha}$	0	0
$\hat{\beta}$	0	0
n_p	5	7
n_e	4	-

5.4. Biossensores Amperométricos de Terceira Geração

5.4.1. Estimação de parâmetros

Os parâmetros do modelo adimensional foram estimados utilizando os dados experimentais obtidos pelas cronoamperometrias dos três primeiros experimentos (réplicas), cujas condições experimentais estão evidenciadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Condições experimentais dos três primeiros experimentos com biossensores baseados em HRP

Concentração de HRP no biossensor (mol/m^3)	0,01777
Concentração de atividade enzimática no biossensor (U/mL)	664,07
Espessura do filme polimérico (m)	$2,595 \times 10^{-6}$

A cronoamperometria consiste de uma técnica eletroquímica na qual se aplica um potencial constante e monitora-se a corrente resultante do processo redox que ocorre entre a enzima e o analito em função do tempo. Dessa forma, fixou-se o potencial em $-1,0$ V e foram feitas adições sucessivas de H_2O_2 0,02 M em determinados intervalos de tempo. Na Figura 5.6, podem ser observadas as cronoamperometrias dos três primeiros experimentos (curvas vermelhas), nas quais cada degrau se refere a uma adição de H_2O_2 . Portanto, a partir das cronoamperometrias, além de ser possível obter a corrente em função do tempo, também se pode obter a corrente, em cada estado estacionário, em função da concentração do analito em solução, ou seja, é possível construir a curva analítica do biossensor. As curvas analíticas de todos os biossensores utilizados nesse trabalho podem ser visualizadas no Anexo A.

Analisando a Figura 5.6, notam-se discrepâncias entre as cronoamperometrias obtidas. Isso se deve ao fato de que, no terceiro experimento, foram feitas adições de 80 μL de H_2O_2 0,02 M, enquanto que, nos dois primeiros, as adições foram de 40 μL . Já as diferenças entre as cronoamperometrias obtidas nos dois primeiros experimentos se devem ao fato de que as adições de H_2O_2 0,02 M foram realizadas em tempos diferentes. Para esses três experimentos, a máxima concentração de substrato na qual a resposta amperométrica do biossensor se manteve linear, $[S]_{\infty_{ref}}$, foi de 0,8 mM.

A Figura 5.6 também mostra o ajuste do modelo aos dados experimentais e, como pode ser observado, o modelo proposto foi capaz de descrever o comportamento dos biossensores de terceira geração, o que é comprovado pelo coeficiente de determinação e pela significância, contidos na Tabela 5.3, os quais apresentam valores muito próximos de 1.

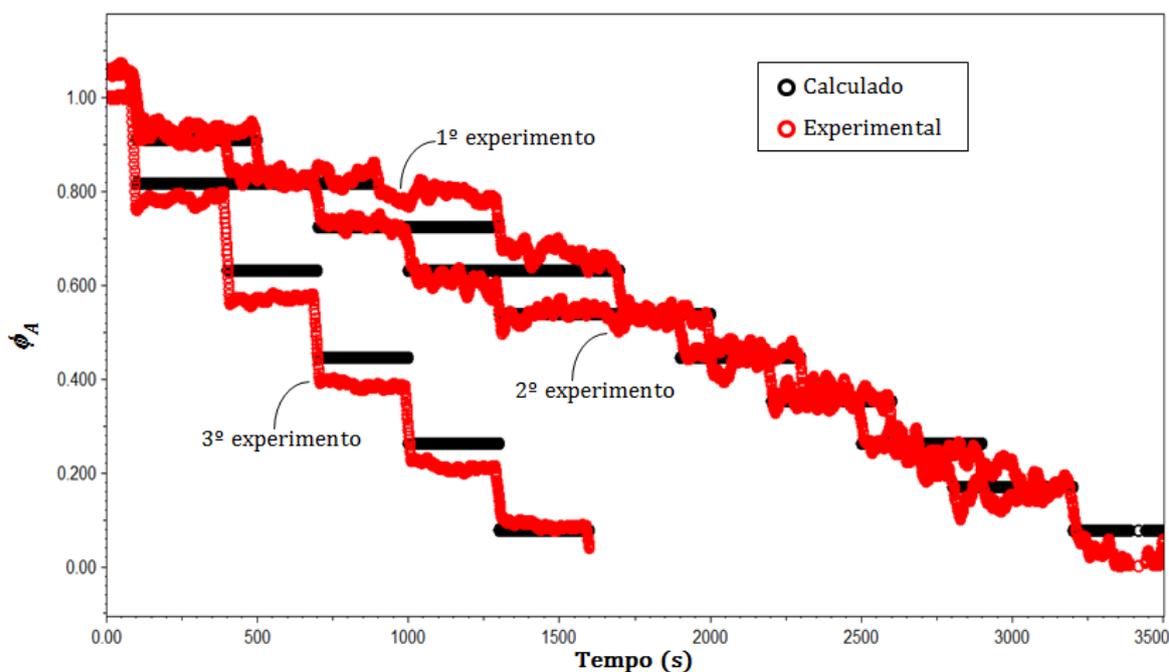


Figura 5.6. Ajuste do modelo para biossensores de terceira geração aos dados experimentais.

Tabela 5.3. Informações estatísticas do ajuste do modelo para biossensores de terceira geração aos dados experimentais

Coefficiente de determinação (R^2)	0,9846
Significância	0,9988

A partir das cronoamperometrias dos três primeiros experimentos, foi possível avaliar o tempo de resposta dos biossensores baseados em HRP construídos nesse trabalho. Para isso, foi selecionada aleatoriamente uma adição de H_2O_2 de cada experimento e analisou-se o tempo decorrido desde o momento da adição até o instante em que é atingido o estado estacionário, como mostrado na Figura 5.7. Uma nova variável, ϕ_R , foi definida para normalizar ϕ_A em relação à amplitude da resposta entre os

estados estacionários $k - 1$ (estado estacionário anterior à adição) e k (estado estacionário atingido após a adição). Dessa forma, ϕ_R é dada pela seguinte equação:

$$\phi_R = \frac{\phi_A - \phi_{A_k}}{\phi_{A_{k-1}} - \phi_{A_k}} \quad 5.2$$

Em que $\phi_{A_{k-1}}$ e ϕ_{A_k} são os valores de ϕ_A no estado estacionário $k - 1$ e k , respectivamente.

Analisando a Figura 5.7, pode-se perceber que o tempo de resposta dos biossensores baseados em HRP construídos nesse trabalho é cerca de 13 segundos, o que mostra que os biossensores preparados apresentam uma resposta rápida, característica sempre perseguida no desenvolvimento de um biossensor.

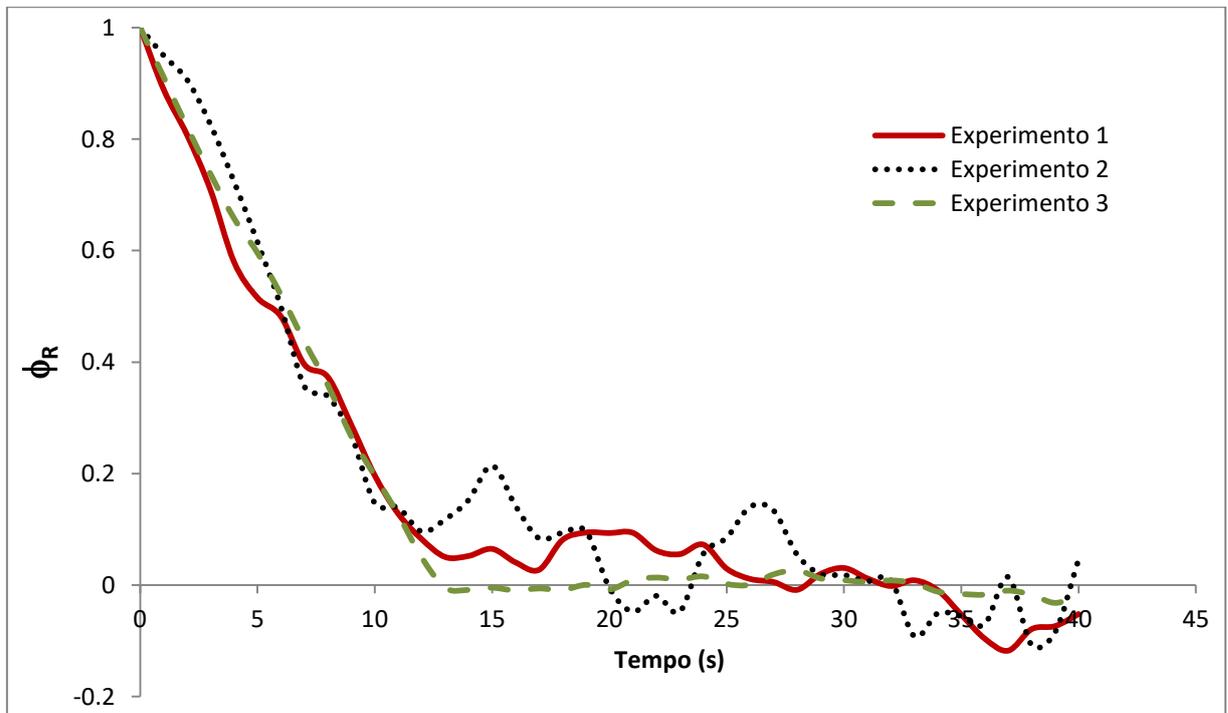


Figura 5.7. Tempo de resposta dos biossensores baseados em HRP.

Na Tabela 5.4, são mostrados os valores dos parâmetros estimados, seus intervalos de confiança e suas significâncias. Os valores unitários das significâncias refletem a qualidade desses parâmetros. Na Tabela 5.5, são apresentados os valores para os demais parâmetros do modelo adimensional, os quais foram calculados a partir dos parâmetros estimados.

Tabela 5.4. Valores dos parâmetros estimados

Parâmetro	Valor	Significância
μ	$1,05 \times 10^7 \pm 2,24 \times 10^4$	1
κ_2^2	$0,00939 \pm 0,00002$	1
τ_1 (s)	$1,5094 \pm 0,8352$	1
τ_2 (s)	$0,01161 \pm 0,00114$	1
τ_3 (s)	$20,4211 \pm 2,0208$	1
α	$0,0654 \pm 0,0001$	1

Tabela 5.5. Valores dos parâmetros adimensionais calculados

Parâmetro	Valor
γ	5968,53
κ_1^2	$9,86 \times 10^4$

Observa-se que a constante de tempo obtida pelas cronoamperometrias, Figura 5.7, que leva em conta a interação entre todas as variáveis de estado, é inferior à maior constante de tempo estimada e superior à menor constante de tempo das variáveis de estado (Tabela 5.4), provendo, portanto, significado físico para as constantes de tempo estimadas.

A partir dos parâmetros do modelo adimensional, foi possível calcular os valores dos parâmetros do modelo dimensional, os quais são mostrados na Tabela 5.6, e que foram usados nas simulações posteriores. Como pode ser observado, $k_{-1} \ll k_1$, mostrando que a reação da HRP com o peróxido de hidrogênio é praticamente irreversível. Além disso, pode-se perceber que apenas uma pequena fração ($\alpha = 0,0654$) da quantidade total de enzima presente no biossensor está em contato direto com o eletrodo, evidenciando a importância do uso de um método de imobilização que leve à formação de uma monocamada orientada para que não haja desperdício de enzima. Ademais, como pode ser notado, $\kappa_1^2 \gg 1$, o que indica que o processo é limitado pela difusão, e não pela cinética enzimática, o que, segundo estudos encontrados na literatura (BARONAS *et al.*, 2012; RACINE & MINDT, 1971), é algo vantajoso, pois aumenta a faixa linear do biossensor.

Tabela 5.6. Valores dos parâmetros dimensionais calculados

Parâmetro	Valor	Unidade
D_S	$4,46 \times 10^{-12}$	m^2/s
k_1	$3,67 \times 10^6$	$m^3/(mol s)$
k_{-1}	0,04897	s^{-1}
k_2	86,098	s^{-1}
K_S	0,17489	

5.4.2. Validação do modelo

Com a finalidade de validar o modelo para biossensores de terceira geração, foram utilizadas as cronoamperometrias obtidas nos experimentos 4 a 8, cujas condições experimentais estão expostas na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Condições experimentais dos experimentos 4 a 8 com biossensores baseados em HRP

Experimento	4	5	6	7	8
Concentração de HRP no biossensor (mol/m^3)	0,0157	0,0261	0,0432	0,0691	0,0756
Concentração de atividade enzimática no biossensor (U/mL)	98,44	857,25	219,78	1450,01	1728,15
Espessura do filme polimérico* (μm)	5,525	2,123	6,445	4,312	3,779

* Calculada pela equação 5.1.

Dessa forma, foram realizadas simulações utilizando tais condições e os resultados foram comparados com os dados experimentais. Conforme pode ser verificado pelas Figuras 5.8 a 5.12, os resultados simulados apresentaram boa concordância com os dados experimentais, o que é comprovado pelos coeficientes de determinação apresentados na Tabela 5.8. Portanto, o modelo para biossensores de terceira geração foi validado com sucesso.

Nota-se que a cronoamperometria do experimento 8 não apresentou degraus bem definidos, o que poderia ser justificado pela alta concentração de enzima no biossensor. Assim, há uma maior quantidade de enzima ao longo do filme, a qual estaria interferindo na resposta do biossensor, atrasando a reação do analito com as enzimas eletroquimicamente ativas, comportamento esse que o modelo não conseguiu descrever. Entretanto, como a cronoamperometria do experimento 7, o qual também apresenta uma alta concentração de enzima, não manifestou comportamento semelhante, essa hipótese não pode ser ratificada. Dessa forma, uma explicação plausível para o perfil anormal da cronoamperometria do experimento 8 seria um possível erro experimental durante o preparo do biossensor.

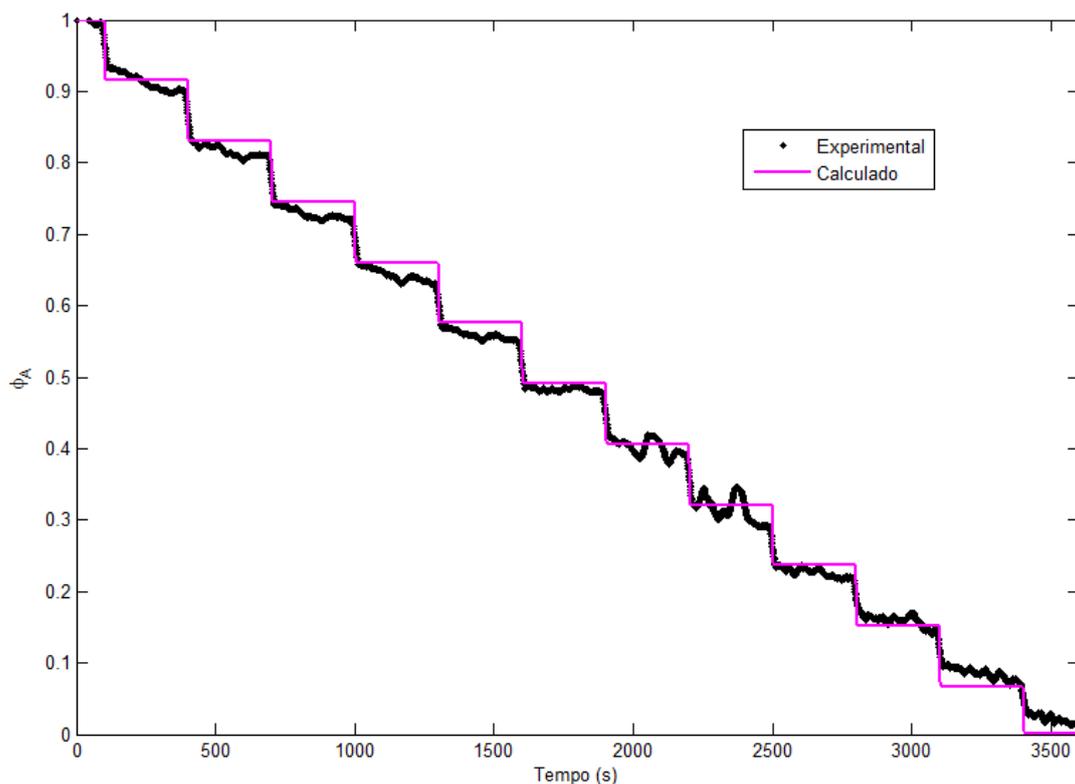


Figura 5.8. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 4 com biossensor baseado em HRP.

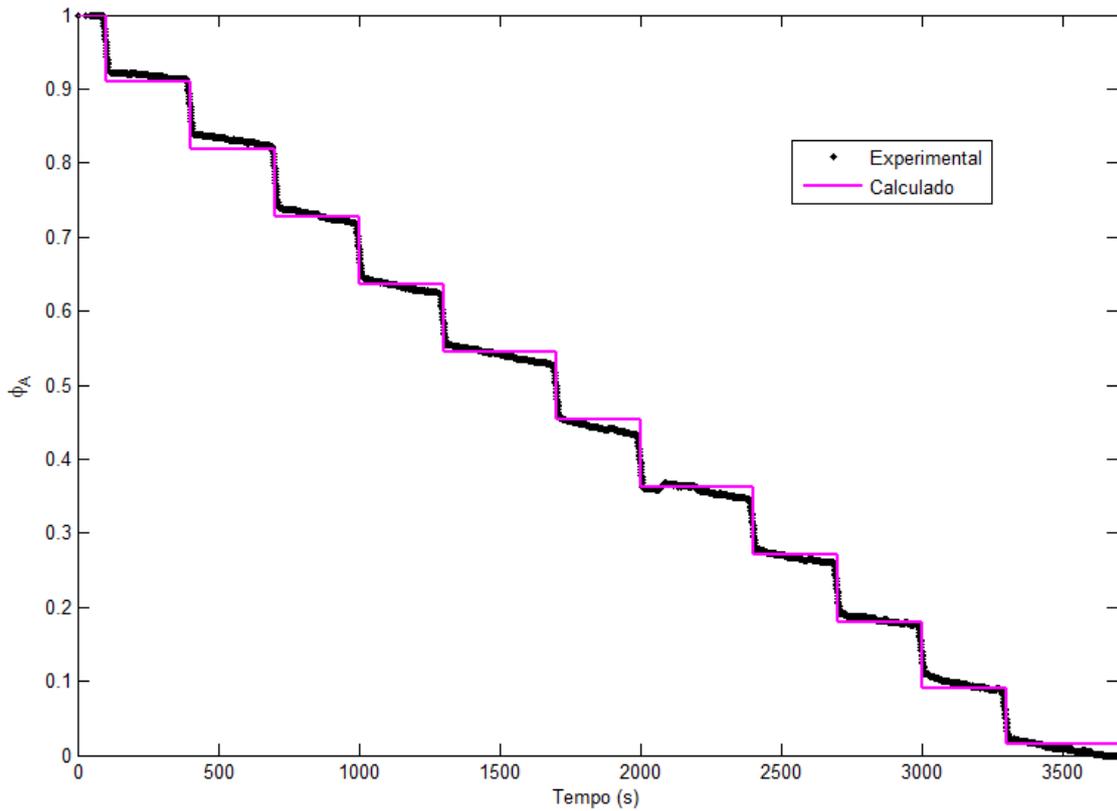


Figura 5.9. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 5 com biossensor baseado em HRP.

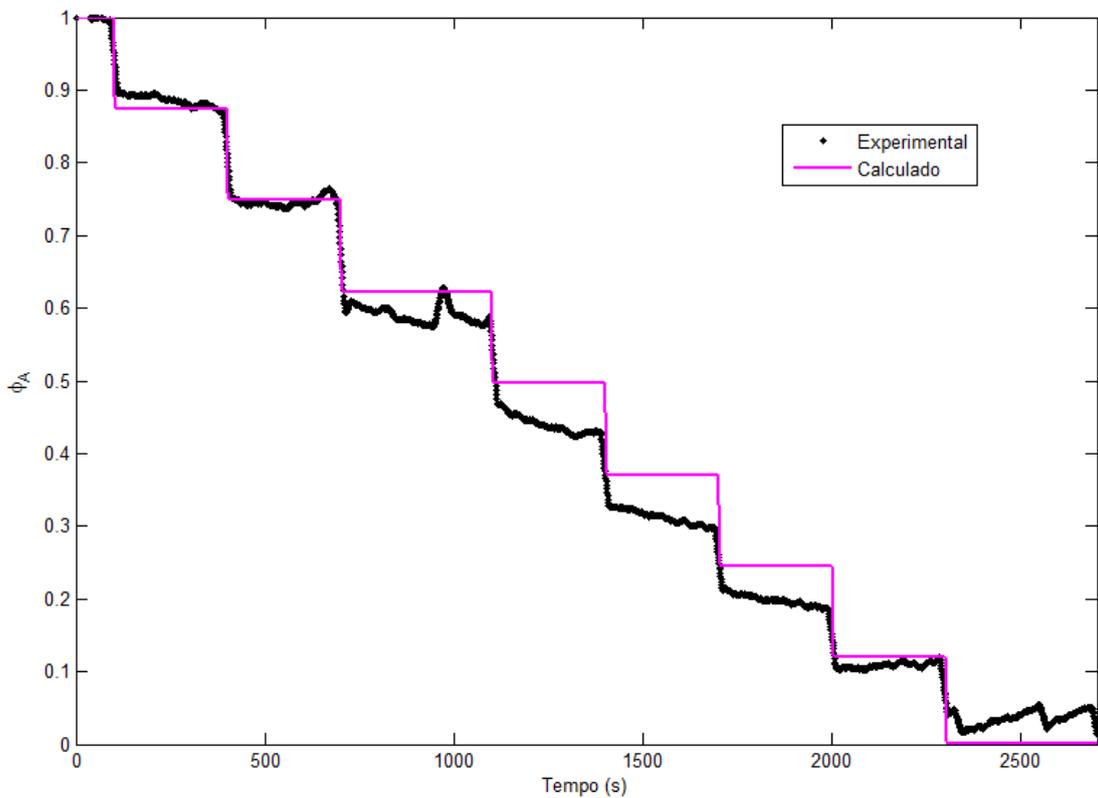


Figura 5.10. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 6 com biossensor baseado em HRP.

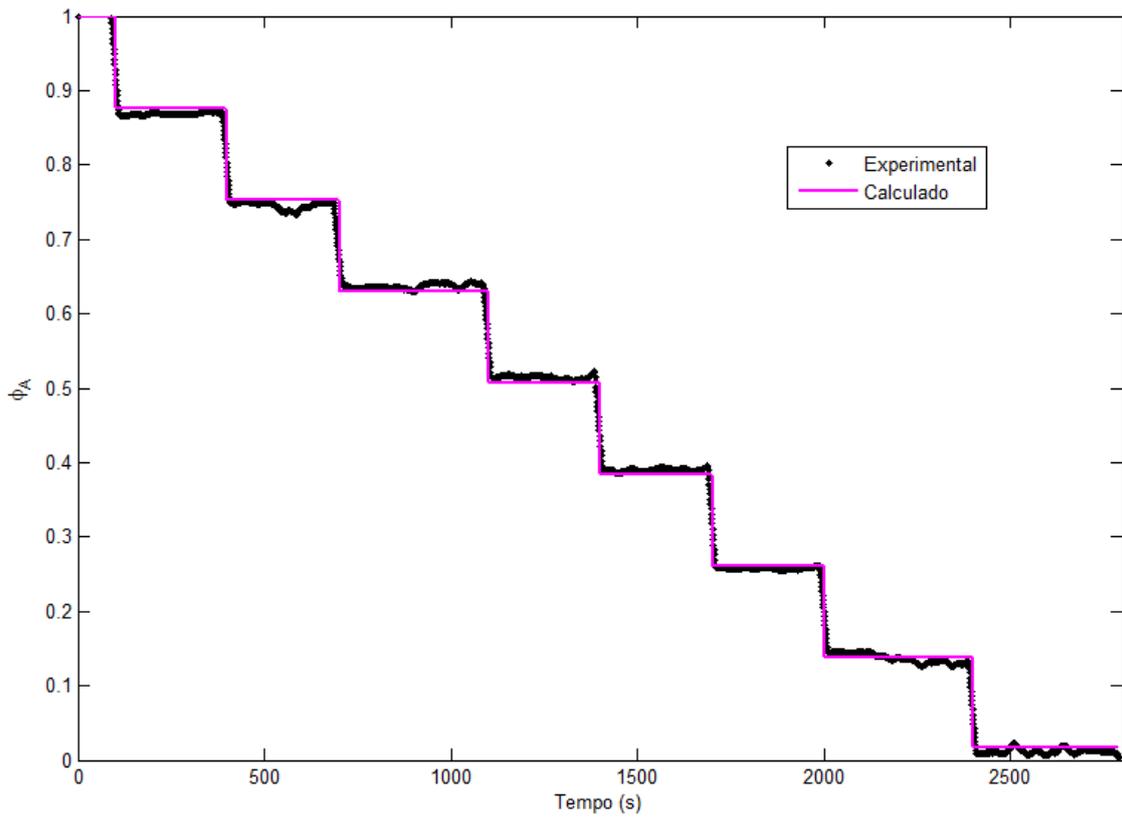


Figura 5.11. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 7 com biossensor baseado em HRP.

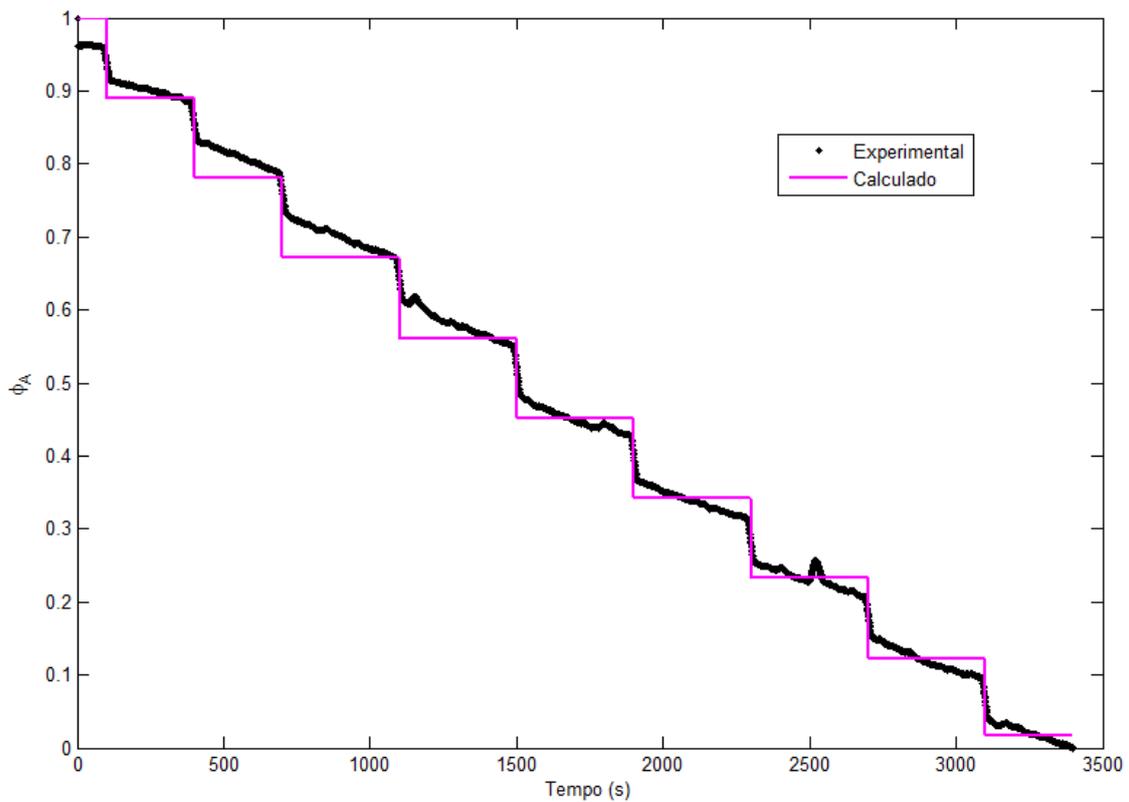


Figura 5.12. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 8 com biossensor baseado em HRP.

Tabela 5.8. Coeficientes de determinação do modelo do biossensor de terceira geração para os conjuntos de dados experimentais usados na validação

Experimento	Coefficiente de determinação (R^2)
4	0,9976
5	0,9986
6	0,9775
7	0,9989
8	0,9841

5.4.3. Análises de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores

Simulações foram realizadas utilizando o modelo proposto para biossensores de terceira geração. Na Figura 5.13, é apresentado o perfil de concentração de substrato em função do tempo e da posição no filme polimérico e, como pode ser observado, o sistema está em regime difusivo, o que também pode ser verificado pelo alto valor de κ_1^2 obtido pela estimação de parâmetros. Além disso, pode-se perceber que o perfil de concentração de substrato no estado estacionário trata-se de um perfil puramente difusivo (linear), indicando que não há mais reação do substrato com as enzimas presentes ao longo do filme, já que as enzimas que não estão em contato direto com o eletrodo só podem retornar à sua forma reduzida pela reação reversa, o que não ocorre, pois $k_{-1} \ll k_1$, fazendo com que essas enzimas permaneçam na sua forma oxidada, não podendo reagir novamente com o substrato. Dessa forma, no estado estacionário, o substrato simplesmente se difunde ao longo do filme e, ao atingir a superfície do eletrodo, $\chi = 0$, reage com as enzimas eletroquimicamente ativas.

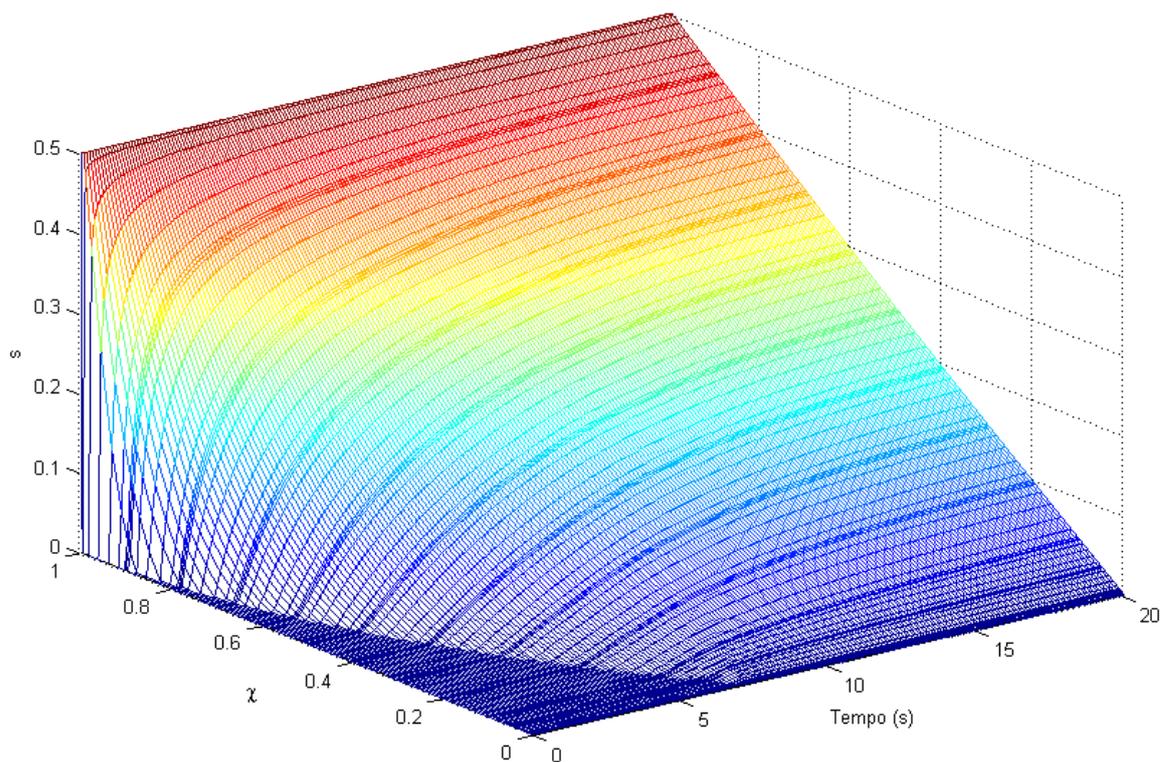


Figura 5.13. Perfil de concentração de substrato adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $[E_T] = 0,05 \text{ mM}$, $L = 15 \text{ }\mu\text{m}$ e $\alpha = 0,0654$.

Com o propósito de avaliar o efeito da concentração total de enzima, da espessura do filme e da fração molar de enzima eletroquimicamente ativa na resposta dos biossensores de terceira geração, foram realizadas as análises de sensibilidade via construção das superfícies de resposta simulada. Para isso, primeiramente, foi definida uma nova variável, B_S , para representar a sensibilidade do biossensor, a qual é definida como a variação da corrente de resposta estacionária em relação à variação da concentração de analito em solução, conforme a equação abaixo:

$$B_S = \frac{di_{ss}}{d[S]_{\infty}} \quad 5.3$$

Na qual i_{ss} trata-se da corrente de resposta estacionária e $[S]_{\infty}$ é a concentração do substrato em solução.

As Figuras 5.14 e 5.15 apresentam as superfícies de resposta obtidas e, como pode ser verificado, os aumentos da concentração total de enzima e da fração molar de enzima eletroquimicamente ativa aumentam a sensibilidade do biossensor, já que há mais enzima disponível para reagir com o substrato na superfície do eletrodo, ser regenerada e, assim, gerar a corrente. Portanto, quanto mais enzima presente na superfície do eletrodo, maior será a corrente gerada. Além disso, pode-se observar que o

aumento da espessura do filme polimérico diminui a sensibilidade do biossensor, pois aumenta a resistência à transferência de massa, reduzindo a concentração de substrato na superfície do eletrodo e, assim, diminuindo a corrente gerada.

Por fim, tomando como base os resultados das análises de sensibilidade, foi realizada a otimização do desempenho dos biossensores de terceira geração, através da maximização de B_S , tendo como variáveis de decisão a concentração total de enzima ($[E_T]$), a espessura do filme (L) e a fração molar de enzima eletroquimicamente ativa (α), as quais foram sujeitas às seguintes restrições:

$$0,01 \text{ mM} \leq [E_T] \leq 0,5 \text{ mM} \quad 5.4$$

$$0,01 \leq \alpha \leq 1 \quad 5.5$$

$$L \geq 1 \text{ } \mu\text{m} \quad 5.6$$

A concentração total de enzima foi restrita a valores menores que 0,5 mM, pois concentrações muito altas de enzima se tornam inviáveis, devido ao alto custo das enzimas.

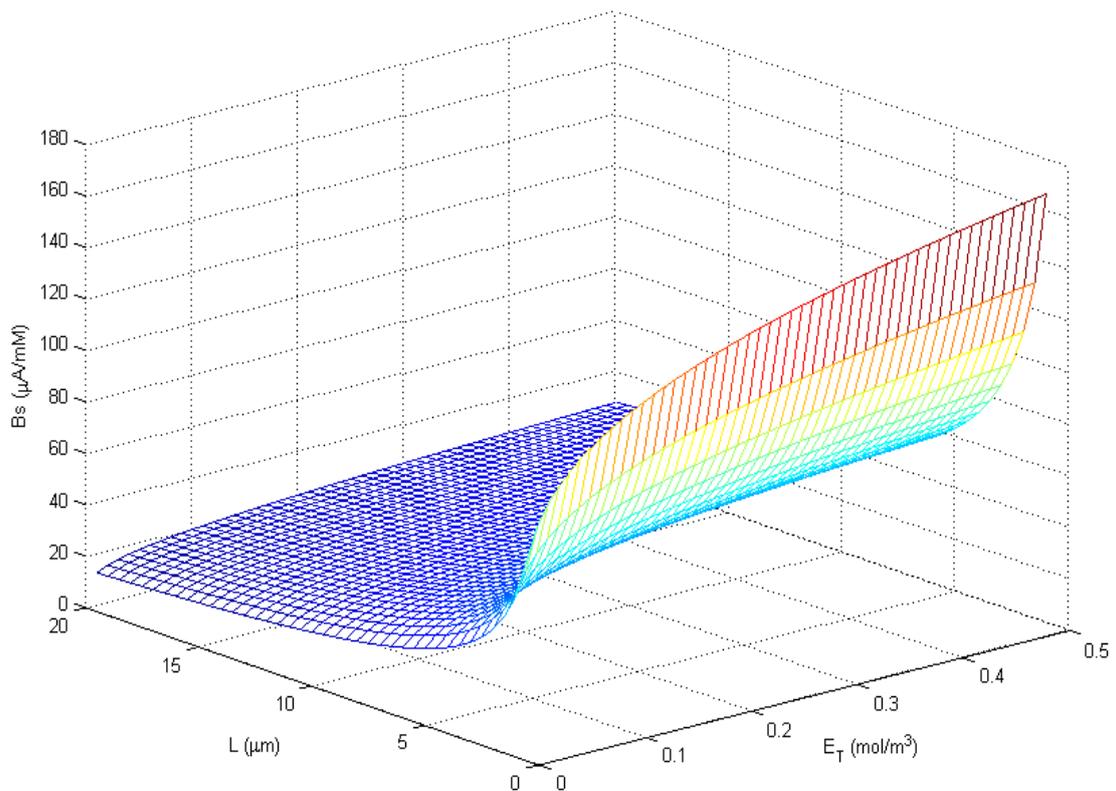


Figura 5.14. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de terceira geração em função da espessura do filme e da concentração total de enzima. $\alpha = 0,0654$.

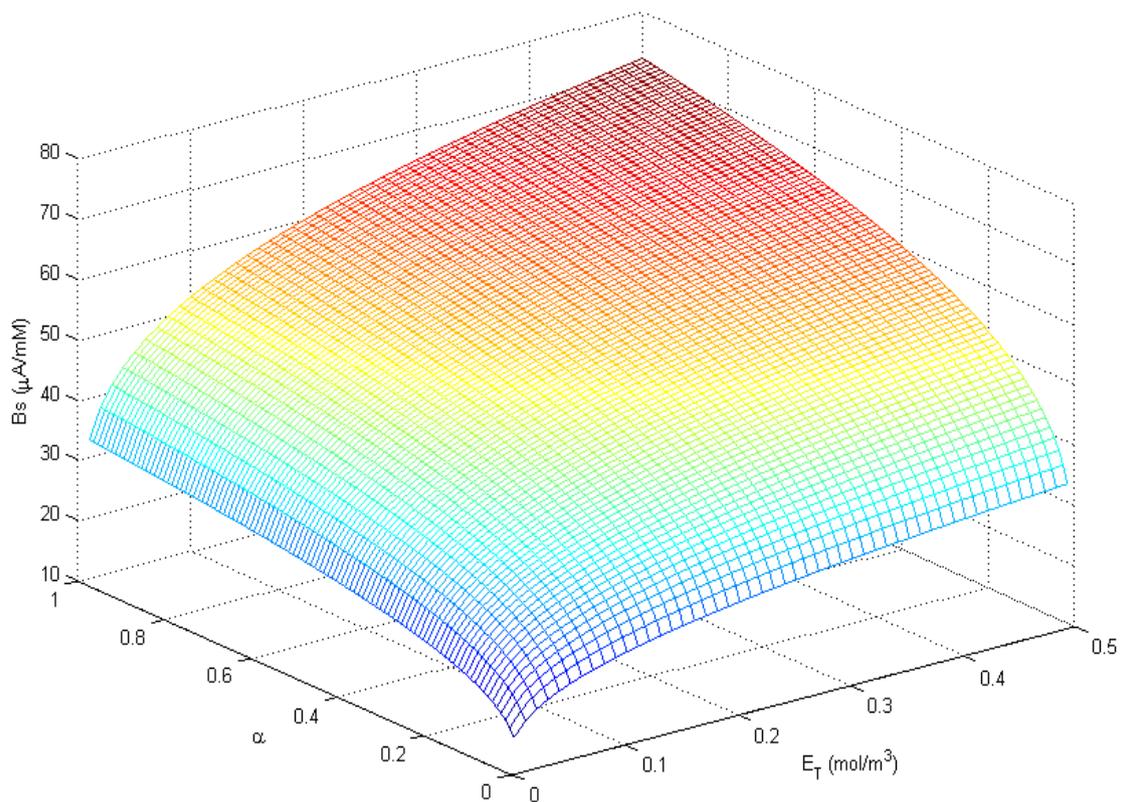


Figura 5.15. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de terceira geração em função da fração de enzima eletroquimicamente ativa e da concentração total de enzima. $L = 10 \mu m$.

Os resultados da otimização são apresentados na Tabela 5.9, na qual estão contidos os valores obtidos para as variáveis de decisão e para a função objetivo (B_S). Como já era esperado, foram encontrados altos valores para $[E_T]$ e α , e um baixo valor para L , todos próximos às restrições estabelecidas, as quais não puderam ser alcançadas devido ao método de otimização utilizado. Dessa forma, foi realizada uma simulação com $[E_T] = 0,5 \text{ mM}$, $L = 1 \mu m$ e $\alpha = 1$, e, com isso, obteve-se uma sensibilidade de $286,98 \mu A/mM$.

Tabela 5.9. Resultados da otimização do desempenho de biossensores de terceira geração

Variável	Valor	Unidade
$[E_T]$	0,4583	mol/m^3
L	1,004	μm
α	0,9997	-
B_S	281,28	$\mu A/mM$

Portanto, tanto a análise de sensibilidade quanto a otimização realizada mostraram que, quanto mais enzima presente na superfície do eletrodo e quanto menor for a espessura do filme polimérico, maior será a sensibilidade do biossensor.

Entretanto, com essa concentração de enzima não seria possível a formação de uma monocamada na superfície de um eletrodo com área superficial de $0,071 \text{ cm}^2$ (área dos eletrodos utilizados nesse trabalho). Logo, para esse caso, $[E_T] = 0,5 \text{ mM}$ e $\alpha = 1$ seria um cenário inviável. Em vista disso, uma maneira de tornar tal cenário viável, seria o aumento da área superficial do eletrodo de trabalho, o que pode ser feito através da imobilização das enzimas em nanoestruturas condutoras, as quais apresentam uma grande área superficial. Assim, o eletrodo de trabalho pode ser modificado com esses nanomateriais, nos quais a enzima foi imobilizada (MACHADO, 2015, NICOLINI, 2013), ou o próprio eletrodo de trabalho pode ser construído com essas nanoestruturas (BARONAS *et al.*, 2012).

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que um biossensor de terceira geração com desempenho ótimo é aquele no qual foram utilizadas nanoestruturas condutoras, nas quais a enzima fora imobilizada de tal modo que foi formada uma monocamada orientada.

5.5. Biossensores amperométricos de segunda geração

5.5.1. Estimação de parâmetros

A Tabela 5.10 apresenta as condições experimentais dos três primeiros experimentos (réplicas) com biossensores baseados em GOx, cujas cronoamperometrias foram utilizadas para a estimação dos parâmetros do modelo adimensional.

Tabela 5.10. Condições experimentais dos três primeiros experimentos com biossensores baseados em GOx

Concentração de GOx no biossensor (mol/m^3)	0,01168
Concentração de atividade enzimática no biossensor (U/mL)	183,09
Concentração de mediador no biossensor (mol/m^3)	40
Espessura do filme polimérico (m)	$2,782 \times 10^{-6}$

Para a realização das cronoamperometrias, fixou-se o potencial em 0,2 V e foram feitas adições sucessivas de glicose 0,1 M. Na Figura 5.16, são apresentadas as cronoamperometrias dos três primeiros experimentos (curvas vermelhas), nas quais cada degrau se refere a uma adição de glicose.

Como pode ser observado na Figura 5.16, as cronoamperometrias obtidas nos três experimentos se sobrepõem, já que, para os três, foram feitas adições de 80 μL de glicose 0,1 M nos mesmos instantes de tempo. Para esses experimentos, a máxima concentração de glicose na qual a resposta amperométrica do biossensor se manteve linear, $[S]_{\infty,ref}$, foi de 8,8 mM.

Analisando a Figura 5.16, na qual é mostrado o ajuste do modelo aos dados experimentais, nota-se que o modelo desenvolvido foi capaz de descrever o comportamento dos biossensores de segunda geração, o que é comprovado pelo coeficiente de determinação e pela significância, contidos na Tabela 5.11, os quais apresentam valores muito próximos a 1.

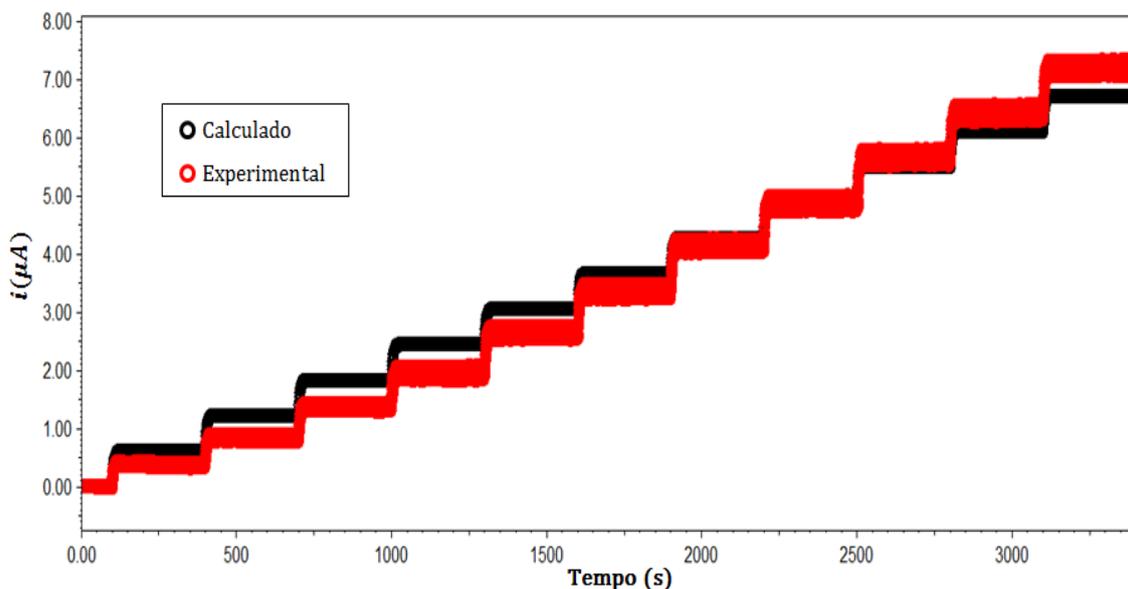


Figura 5.16. Ajuste do modelo para biossensores de segunda geração aos dados experimentais.

Tabela 5.11. Informações estatísticas do ajuste do modelo para biossensores de segunda geração aos dados experimentais

Coefficiente de determinação (R^2)	0,9926
Significância	0,9977

A partir das cronoamperometrias dos três primeiros experimentos, foi possível avaliar o tempo de resposta dos biossensores baseados em GOx construídos nesse trabalho. Para isso, foi selecionada aleatoriamente uma adição de glicose de cada experimento e analisou-se o tempo decorrido desde o momento da adição até o instante em que é atingido o estado estacionário, como apresentado na Figura 5.17. Uma nova variável, i_R , foi definida para normalizar i em relação à amplitude da resposta ente os estados estacionários $k - 1$ (estado estacionário anterior à adição) e k (estado estacionário atingido após a adição). Assim, i_R é dada pela seguinte equação:

$$i_R = \frac{i - i_k}{i_{k-1} - i_k} \quad 5.7$$

Em que i_{k-1} e i_k são os valores de i no estado estacionário $k - 1$ e k , respectivamente.

Através da análise da Figura 5.17, verifica-se que o tempo de resposta dos biossensores baseados em GOx construídos nesse trabalho é cerca de 9 segundos, o que indica que os biossensores preparados apresentam uma resposta rápida, característica sempre perseguida no desenvolvimento de um biossensor.

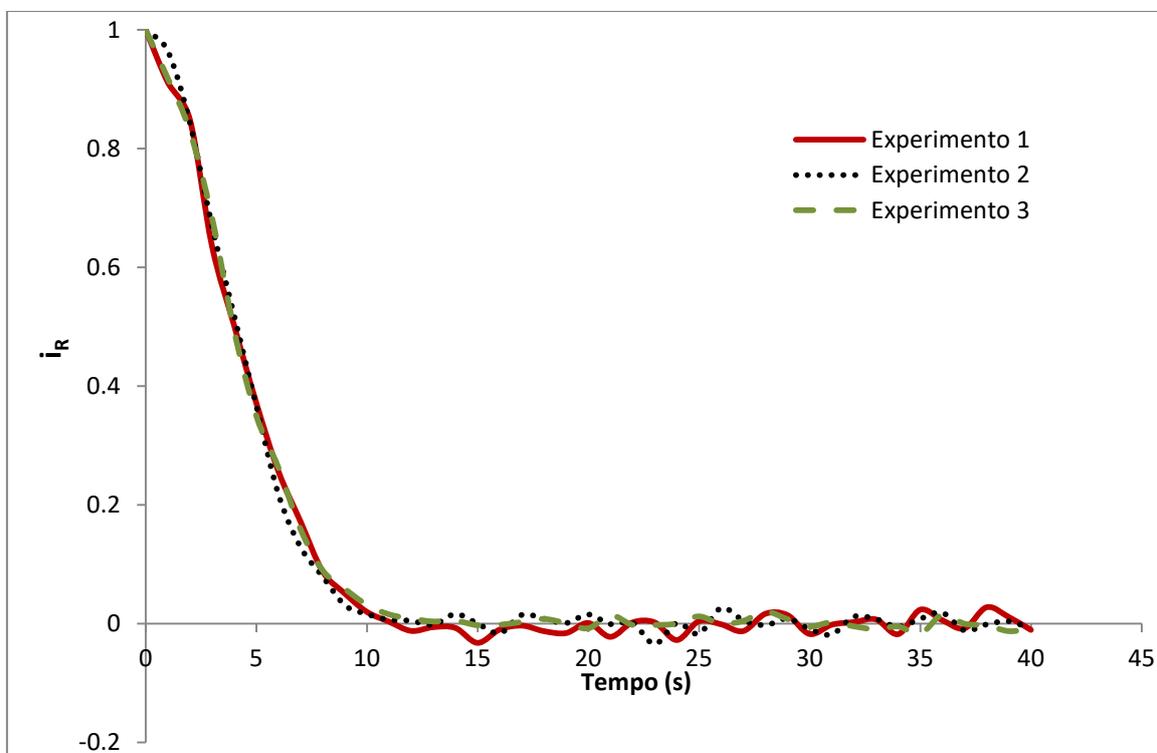


Figura 5.17. Tempo de resposta dos biossensores baseados em GOx.

A Tabela 5.12 apresenta os valores dos parâmetros estimados, seus intervalos de confiança e suas significâncias. Como pode ser observado, os valores das significâncias são iguais a 1, o que reflete a qualidade desses parâmetros. A partir dos parâmetros estimados, foram calculados os valores para os demais parâmetros do modelo adimensional, os quais são mostrados na Tabela 5.13.

Tabela 5.12. Valores dos parâmetros estimados

Parâmetro	Valor	Significância
κ_1^2	$12,8362 \pm 0,0654$	1
κ_2^2	$2,697 \times 10^4 \pm 6,709 \times 10^3$	1
τ_1 (s)	$3,2922 \pm 0,105$	1
τ_2 (s)	$11,2204 \pm 1,6689$	1
τ_3 (s)	$1,838 \times 10^{-3} \pm 4,65 \times 10^{-6}$	1

Tabela 5.13. Valores dos parâmetros calculados

Parâmetro	Valor
γ	$1,513 \times 10^4$
λ (μA)	6,7629

Constata-se que a constante de tempo obtida pelas cronoamperometrias, Figura 5.17, que leva em conta a interação entre todas as variáveis de estado, é inferior à maior e superior à menor constante de tempo estimada das variáveis de estado (Tabela 5.12), provendo, portanto, significado físico para as constantes de tempo estimadas.

Na Tabela 5.14, são apresentados os valores dos parâmetros do modelo dimensional, os quais foram calculados a partir dos parâmetros do modelo adimensional, e que foram usados nas simulações posteriores. O alto valor obtido para k_2 indica que a reoxidação da enzima pelo mediador ocorre rapidamente, fato reportado na literatura (MARTENS & HALL, 1994; PARKER & SCHWARTZ, 1987). Além disso, pelos valores obtidos para κ_1^2 e κ_2^2 , pode-se afirmar que o sistema está em regime difusivo.

Tabela 5.14. Valores dos parâmetros dimensionais calculados

Parâmetro	Valor	Unidade
D_S	$2,35 \times 10^{-12}$	m^2/s
D_M	$6,89 \times 10^{-13}$	m^2/s
k_1	333,872	$m^3/(mol\ s)$
k_2	$2,06 \times 10^5$	$m^3/(mol\ s)$
K_S	0,1852	

5.5.2. Validação do modelo

A Tabela 5.15 apresenta as condições experimentais dos experimentos 4 a 8 com biossensores baseados em GOx, cujas cronoamperometrias foram utilizadas para a validação do modelo proposto para descrever o comportamento de biossensores amperométricos de segunda geração.

Tabela 5.15. Condições experimentais dos experimentos 4 a 8 com biossensores baseados em GOx

Experimento	4	5	6	7	8
Concentração de GOx no biossensor (mol/m^3)	0,0117	0,0117	0,0247	0,0247	0,0247
Concentração de atividade enzimática no biossensor (U/mL)	169,96	165,58	299,07	304,91	320,96
Concentração de mediador no biossensor (mol/m^3)	80	120	40	80	120
Espessura do filme polimérico (μm)*	2,782	2,782	3,650	3,650	3,650

* Calculada pela equação 5.1.

Assim, com o uso de tais condições, foram realizadas simulações e os resultados foram comparados com os dados experimentais (Figuras 5.18 a 5.22). Nota-se que os resultados simulados apresentaram boa concordância com os dados experimentais, fato comprovado pelos coeficientes de determinação contidos na Tabela 5.16. Dessa forma, pode-se concluir que a validação do modelo proposto para biossensores de segunda geração foi realizada com sucesso.

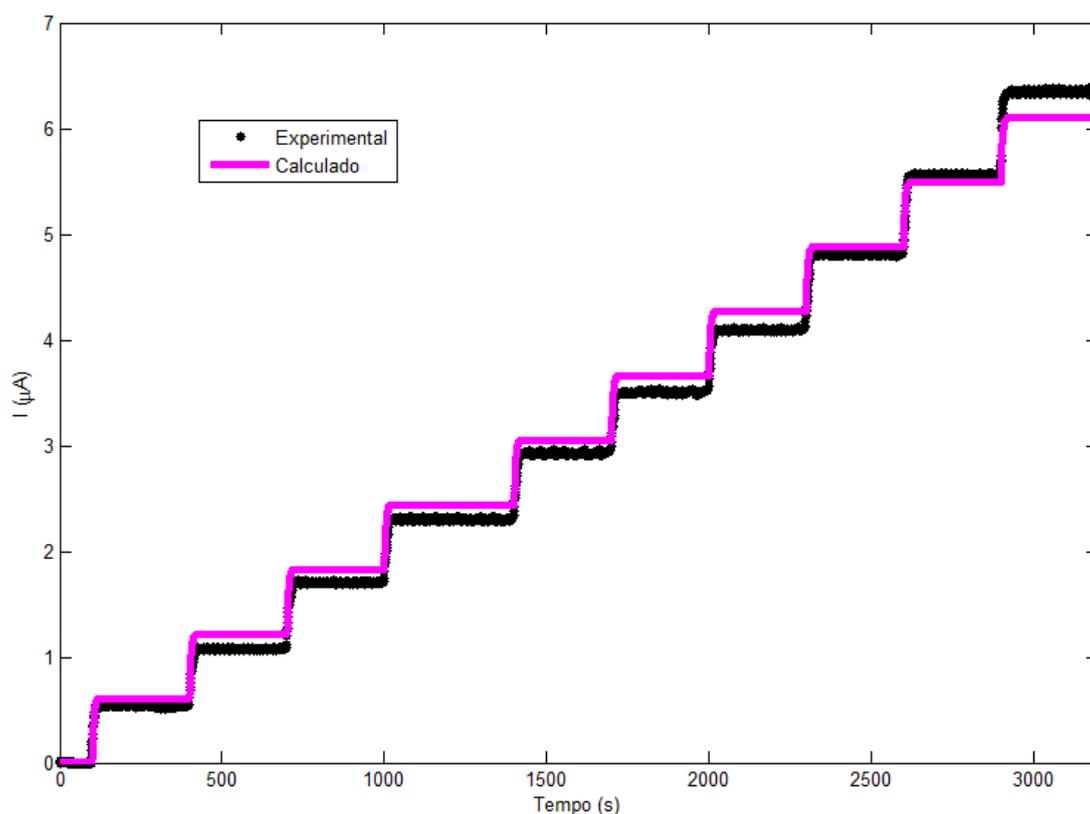


Figura 5.18. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 4 com biossensor baseado em GOx.

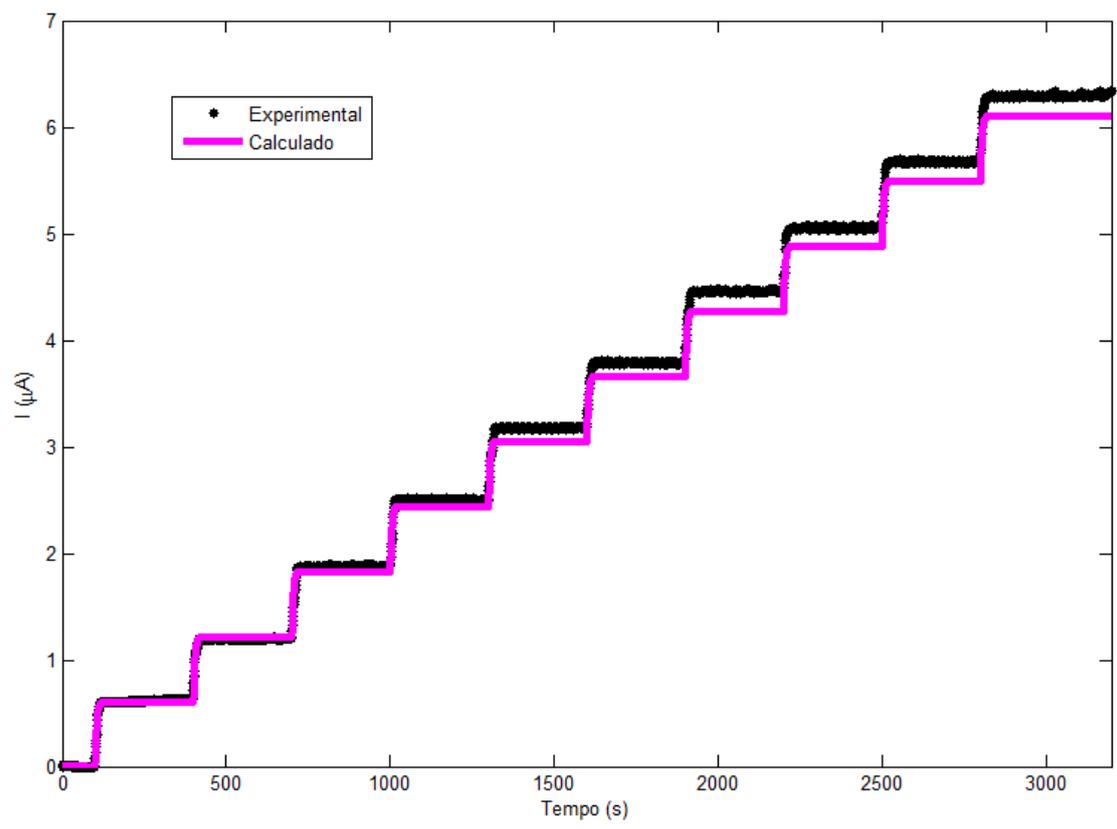


Figura 5.19. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 5 com biossensor baseado em GOx.

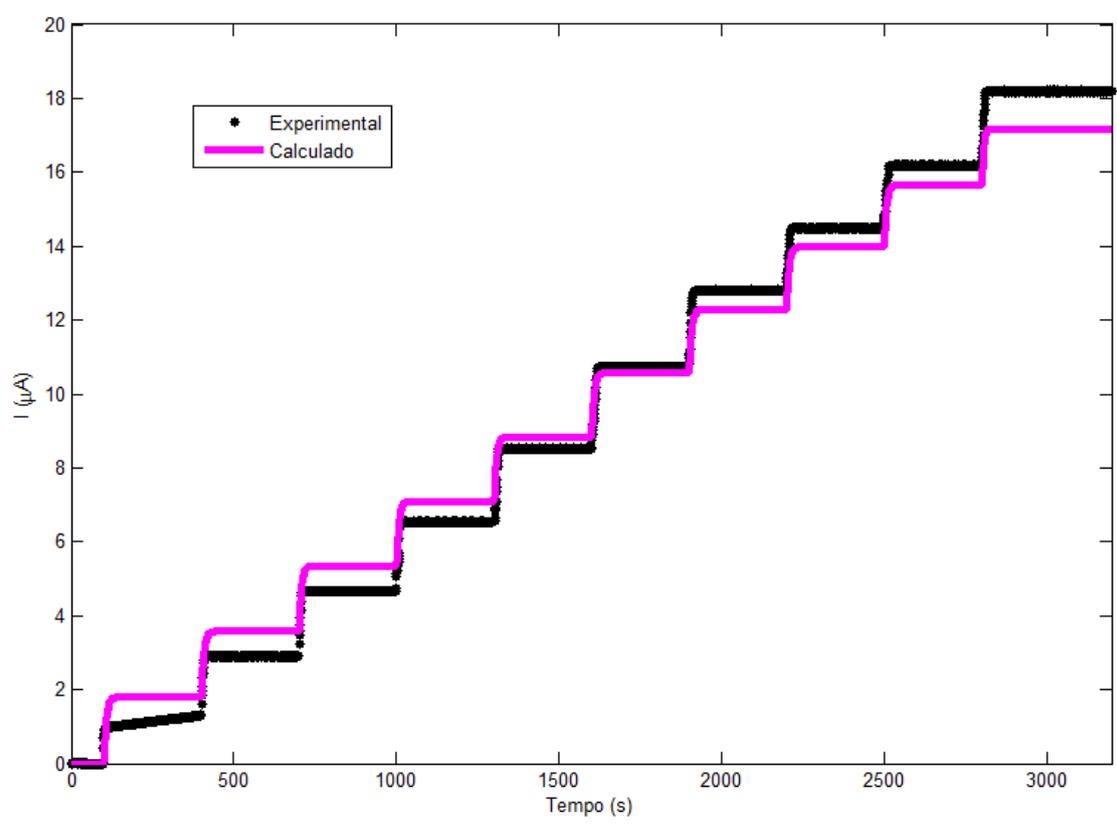


Figura 5.20. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 6 com biossensor baseado em GOx.

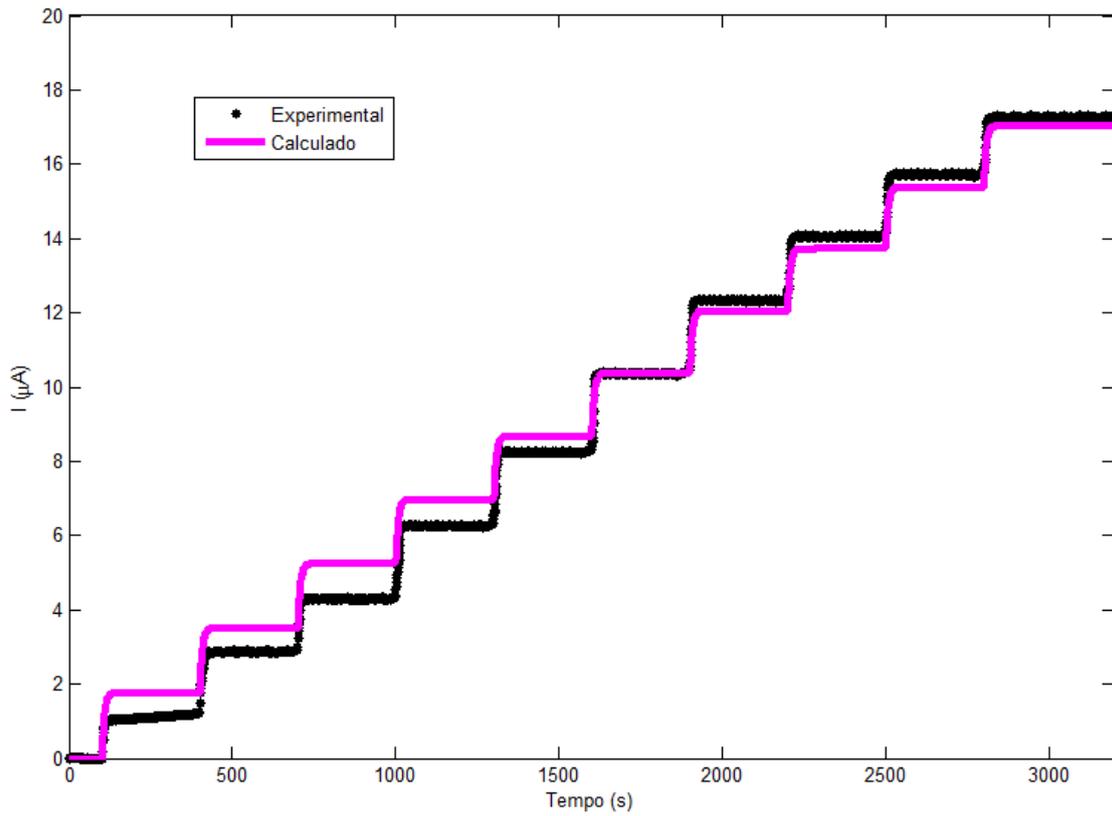


Figura 5.21. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 7 com biossensor baseado em GOx.

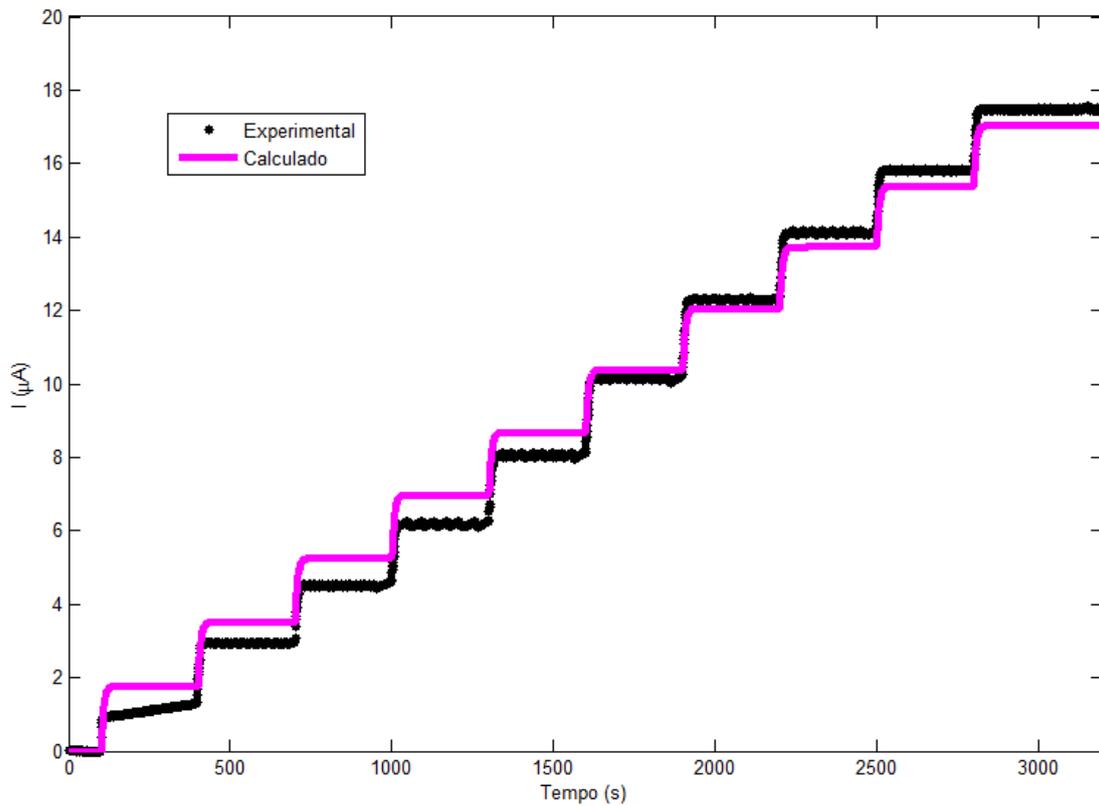


Figura 5.22. Comparação entre os resultados simulados e os dados experimentais do experimento 8 com biossensor baseado em GOx.

Tabela 5.16. Coeficientes de determinação do modelo do biossensor de segunda geração para os conjuntos de dados experimentais usados na validação

Experimento	Coefficiente de determinação (R^2)
4	0,9969
5	0,9992
6	0,9938
7	0,9955
8	0,9951

5.5.3. Análises de sensibilidade e otimização do desempenho dos biossensores

A fim de analisar o comportamento de biossensores de segunda geração, foram realizadas simulações utilizando o modelo desenvolvido. Como pode ser observado pelo perfil de concentração de substrato mostrado na Figura 5.23, os processos envolvendo o substrato apresentam uma dinâmica rápida e se encontram em regime difusivo. Pode-se perceber que o substrato que entra no filme polimérico logo reage com a forma oxidada da enzima, a qual é rapidamente regenerada pelo mediador. Analisando o perfil de concentração da forma oxidada do mediador, apresentado na Figura 5.24, pode-se notar que os processos envolvendo o mediador estão em regime difusivo. Assim, o mediador reage com a enzima, sendo reduzido no processo. Essa forma reduzida se difunde ao longo do filme e é reoxidada na superfície do eletrodo. A forma oxidada do mediador, então, se difunde no sentido contrário, podendo reagir novamente com a enzima. Dessa forma, conclui-se que o sistema é limitado pela difusão do mediador, fato sustentado pelo alto valor obtido para κ_2^2 .

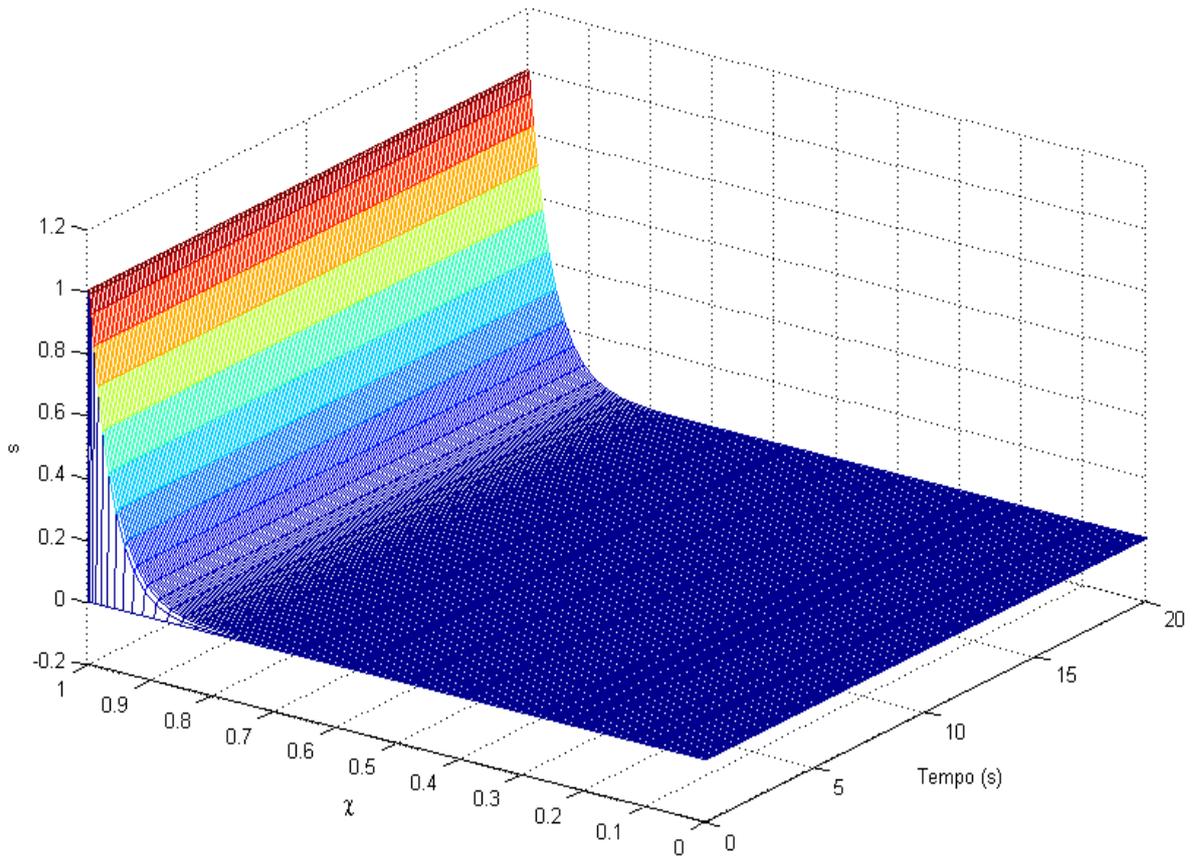


Figura 5.23. Perfil de concentração de substrato adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $[E_T] = 0,05 \text{ mM}$, $[M_T] = 50 \text{ mM}$ e $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$.

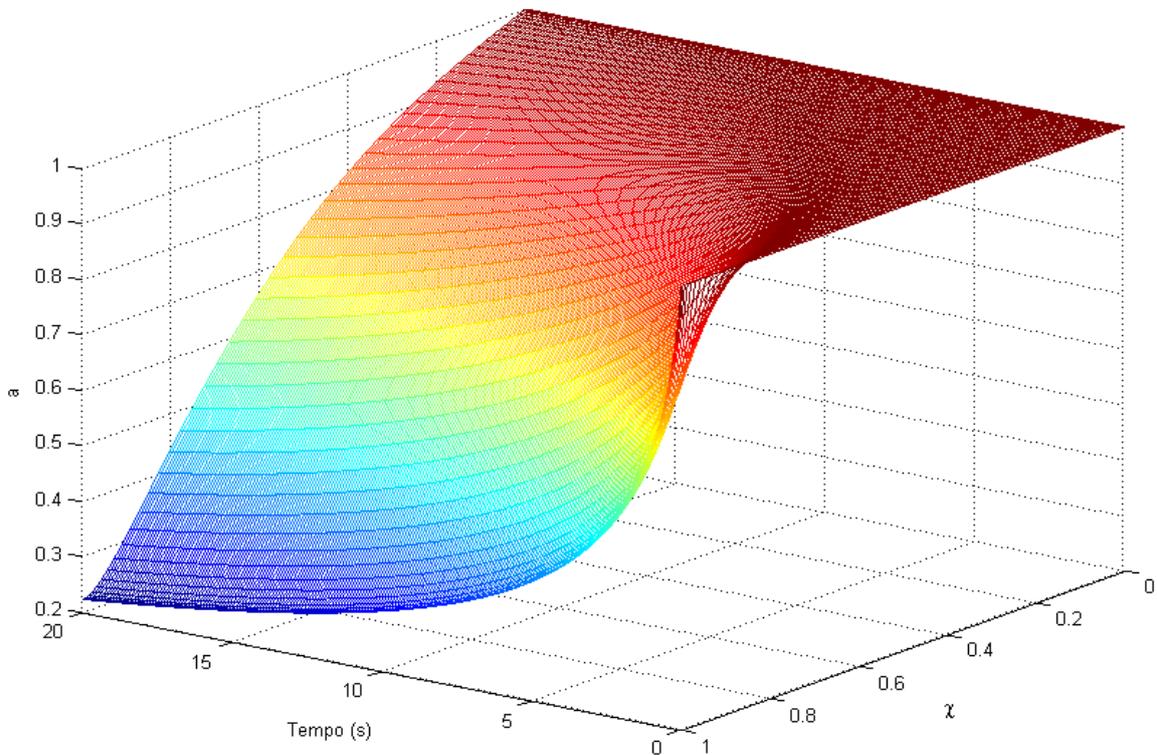


Figura 5.24. Perfil de concentração da forma oxidada do mediador adimensional em função do tempo e posição no filme polimérico. $[E_T] = 0,05 \text{ mM}$, $[M_T] = 50 \text{ mM}$ e $L = 10 \text{ }\mu\text{m}$.

As análises de sensibilidade foram realizadas via construção da superfície de resposta simulada, com a finalidade de avaliar o efeito da concentração total de enzima, da espessura do filme e da concentração total de mediador na resposta dos biossensores de segunda geração. Assim, para representar a sensibilidade do biossensor, foi definida a variável B_S do mesmo modo que para os biossensores de terceira geração.

Nas Figuras 5.25 e 5.26, são apresentadas as superfícies de resposta obtidas e, conforme pode ser observado, o aumento da concentração total de enzima aumenta a sensibilidade do biossensor, já que há mais enzima disponível para reagir com o substrato e ser regenerada pela forma oxidada do mediador. Assim, mais mediador passa para sua forma reduzida, a qual é reoxidada na superfície do eletrodo, gerando, por conseguinte, uma corrente maior. Do mesmo modo, o aumento da concentração total de mediador aumenta a sensibilidade do biossensor. Além disso, nota-se que o aumento da espessura do filme polimérico diminui a sensibilidade do biossensor, pois aumenta a resistência à transferência de massa, reduzindo a concentração da forma oxidada do mediador nas camadas do filme mais próximas à interface filme-solução, nas quais a reação com a enzima ocorre, conforme verificado na Figura 5.23.

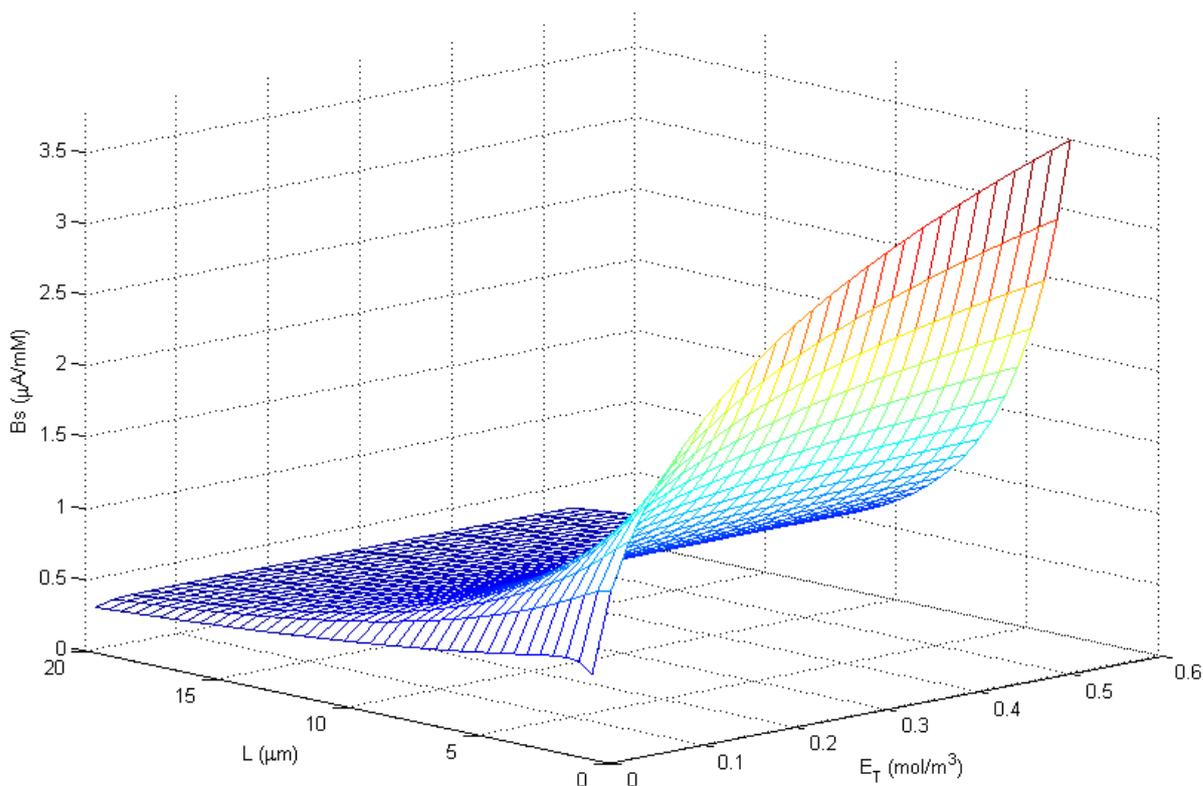


Figura 5.25. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de segunda geração em função da espessura do filme e da concentração total de enzima. $[M_T] = 100 mM$.

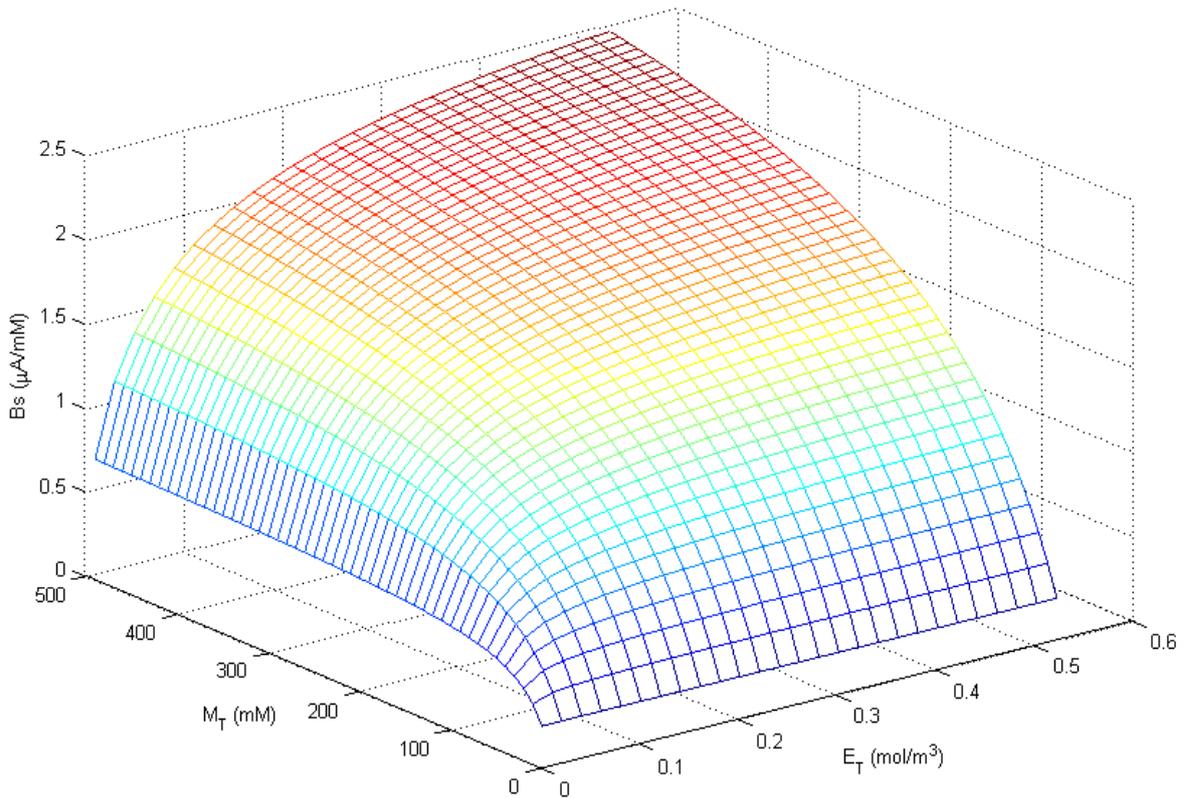


Figura 5.26. Superfície de resposta da sensibilidade do biossensor de segunda geração em função da concentração total de mediador e da concentração total de enzima.

$$L = 5 \mu m.$$

Finalmente, foi realizada a otimização do desempenho dos biossensores de segunda geração, tomando como base os resultados das análises de sensibilidade. Para isso, a sensibilidade do biossensor, B_S , foi definida como função objetivo, a qual foi maximizada, tendo como variáveis de decisão a concentração total de enzima ($[E_T]$), a concentração total de mediador ($[M_T]$) e a espessura do filme (L), as quais foram sujeitas às seguintes restrições:

$$0,01 \text{ mM} \leq [E_T] \leq 0,2 \text{ mM} \quad 5.8$$

$$10 \text{ mM} \leq [M_T] \leq 300 \text{ mM} \quad 5.9$$

$$L \geq 1 \mu m \quad 5.10$$

A concentração total de enzima foi restrita a valores menores que 0,2 mM, pois o custo das enzimas é alto e, por isso, concentrações muito altas de enzima tornam o biossensor economicamente inviável. A concentração máxima para a GOx foi fixada em um valor menor do que para a HRP (0,5 mM), pois a massa molar da GOx é de,

aproximadamente, 160 kDa, enquanto que da HRP é de 44 kDa. Por isso, para uma mesma concentração de enzima, utiliza-se uma quantidade, em massa, muito maior de GOx do que de HRP.

Além disso, a concentração total de mediador também foi restrita a valores menores que 300 mM, pois um gasto muito grande com mediador também torna o biossensor inviável.

Na Tabela 5.17, são evidenciados os resultados da otimização, sendo mostrados os valores obtidos para as variáveis de decisão e para a função objetivo (B_S). Como já era esperado, foram encontrados altos valores para $[E_T]$ e $[M_T]$, e um baixo valor para L , todos próximos às restrições estabelecidas, as quais não puderam ser alcançadas devido ao método de otimização utilizado. Em vista disso, foi realizada uma nova simulação com $[E_T] = 0,2 \text{ mM}$, $[M_T] = 300 \text{ mM}$ e $L = 1 \text{ }\mu\text{m}$ e, como resultado, foi obtida uma sensibilidade de $2,954 \text{ }\mu\text{A/mM}$.

Tabela 5.17. Resultados da otimização do desempenho de biossensores de segunda geração

Variável	Valor	Unidade
$[E_T]$	0,1942	mol/m^3
$[M_T]$	280,83	mol/m^3
L	1,004	μm
B_S	2,901	$\mu\text{A/mM}$

5.6. Comentários Finais

Observou-se, nos resultados de otimização, que a sensibilidade dos biossensores de terceira geração é muito maior que a dos biossensores de segunda geração. Isso ocorre devido ao fato de que a transferência eletrônica entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo é realizada de forma direta, evitando etapas intermediárias, as quais ocorrem nos biossensores de segunda geração (FREIRE *et al.*, 2003). Essa,

portanto, é uma vantagem que os biossensores de terceira geração têm sobre os de segunda geração.

Os modelos propostos para ambos os tipos de biossensores estudados indicam que uma alta concentração de enzima proporciona um biossensor com alta sensibilidade. Entretanto, como as enzimas possuem altos custos, deve-se avaliar a viabilidade econômica do biossensor. Portanto, deve-se ponderar qual a sensibilidade mínima requerida e qual o custo máximo concebível para o biossensor para, assim, ser possível determinar a concentração ideal de enzima.

Além disso, para ambos os casos, concluiu-se que quanto menor a espessura do filme polimérico, maior será a sensibilidade do biossensor. Entretanto, caso essa espessura for muito reduzida o sistema pode passar a ser controlado pelo regime cinético, característica indesejada para biossensores, pois reduz a linearidade de sua curva analítica. Observando os valores dos módulos de Thiele de ambos os sistemas, percebe-se que é necessário que as espessuras estejam em escala nanométrica ($\cong 10$ nm) para que esses sistemas passem a ser limitados pela cinética, o que corresponderia, por exemplo, a uma monocamada de enzima sem o uso de filme polimérico. Portanto, mesmo para os biossensores de terceira geração, cuja sensibilidade ótima é obtida com a formação de uma monocamada orientada, seria vantajosa a presença de uma fina camada de filme polimérico sobre a monocamada enzimática para garantir que o sistema seja controlado pela difusão.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. Conclusões

Nesse trabalho, foram desenvolvidos modelos matemáticos para descrever o comportamento de biossensores amperométricos de segunda e terceira geração baseados em enzimas, os quais, basicamente, consideraram os fenômenos de difusão através do filme polimérico e as reações catalíticas. Os modelos propostos foram adimensionados e implementados no *software* EMSO, simulador de processos baseado em equações.

Com o intuito de coletar dados experimentais para a estimação dos parâmetros dos modelos, foram utilizados biossensores baseados em HRP para representar os biossensores amperométricos de terceira geração, e biossensores baseados em GOx para representar os de segunda geração. No preparo dos biossensores, foi empregado o método de oclusão para a imobilização das enzimas, confinando as biomoléculas em um filme polimérico de Nafion[®]. Para a construção dos biossensores de segunda geração, o ferricianeto de potássio, o qual atuou como mediador, foi confinado juntamente com a GOx no filme polimérico.

Após a construção desses biossensores, técnicas eletroquímicas foram utilizadas para avaliar as respostas amperométricas desses biossensores na presença de seus analitos. Com isso, foi possível obter a corrente resultante do processo redox que ocorre entre a enzima e o analito em função do potencial aplicado, da concentração do analito em solução e do tempo decorrido.

Com a técnica de voltametria cíclica, foram determinados os potenciais de pico nos quais os processos redox ocorrem. Para os biossensores baseados em HRP, verificou-se que, na presença de peróxido de hidrogênio, o pico catódico, referente à redução da HRP imobilizada na superfície do eletrodo, se formou em um potencial de $-1,0$ V vs. Ag. Já para os biossensores baseados em GOx, na presença de glicose, observou-se o aumento do pico anódico, referente à oxidação do mediador na superfície do eletrodo, em um potencial de $0,2$ V vs. Ag.

Assim, tais potenciais foram aplicados para a realização da técnica de cronoamperometria, a qual foi utilizada com a finalidade de avaliar as respostas transientes e estacionárias dos biossensores preparados. Através da análise das respostas transientes dos biossensores, foi possível estimar seus tempos de reposta, os quais ficaram em torno de 13 segundos, para os biossensores baseados em HRP, e 9 segundos, para os biossensores baseados em GOx, ambos apresentando, portanto, uma resposta rápida, característica sempre perseguida no desenvolvimento de um biossensor.

Utilizando-se os resultados obtidos pelas cronoamperometrias, os modelos propostos foram ajustados a esses dados experimentais através da estimação de seus parâmetros. Os altos coeficientes de determinação obtidos indicaram que os modelos foram capazes de descrever adequadamente o comportamento dos biossensores.

Para ambos os sistemas, os módulos de Thiele estimados apresentaram altos valores, indicando que a difusão é a etapa limitante desses processos, fato também verificado, posteriormente, pela análise dos perfis de concentração das espécies, em função do tempo e da posição no filme polimérico, construídos a partir da realização de simulações.

Através da estimação de parâmetros, também foi possível constatar que a reação da HRP com o peróxido de hidrogênio é praticamente irreversível, já que o valor obtido para k_{-1} foi muito menor que o obtido para k_1 . Além disso, também para os biossensores de terceira geração, pôde-se perceber que apenas uma pequena fração ($\alpha = 0,0654$) da quantidade total de enzima presente no biossensor está em contato direto com o eletrodo, evidenciando a importância do uso de um método de imobilização que leve à formação de uma monocamada orientada para que não haja desperdício de enzima.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de generalização dos modelos propostos, foi feita a validação cruzada desses modelos. Para isso, foram coletados dados experimentais em diferentes condições. Dessa forma, foram realizadas simulações utilizando tais condições e os resultados foram comparados com os dados experimentais obtidos. Como os resultados simulados apresentaram boa concordância com os dados experimentais, foi possível concluir que os modelos foram validados com sucesso.

Análises de sensibilidade foram realizadas via construção da superfície de resposta simulada, com a finalidade de avaliar o efeito da concentração total de enzima, da espessura do filme, da fração molar de enzima eletroquimicamente ativa (biossensores de terceira geração) e da concentração total de mediador (biossensores de segunda geração) na resposta dos biossensores.

Para o caso dos biossensores de terceira geração, observou-se que os aumentos da concentração total de enzima e da fração molar de enzima eletroquimicamente ativa aumentaram a sensibilidade do biossensor. Isso se deve ao fato de que uma maior quantidade de enzima na superfície do eletrodo significa mais enzima disponível para reagir com o substrato, ser regenerada e, assim, gerar a corrente. Além disso, pôde-se observar que o aumento da espessura do filme polimérico tem como consequência a diminuição da sensibilidade do biossensor, já que causa o aumento da resistência à transferência de massa. Isso faz com que a concentração de substrato na superfície do eletrodo seja reduzida e, por consequência, a corrente gerada seja diminuída.

Pelas análises de sensibilidade realizadas para os biossensores de segunda geração, também foi constatado que o aumento da concentração total de enzima aumentou a sensibilidade do biossensor. Nesse sistema, o aumento da concentração total de enzima significa mais enzima disponível para reagir com o substrato e ser regenerada pela forma oxidada do mediador. Com isso, mais mediador pode passar para sua forma reduzida e ser reoxidado na superfície do eletrodo, o que gera a corrente. Do mesmo modo, o aumento da concentração total de mediador aumentou a sensibilidade do biossensor. Além disso, assim como para os biossensores de terceira geração, o aumento da espessura do filme polimérico também diminuiu a sensibilidade do biossensor, pois aumentou a resistência à transferência de massa, reduzindo, assim, a concentração da forma oxidada do mediador nas camadas de filme mais próximas à interface filme-solução, nas quais a reação com a enzima ocorre.

Por fim, tomando como base os resultados das análises de sensibilidade, foi realizada a otimização do desempenho dos biossensores, através da maximização de suas sensibilidades.

Para os biossensores de terceira geração, a sensibilidade ótima, de 286,98 $\mu\text{A}/\text{mM}$, foi obtida com $[E_T] = 0,5 \text{ mM}$, $L = 1 \mu\text{m}$ e $\alpha = 1$, ou seja, com a maior concentração total de enzima, a menor espessura do filme polimérico e com o total de

enzima em contato direto com o eletrodo. Entretanto, para que esse cenário seja viável, deve-se aumentar a área superficial do eletrodo de trabalho, o que pode ser alcançado com o uso de nanoestruturas condutoras. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que um biossensor de terceira geração com desempenho ótimo é aquele no qual foram utilizadas nanoestruturas condutoras, nas quais a enzima fora imobilizada de tal modo que foi formada uma monocamada orientada.

Já para os biossensores de segunda geração, a sensibilidade ótima, de 2,954 $\mu\text{A}/\text{mM}$, foi obtida com $[E_T] = 0,2 \text{ mM}$, $[M_T] = 300 \text{ mM}$ e $L = 1 \mu\text{m}$, ou seja, com a maior concentração total de enzima, a maior concentração total de mediador e a menor espessura do filme polimérico.

Tanto as análises de sensibilidade, quanto a otimização do desempenho dos biossensores, mostraram que, para ambos os tipos de biossensores estudados, uma alta concentração de enzima fornece um biossensor com alta sensibilidade. No entanto, as enzimas possuem altos custos, sendo, por isso, essencial que, ao conceber um novo biossensor, seja feita uma avaliação da sua viabilidade econômica para que haja a possibilidade de torná-lo disponível comercialmente. Em vista disso, deve-se ponderar qual a sensibilidade mínima requerida e qual o custo máximo concebível para o biossensor para, assim, ser possível determinar a concentração ideal de enzima.

Através da observação dos resultados da otimização, foi possível constatar que os biossensores de terceira geração apresentaram uma sensibilidade muito maior que os de segunda geração. Dessa forma, para obtermos um biossensor com determinada sensibilidade, seria necessária uma quantidade de enzima muito maior para um biossensor de segunda geração do que para um de terceira geração. Portanto, os de terceira geração também possuem a vantagem de serem mais baratos.

Além disso, para ambos os casos, verificou-se que quanto menor a espessura do filme polimérico, maior a sensibilidade do biossensor. No entanto, a redução demasiada dessa espessura pode fazer com que o sistema passe a ser controlado pelo regime cinético, o que pode resultar na redução da linearidade da curva analítica desse biossensor. Através da análise dos valores dos módulos de Thiele de ambos os sistemas, percebeu-se que é necessário que a espessura esteja em escala nanométrica ($\cong 10 \text{ nm}$) para que esses sistemas passem a ser limitados pela cinética, o que corresponderia, por

exemplo, a uma monocamada de enzima sem o uso de filme polimérico. À vista disso, a fim de garantir que o sistema seja controlado pela difusão e não pela cinética, mesmo para os biossensores de terceira geração, cuja sensibilidade ótima é obtida com a formação de uma monocamada orientada, seria vantajosa a presença de uma fina camada de filme polimérico sobre essa monocamada enzimática.

Finalmente, pode-se concluir que o presente trabalho mostrou que os modelos propostos são úteis para o projeto de biossensores, predição de suas respostas e otimização de seus desempenhos. Dessa forma, é possível afirmar que foram atingidas as metas estabelecidas.

6.2. Sugestões para Trabalhos Futuros

Por fim, algumas sugestões para trabalhos futuros são listadas abaixo:

- Construção de biossensores baseando-se nos pontos ótimos obtidos nesse trabalho e avaliação da resposta amperométrica desses biossensores;
- Estimação de parâmetros e validação dos modelos desenvolvidos, utilizando diferentes eletrodos, enzimas e métodos de imobilização;
- Desenvolvimento de modelos que considerem o efeito de possíveis interferentes, comumente presentes em amostras reais, na resposta dos biossensores;
- Modelagem, análise e otimização de biossensores potenciométricos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-LOMILLO, M.A., DOMÍNGUEZ-RENEO, O., MATOS, P., ARCOS-MARTÍNEZ, M.J., 2009, “Electrochemical determination of levetiracetam by screen-printed based biosensors”, *Bioelectrochemistry*, v. 74, pp. 306-309.

ARSLAN, F., BESKAN, U., 2014, “An amperometric biosensor for glucose detection from glucose oxidase immobilized in polyaniline – polyvinylsulfonate – potassium ferricyanide film”, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 42, pp. 284-288.

ASCHER, U.M., PETZOLD, L.R., 1997, *Computer methods for ordinary differential equations and differential-algebraic equations*. 1 ed., Siam.

ASERIS, V., BARONAS, R., 2010, “Using grid computing to model biosensors acting in stirred and non-stirred solutions”, *V European Conference on Computational Fluid Dynamics*, Lisboa, Portugal.

ASERIS, V., GAIDAMAUSKAITĖ, E., KULYS, J., BARONAS, R., 2014, “Modelling glucose dehydrogenase-based amperometric biosensor utilizing synergistic substrates conversion”, *Electrochimica Acta*, v. 146, pp. 752-758.

ÁVILA, V.C., 2014, *Desenvolvimento de um biossensor para detecção de glicose*. Trabalho de Conclusão de Curso, Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

BAHADIR, E.F, SEZGINTÜRK, M.K., 2015, “Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses”, *Analytical Biochemistry*, v. 478, pp. 107-120.

BANKAR, S.B., BULE, M.V., SINGHAL, R.S., ANANTHANARAYAN, L., 2009, “Glucose oxidase - An overview”, *Biotechnology Advances*, v. 27, pp. 489-501.

BARLETT, P.N., PRATT, K.F.E., 1993, “Modelling of processes in enzyme electrodes”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 8, pp. 451-462.

- BARONAS, R., KULYS, J., IVANAUSKAS, F., 2004, "Modelling amperometric enzyme electrode with substrate cyclic conversion", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 19, pp. 915-922.
- BARONAS, R., KULYS, J., PETRAUSKAS, K., RAZUMIENE, J., 2012, "Modelling carbon nanotubes-based mediatorless biosensor", *Sensors*, v. 12, pp. 9146-9160.
- BASAVARAJU, A., MULLANGI, A.R., MENON, S., LAKSHMISHREE, S.S., 2015, "To design a biosensor for the determination of cholesterol in human blood", *International Journal of Scientific & Engineering Research*, v. 6, n. 4, pp. 493-496.
- BISSWANGER, H., 2002, *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*, 3 ed., Alemanha, Wiley-VCH.
- BRADFORD, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-254.
- BRADY, J.E., CARR, P.W., 1980, "Theoretical evaluation of the steady-state response of potentiometric enzyme electrodes", *Analytical Chemistry*, v. 52, n. 6, pp. 977-980.
- BRITZ, D., BARONAS, R., GAIDAMAUSKAITÉ, E., IVANAUSKAS, F., 2009, "Further comparisons of finite difference schemes for computational modelling of biosensors", *Nonlinear Analysis: Modelling and Control*, v.14, n. 4, pp. 419-433.
- CHANG, H.C., WU, C.C., DING, S.J., LIN, I.S., SUN, I.W., 2005, "Measurement of diffusion and partition coefficients of ferrocyanide in protein-immobilized membranes", *Analytica Chimica Acta*, v. 532, pp. 209-214.
- CHAUBEY, A., MALHOTRA, B.D., 2002, "Mediated biosensors", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 17, pp. 441-456.
- CLARK, L.C., LYONS, C., 1962, "Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery", *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 102, pp. 29-45.
- COLOMBO, L., BARUZZI, A.M., GARAY, F.S., 2015, "Analysis and optimization of a hydrogel matrix for the development of a sandwich-type glucose biosensor", *Sensors and Actuators B*, v. 211, pp. 125-130.

FINKEL, D.E., 2003, *DIRECT optimization algorithm user guide*. Disponível em: http://www4.ncsu.edu/~ctk/Finkel_Direct/DirectUserGuide_pdf.pdf

FIORITO, P.A., TORRESI, S.I.C., 2001, “Glucose amperometric biosensor based on the co-immobilization of glucose oxidase (GOx) and ferrocene in poly(pyrrole) generated from ethanol / water mixtures”, *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 12, n. 6, pp. 729-733.

FREIRE, R.S., PESSOA, C.A., MELLO, L.D., KUBOTA, L.T., 2003, “Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity”, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, pp. 230-243.

GAJOVIC, N., WARSINKE, A., HUANG, T., SCHULMEISTER, T., SCHELLER, F.W., 1999, “Characterization and mathematical modeling of a bienzyme electrode for l-malate with cofactor recycling”, *Analytical Chemistry*, v. 71, pp. 4657-4662.

GALLI, A., 2009, *Desenvolvimento e caracterização de um biossensor bienzimático imobilizado sobre monocamadas auto-organizadas para determinação de açúcares em alimentos*. Tese de D.Sc., Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil.

GHICA, M.E., BRETT, C.M.A., 2005, “A glucose biosensor using methyl viologen redox mediator on carbon film electrodes”, *Analytica Chimica Acta*, v. 532, pp. 145-151.

GUILBAULT, G.G., MONTALVO, J.G., 1969, “A urea-specific enzyme electrode”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, n. 8, pp. 2164-2165.

GUIMARÃES, J.A., 2009, *Estudo de filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett visando o desenvolvimento de biossensor de colesterol*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

HANSEN, B., 2011, *Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina*. Dissertação de M.Sc., Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

HOCEVAR, M.A., 2011, *Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos utilizando nanopartículas de polipirrol*. Dissertação de M.Sc., Escola de Engenharia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

- JOSHI, R., 2006, *Biosensors*, 1 ed., Índia, Isha Books.
- KISSINGER, P.T., 2005, “Biosensors - a perspective”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, pp. 2512-2516.
- KOHAVI, R., 1995, “A study of cross-validation and bootstrap for accuracy estimation and model selection”, In: *International Joint Conference on Artificial Intelligence*, v.14, pp. 1137-1145, Montreal, Canadá.
- LARSSON, K., KRIZ, K., KRIZ, D., 1999, “Magnetic transducers in biosensors and bioassays”, *Analisis*, v. 27, n. 7, pp. 617-621.
- LATIF, U., DICKERT, F.L., BLACH, R.G., FEUCHT, H.D., 2013, “Biocompatible membranes and coatings for glucose sensor”, *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v. 35, n. 1, pp. 17-22.
- LESKOVAC, V., TRIVIC, S., WOHLFAHRT, G., KANDRAC, J., PERICIN, D., 2005, “Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, pp. 731-750.
- LIBERTINO, S., AIELLO, V., SCANDURRA, A., RENIS, M., SINATRA, F., 2008, “Immobilization of the enzyme glucose oxidase on both bulk and porous SiO₂ surfaces”, *Sensors*, v.8, pp. 5637-5648.
- LIEDBERG, B., NYLANDER, C., LUNDSTROM, I., 1983, “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing”, *Sensors and Actuators*, v. 4, pp. 299-304.
- LIU, S., SUN, Y., 2007, “Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, pp. 905-911.
- LIU, Y., 2012, *Mathematical and computational modelling for biosensors: A modular approach*. Ph.D. thesis, Dublin Institute of Technology, Dublin, Irlanda.
- LOGHAMBAL, S., RAJENDRAN, L., 2010, “Mathematical modeling of diffusion and kinetics in amperometric immobilized enzyme electrodes”, *Electrochimica Acta*, v. 55, pp. 5230-5238.

LOWE, C.R., 2007, "Overview of Biosensor and Bioarray Technologies". In: Marks, R., Cullen, D.C., Karube, I., Lowe, C.R., Weetall, H.H., *Handbook of Biosensors and Biochips*, chapter 1, New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, Ltd.

LU, X., ZHANG, Q., ZHANG, L., LI, J., 2006, "Direct electron transfer of horseradish peroxidase and its biosensor based on chitosan and room temperature ionic liquid", *Electrochemistry Communications*, v. 8, pp. 874-878.

LUCISANO, J.Y., GOUGH, D.A., 1988, "Transient response of the two-dimensional glucose sensor", *Analytical Chemistry*, v. 60, pp. 1272-1281.

MACHADO, D.F., 2015, *Biossensores impressos baseados em peroxidase imobilizada em nanofios de titanato*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MARKETS AND MARKETS, 2015, *Biosensors market by application (point of care, home diagnostics, research labs, biodefense, environmental monitoring, food industry), product (wearable, non-wearable), technology (electrochemical, piezoelectric, optical) & geography - Analysis & Forecast to 2020*. In: Top Market Reports.

MARTENS, N., HALL, E.A.H., 1994, "Model for an immobilized oxidase enzyme electrode in the presence of two oxidants", *Analytical Chemistry*, v. 66, pp. 2763-2770.

MEENA, A., RAJENDRAN, L., "Mathematical modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations – Homotopy perturbation approach", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 644, pp. 50-59.

MEHROTRA, P., 2016, "Biosensors and their applications - A review", *Journal of oral biology and craniofacial research*, v. 6, pp. 153-159.

MELL, L.D., MALOY, J.T., 1975, "A model for the amperometric enzyme electrode obtained through digital simulation and applied to the immobilized glucose oxidase system", *Analytical Chemistry*, v. 47, n. 2, pp. 299-307.

MELO, A.F., 2008, *Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis*. Dissertação de M.Sc., Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MONTGOMERY, D.C., 2012, *Design and analysis of experiments*. 8^a ed, Wiley.

- MOREIRA, C.S., LIMA, A.M.N., NEFF, H., BARRETO, A.G., LOUREIRO, F.C.L., SOUZA, C.A., LIMA, L.H.C., 2010, “Biossensores: Tecnologia e aplicações”, *V Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação*, Maceió, Alagoas.
- MOZAZ, S.R., MARCO, M.P., ALDA, M.J.L., BARCELÓ, D., 2004, “Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 378, pp. 588-598.
- NASCIMENTO, V.B., ANGNES, L., 1998, “Eletrodos fabricados por *silk-screen*”, *Química Nova*, v. 21, n. 5, pp. 614-629.
- NAVES, A.F., 2008, *Estudo da adsorção de horseradish peroxidase (HRP) sobre superfícies planas e de sua atividade catalítica*. Tese de D.Sc., Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
- NELDER, J.A., MEAD, R., 1965, “A simplex method for function minimization”, *Computer Journal*, v. 7, pp. 308-313.
- NICOLINI, J.V., 2013, *Biossensores baseados em nanotubos de titanato e peroxidase para detecção do peróxido de hidrogênio*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- NICOLINI, J.V., RESENDE, N.S., FERRAZ, H.C., 2014, “Adsorption of horseradish peroxidase onto titanate nanowires”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 90, n. 4, pp. 739-746.
- NOVÁKOVÁ, A., SCHREIBEROVÁ, L., SCHREIBER, I., 2011, “Study of dynamics of glucose-glucose oxidase-ferricyanide reaction”, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, v. 85, n. 13, pp. 2305-2309.
- PARKER, J.M., SCHWARTZ, C.S., 1987, “Modeling the kinetics of immobilized glucose oxidase”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 30, pp. 724-735.
- PATACAS, R.C., 2007, *Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas*. Dissertação de M.Sc., Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

- PERUMAL, V., HASHIM, U., 2014, "Advances in biosensors: Principle, architecture and applications", *Journal of Applied Biomedicine*, v.12, pp. 1-15.
- PUTZBACH, W., RONKAINEN, N.J., 2013, "Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review", *Sensors*, v. 13, pp. 4811-4840.
- RACINE, P., MINDT, W., 1971, "On the role of substrate diffusion in enzyme electrodes", *Biological Aspects of Electrochemistry*, v. 18, pp. 525-534.
- RECHNITZ, G.A., KOBOS, R.K., REICHEL, S.J., GEBAUER, C.R., 1977, "A bioselective membrane electrode prepared with living bacterial cells", *Analytica Chimica Acta*, v. 94, pp. 357-365.
- RISHPON, J., GOTTFELD, S., CAMPBELL, C., DAVEY, J., ZAWODZINSKI, T.A., 1994, "Amperometric glucose sensors based on glucose oxidase immobilized in Nafion", *Electroanalysis*, v. 6, pp. 17-21.
- ROCHA-SANTOS, T.A.P., 2014, "Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 62, pp. 28-36.
- RODA, A., MICHELINI, E., ZANGHERI, M., FUSCO, M.D., CALABRIA, D., SIMONI, P., 2016, "Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 79, pp. 317-325.
- ROMERO, M.R., BARUZZI, A.M., GARAY, F., 2012, "Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor", *Sensors and Actuators B*, v. 162, pp. 284-291.
- ROSATTO, S.S., FREIRE, R.S., DURÁN, N., KUBOTA, L.T., 2001, "Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental", *Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 77-86.
- ROSSOKHATY, V., ROSSOKHATA, N., 2002, "Mathematical model of a biosensor with multilayer charged membrane", *Computer Physics Communications*, v. 147, pp. 366-369.

- SALINAS-CASTILLO, A., PASTOR, I., MALLAVIA, R., MATEO, C.R., 2008, “Immobilization of a trienzymatic system in a sol–gel matrix: A new fluorescent biosensor for xanthine”, *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, pp. 1053-1056.
- SASSOLAS, A., BLUM, L.J., LECA-BOUVIER, B.D., 2012, “Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors”, *Biotechnology Advances*, v. 30, pp. 489-511.
- SECCHI, A.R., 2012, *DASSLC: user’s manual - v.3, n.8 (Differential-Algebraic System Solver in C)*. Disponível em: www.enq.ufrgs.br/enqlib/numeric.
- SHEPPARD, N.F., MEARS, D.J., GUISEPPI-ELIE, A., 1996, “Model of an immobilized enzyme conductimetric urea biosensor”, *Biosensors & Bioelectronics*, v. 11, n. 10, pp. 967-979.
- SILVA, J.S., 2010, *Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares*. Dissertação de M.Sc., Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SILVA, L.M.C., 2011, *Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e ureia com foco na aplicação ambiental*. Tese de D.Sc., Escola de Química, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J., CROUCH, S.R., 2006, *Fundamentos de Química Analítica*. Tradução da 8ª edição norte-americana, Thomson.
- SOARES, R.P.; SECCHI, A.R., 2003, “EMSO: A new environment for modelling, simulation and optimisation”, *Computer Aided Chemical Engineering*, v.14, pp. 947-952.
- SUMAIYA, S., TRIVEDI, R., 2015, “A review on glucose oxidase”, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 4, n. 8, pp. 636-642.
- TATSUMA, T., WATANABE, T., 1992, “Model analysis of enzyme monolayer- and bilayer-modified electrodes: The steady-state response”, *Analytical Chemistry*, v. 64, pp. 625-630.

TENG, Y.J., ZUO, S.H., LAN, M.B., 2009, "Direct electron transfer of horseradish peroxidase on porous structure of screen-printed electrode", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, pp. 1353-1357.

THÉVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S., 2001, "Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, pp. 121-131.

TRINDER, P., 1969, "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor", *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 6, pp. 24-27.

TSE, P.H.S., GOUGH, D.A., 1987, "Transient response of an enzyme electrode sensor for glucose", *Analytical Chemistry*, v. 59, pp. 2339-2344.

UPDIKE, S.J., HICKS, G.P., 1967, "The enzyme electrode", *Nature*, v. 214, pp. 986-988.

VADGAMA, P., 1990, "Biosensors: Adaptation for practical use", *Sensors and Actuators*, v. B1, pp. 1-7.

VEITCH, N.C., 2004, "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme", *Phytochemistry*, v. 65, pp. 249-259.

VIEIRA, N.C.S., 2006, *Biossensores de glicose nanoestruturados baseados em dendrímeros PAMAM e filmes finos de In₂O₃:Sn*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, MG, Brasil.

VILLADSEN, J.V., STEWART, W.E., 1967, "Solution of boundary-value problems by orthogonal collocation", *Chemical Engineering Science*, v. 22, pp. 1483-1501.

WANG, Y, HASEBE, Y., 2012, "Uricase-adsorbed carbon-felt reactor coupled with a peroxidase-modified carbon-felt-based H₂O₂ detector for highly sensitive amperometric flow determination of uric acid", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 57, pp. 125-132.

WELINDER, K.G., 1976, "Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7)", *Febs Letters*, v. 72, n. 1, pp. 19-23.

WILSON, R., TURNER, A.P.F., 1992, "Glucose oxidase: an ideal enzyme", *Biosensors & Bioelectronics*, v. 7, pp. 165-185.

YOKOYAMA, K., KAYANUMA, Y., 1998, "Cyclic voltammetric simulation for electrochemically mediated enzyme reaction and determination of enzyme kinetic constants", *Analytical Chemistry*, v. 70, pp. 3368-3376.

ZHANG, D., LIU, Q., 2016, "Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection", *Biosensors and Bioelectronics*, v. 75, pp. 273-284.

ANEXO A

Curvas Analíticas dos Biossensores Preparados

Biossensores baseados em HRP

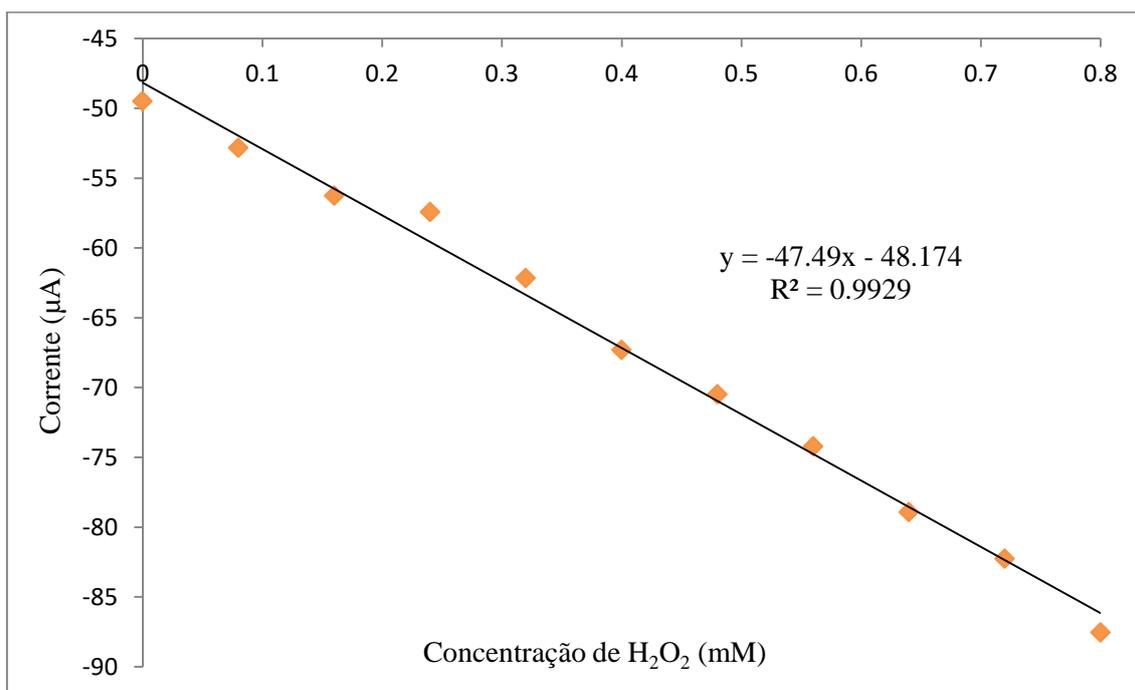


Figura A.1. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 1.

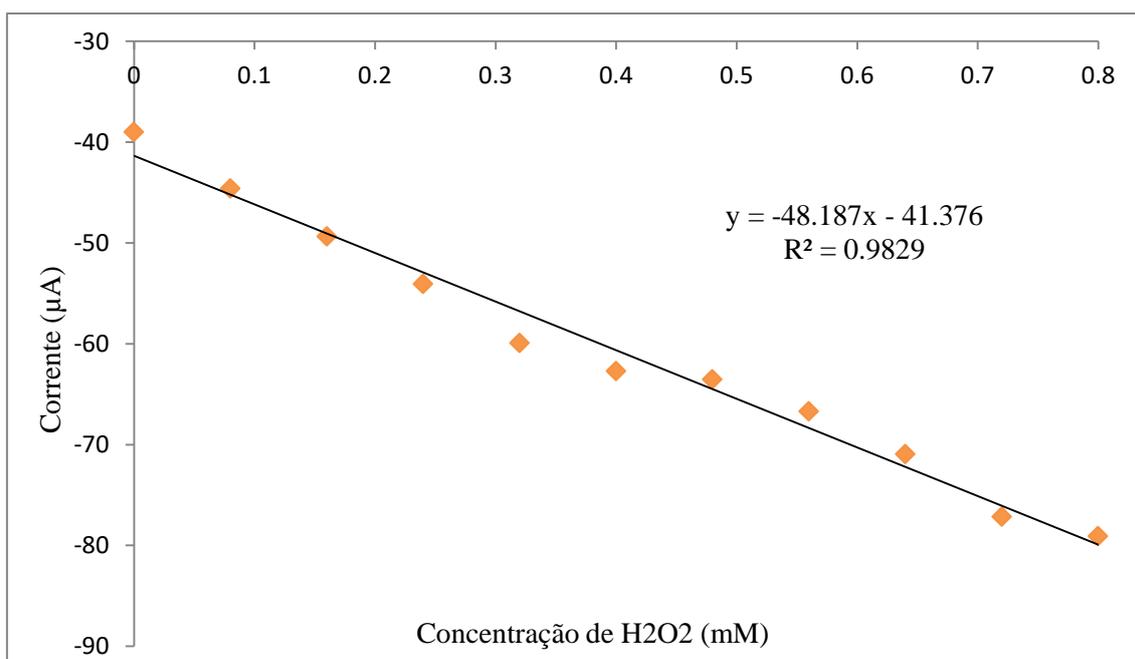


Figura A.2. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 2.

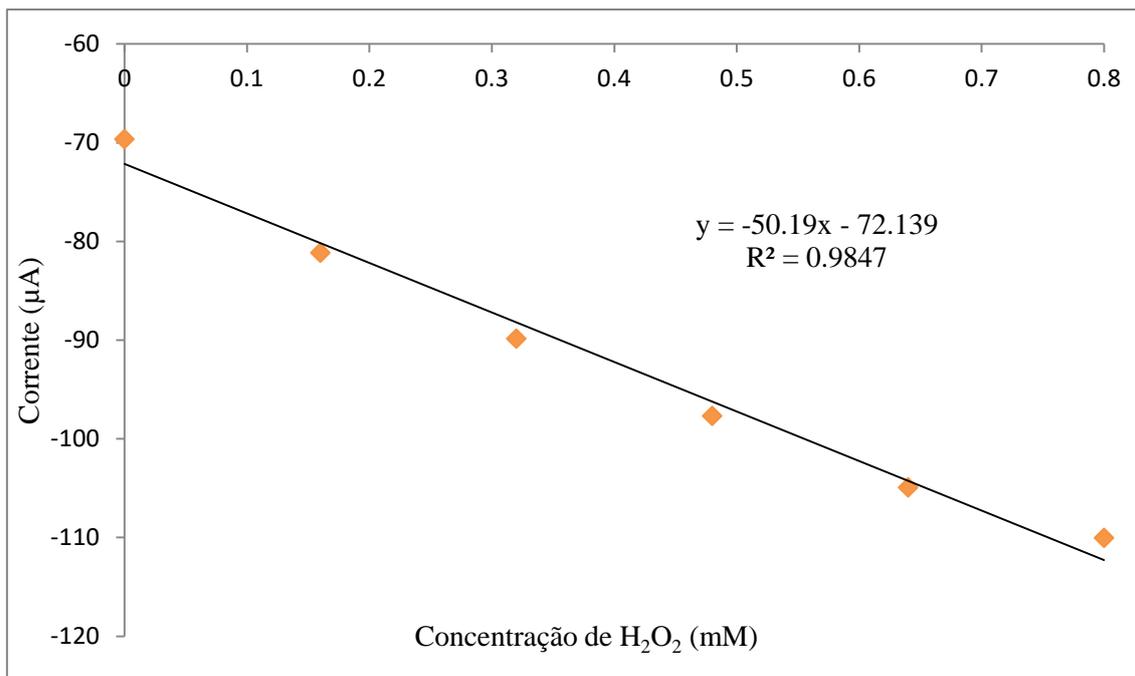


Figura A.3. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 3.

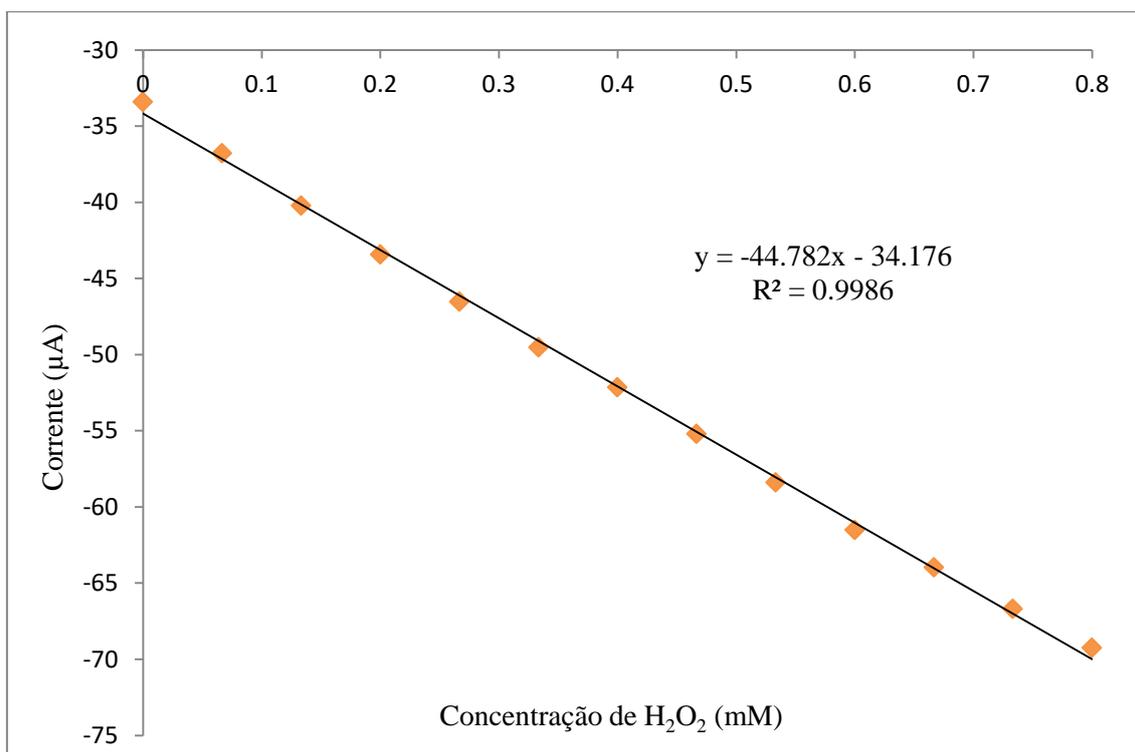


Figura A.4. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 4.

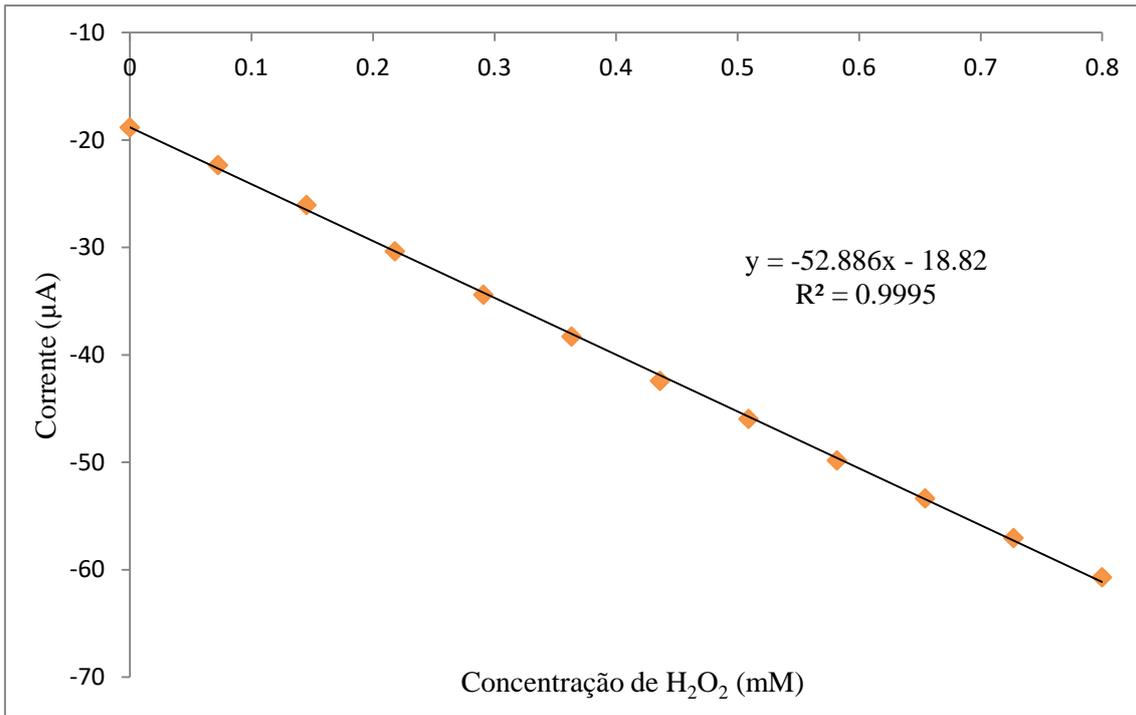


Figura A.5. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 5.

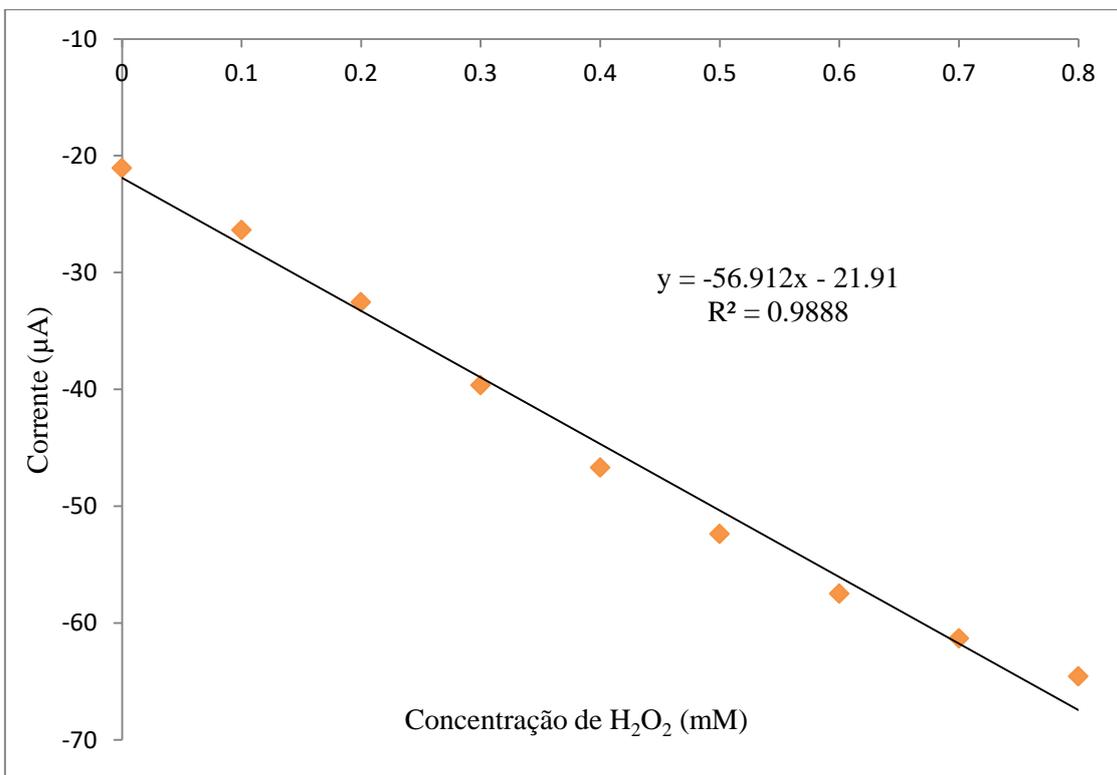


Figura A.6. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 6.

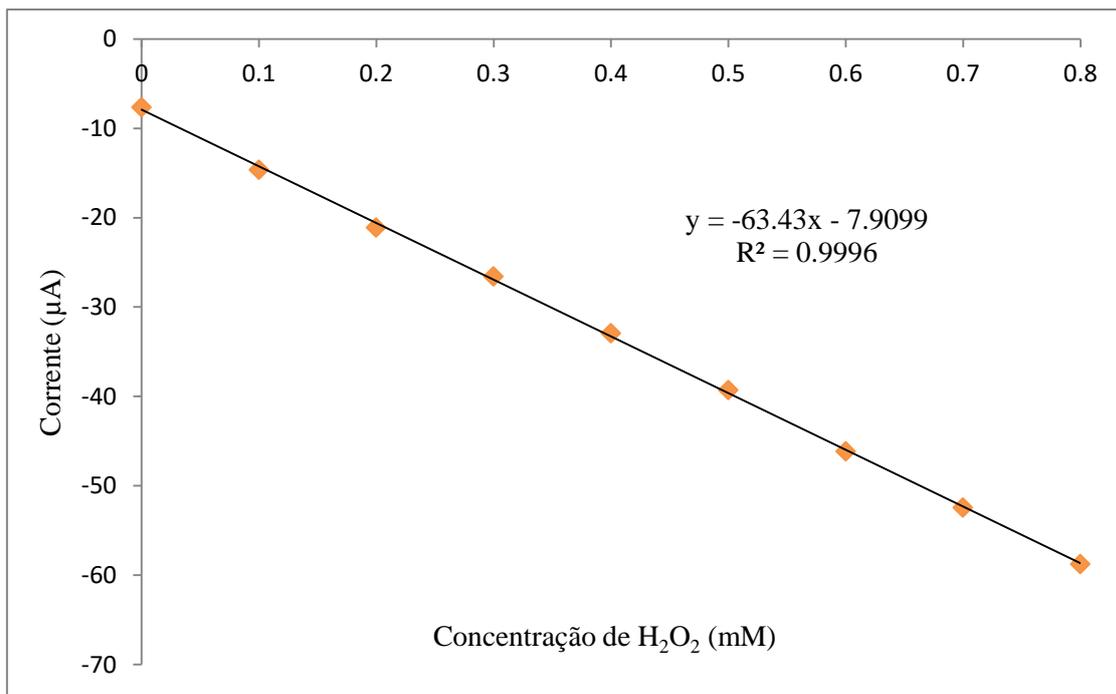


Figura A.7. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 7.

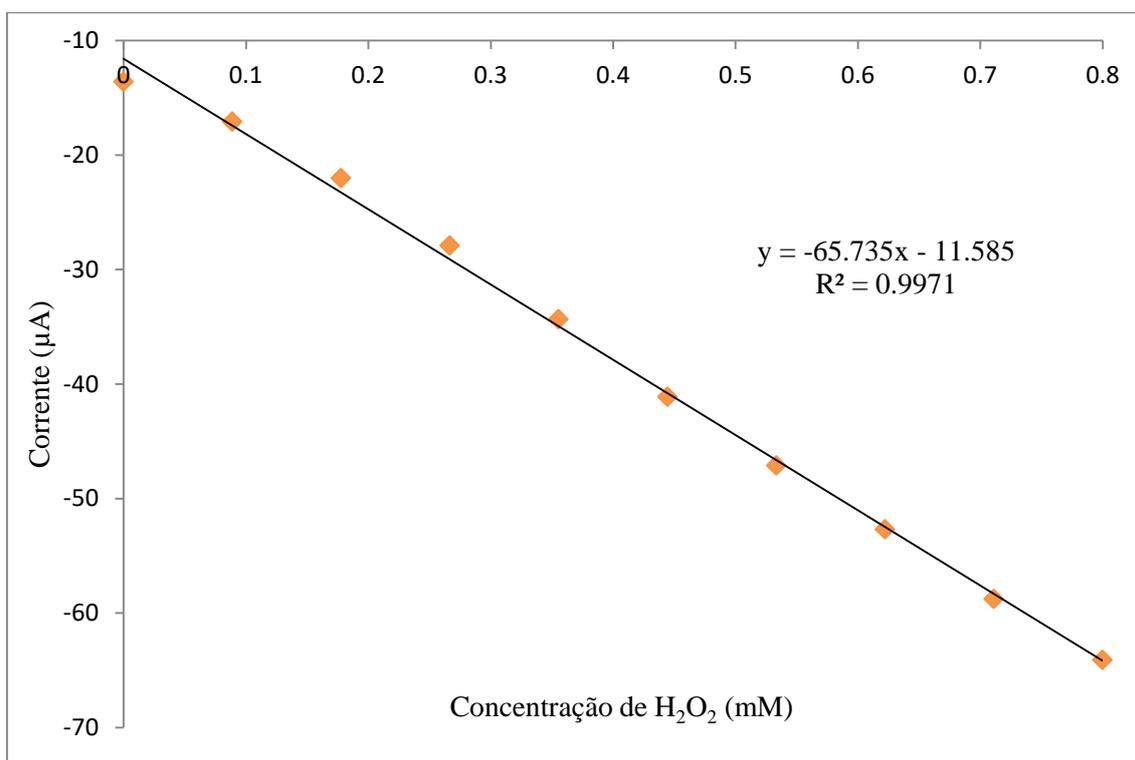


Figura A.8. Curva analítica do biossensor baseado em HRP preparado no experimento 8.

Biossensores baseados em GOx

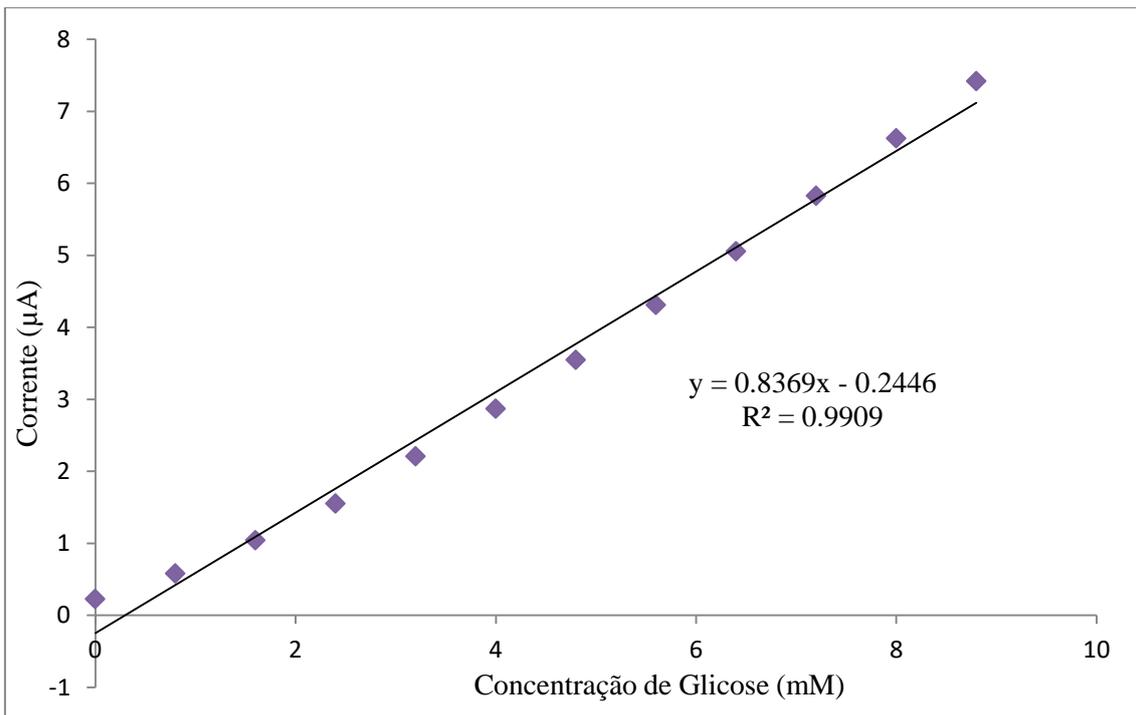


Figura A.9. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 1.

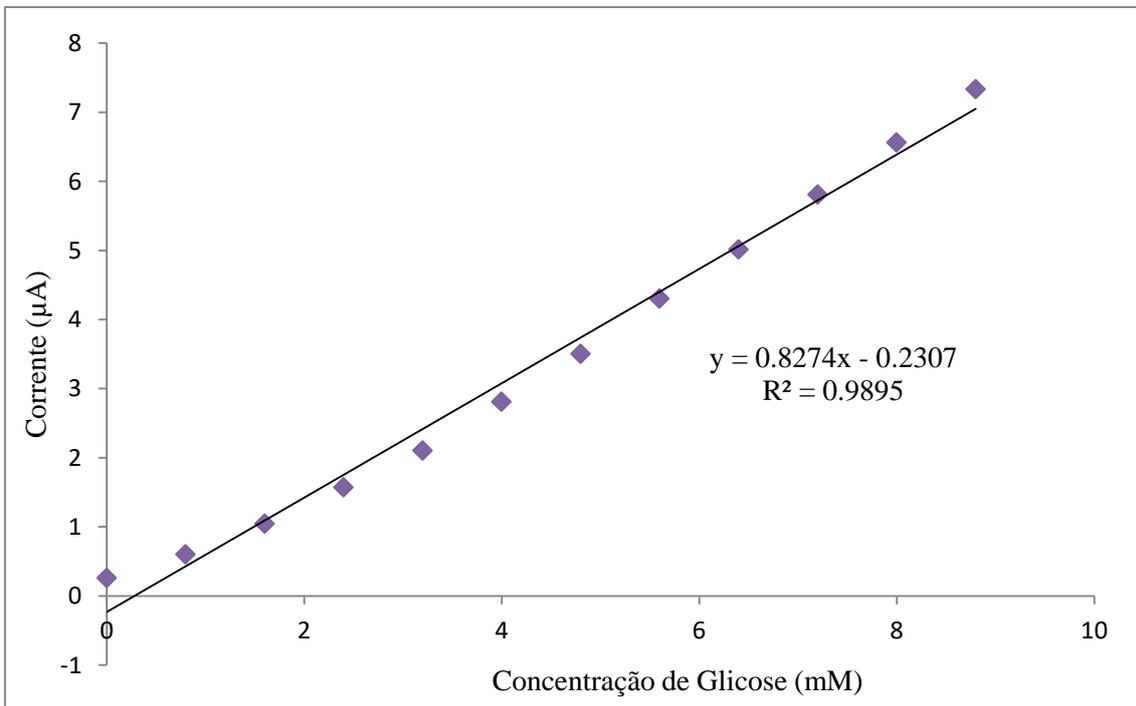


Figura A.10. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 2.

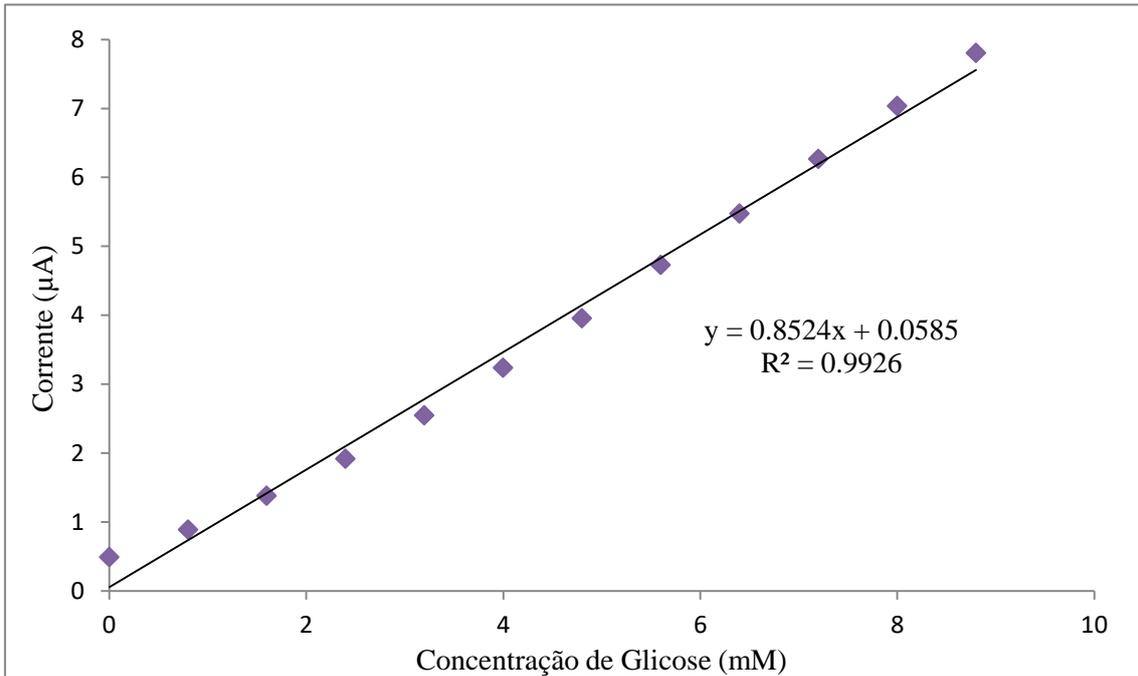


Figura A.11. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 3.

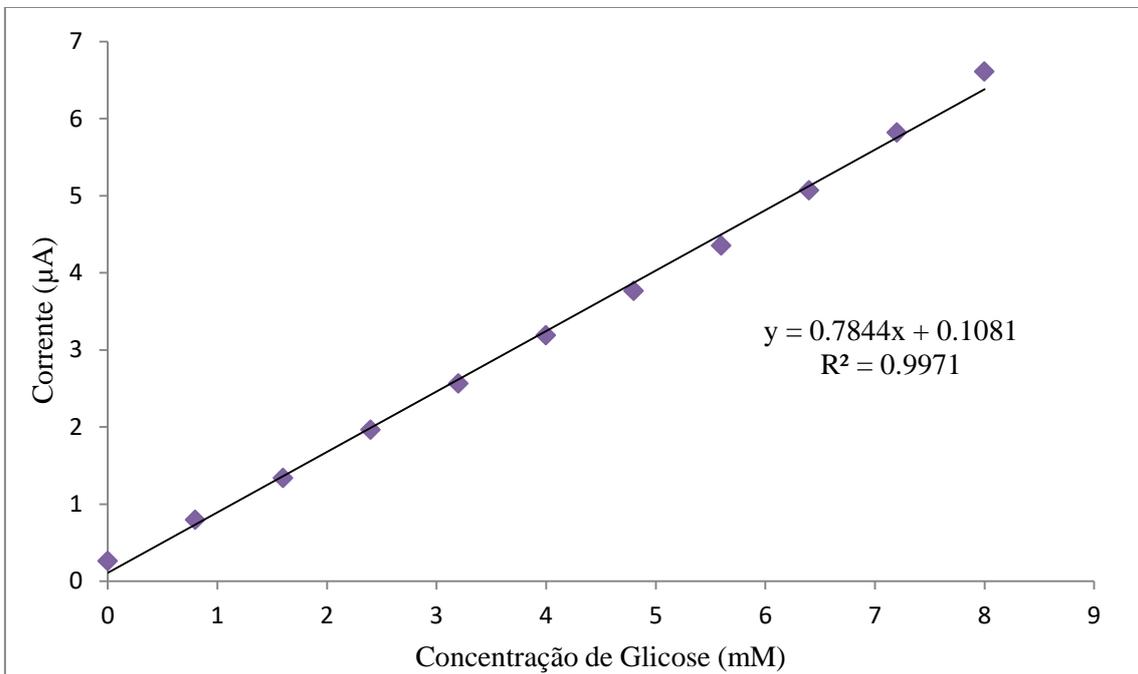


Figura A.12. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 4.

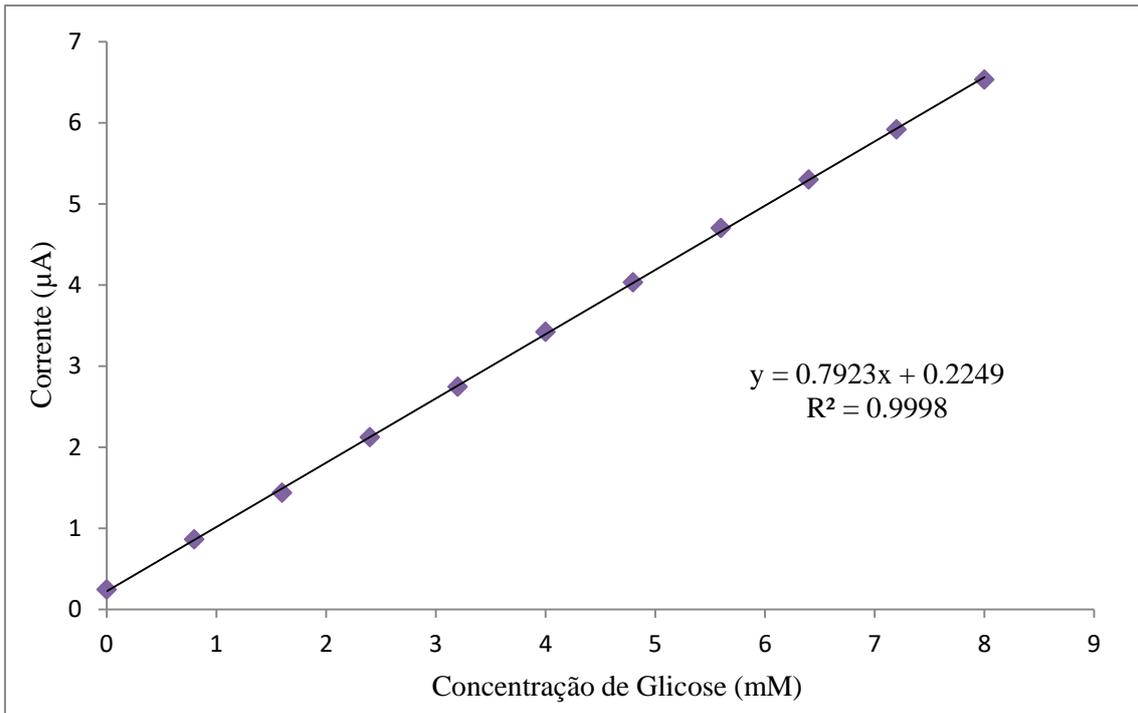


Figura A.13. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 5.

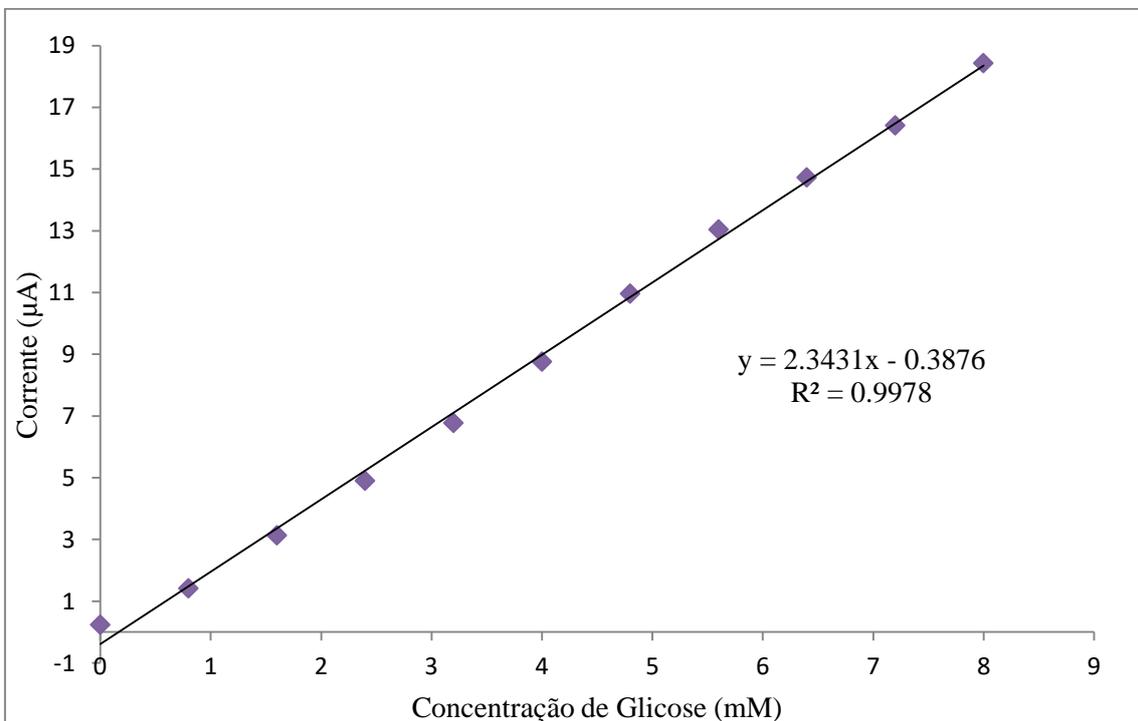


Figura A.14. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 6.

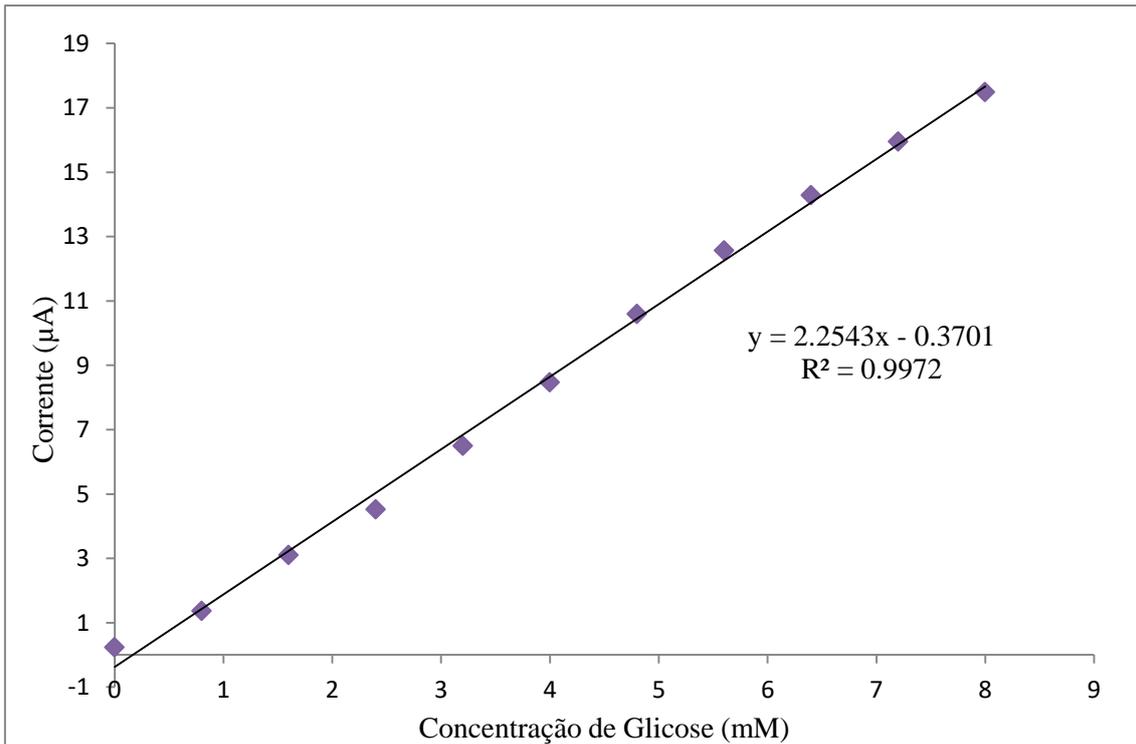


Figura A.15. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 7.

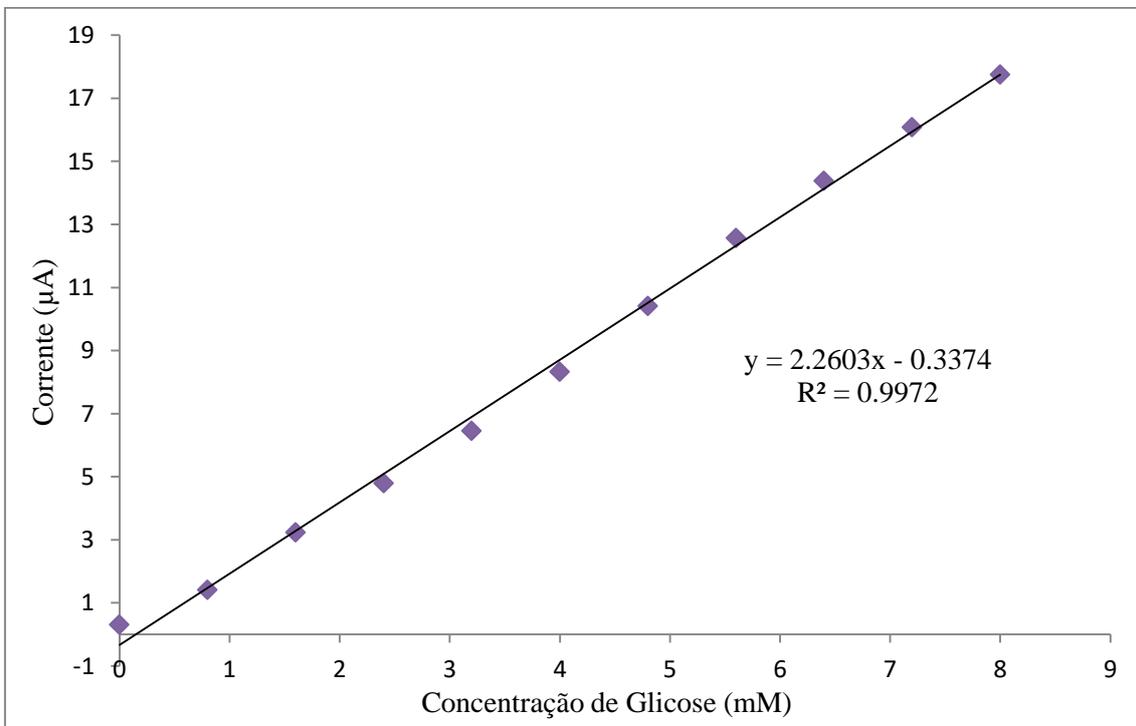


Figura A.16. Curva analítica do biossensor baseado em GOx preparado no experimento 8.