



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 – Fax: (35) 3299-1063



CARLA NEVES TOLEDO

**VOLTAMETRIA DIRETA DE MIOGLOBINA IMOBILIZADA EM
ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM POLIMETIL
METACRILATO COM BLOCO DE POLI-2-DIMETILAMINOETIL
METACRILATO (PMMA-BLOCO-PDMAEMA)**

Alfenas-MG
2012

CARLA NEVES TOLEDO

**VOLTAMETRIA DIRETA DE MIOGLOBINA IMOBILIZADA EM
ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM POLIMETIL
METACRILATO COM BLOCO DE POLI-2-DIMETILAMINOETIL
METACRILATO (PMMA-BLOCO-PDMAEMA)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Alfenas-MG
2012

Toledo, Carla Neves.

Voltametria direta de mioglobina imobilizada em eletrodo de ouro modificado com polimetil metacrilato com bloco de poli-2-dimetilaminoetil metacrilado (PMMA-bloco-PDMAEMA) / Carla Neves Toledo. - 2012.
60 f. -

Orientador: José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2012.

Bibliografia.

1. Termodinâmica. 2. Proteína. 3. Polímeros. 4. Voltametria. 5. Mioglobina.
I. Silva, Maurício Schneedorf Ferreira da. II. Título.

CDD: 541

CARLA NEVES TOLEDO

**VOLTAMETRIA DIRETA DE MIOGLOBINA IMOBILIZADA EM
ELETRODO DE OURO MODIFICADO COM POLIMETIL
METACRILATO COM BLOCO DE POLI-2-DIMETILAMINOETIL
METACRILATO (PMMA-BLOCO-PDMAEMA)**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico- Química.

Aprovada em: 31/07/2012

Profº Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG

Assinatura:

Profº Dr. Túlio Matencio

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais-UFGM-MG

Assinatura:

Profª Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Instituição: Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG

Assinatura:

Alfenas-MG
2012

Dedico a Deus, ao meu esposo, as minhas filhas, aos meus pais, a minha madrinha e meus amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado força;

Ao meu orientador Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, pelo apoio, orientação, pelo conhecimento que transmitiu, pelo exemplo que legou e incentivo durante a realização deste trabalho.

A UNIFAL-MG pela pós-graduação;

Em especial a minha família pelo estímulo e compreensão nas horas de ausência, em especial minhas filhas Thayná e Júlia e meu esposo Douglas;

Aos meus amigos da Pós-Graduação pela amizade;

Às amigas especiais: Ariane, Bianca, Ludimila, Cláudia por me mostrarem o verdadeiro valor da amizade.

Aos funcionários e professores do laboratório de bioquímica;

Aos professores que contribuíram neste trabalho;

E a todos aqueles não citados, mas que acreditaram, verdadeiramente, na minha capacidade e àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

A termodinâmica de proteínas está intimamente relacionada com mudanças entre as diferentes formas de energia e também com o estudo das transformações de energia que acompanham fenômenos físico-químicos. As interações entre o reagente e a superfície eletródica são importantes para a determinação da cinética de transferência eletrônica. Neste trabalho, avaliou-se a modificação de um substrato de ouro com PMMA-b-PDMAEMA e ligação com glutaraldeído, seguido por imobilização de mioglobina de sangue equino como modelo de interação. Nos experimentos eletroquímicos, a interação foi obtida por gotejamento da proteína na superfície do ouro, seguindo da adição do copolímero e agente bifuncional glutaraldeído (Glu). Uma segunda etapa deste trabalho consistiu da análise termodinâmica do sinal voltamétrico de mioglobina imobilizada, por varredura térmica em cela termoquímica não-isotérmica. A interação entre Mb/PMMA-b-PDMAEMA/GLU foi investigada por voltametria cíclica, por meio da mensuração de parâmetros, tais como: constante de estabilidade, cinética de transferência de carga, determinação da atividade eletrocatalítica de H₂O₂ efeito da temperatura. O efeito do pH também foi avaliado por voltametria, bem como a estabilidade e reprodutibilidade do biosensor. A voltametria cíclica da interação do complexo Mb/PMMA-b-PDMAEMA/GLU exibiu um processo de reação quase-reversível na superfície do eletrodo de ouro modificado controlado por voltametria de camada delgada com potencial de oxidação e de redução, com valores de 0,248 V e 0,034 V, respectivamente. O potencial padrão (E⁰) foi de 0,180V. O coeficiente de transferência de carga assumiu um valor de α de aproximadamente 0,40 ± 0,01. Os valores de K_s obtidos sugerem que a cinética é lenta, entretanto variou com a velocidade, reforçando a quase-reversibilidade da reação. O efeito do pH revelou valores que confirmam que o processo de transferência eletrônica ocorreu na proporção de 2 elétrons para um próton. Complementarmente, houve variação de K_s com pH, reforçando a existência de prótons H⁺ durante a eletro-transferência. A constante Michaelis-Menten (K_m) aparente calculada foi de 115 μM, representando uma alta atividade catalítica para o H₂O₂. A média da concentração da área de superfície calculada foi de 9,8 x 10⁻¹¹ ± 1,13 x 10⁻¹¹ mol/cm², não se observando variações significativas com o aumento da velocidade. Os valores encontrados de ΔS⁰ e ΔH⁰ foram respectivamente 351,3 ± 0,0002 J mol⁻¹K⁻¹ e -76831,9 ± 0,8 KJ/mol. A média da área eletroativa obtida foi de 1,146 cm² ± 0,1371 cm². Em suma, os resultados obtidos podem ser úteis para a compreensão de proteínas imobilizadas, abrindo perspectivas para estudo mais aprofundado para determinação de parâmetros eletrocinéticos sob variação de temperatura.

Palavras-chave: Termodinâmica. Proteína. Polímeros. Voltametria. Mioglobina

ABSTRACT

Myoglobin was immobilized in the reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) copolymer poly(methylmethacrylate)-block-poly[(2-dimethylamino)ethyl methacrylate]-PMMA-block-PDMAEMA polymer. Cyclic voltammograms gave direct and slow quasi-reversible heterogeneous electron transfer kinetics between Mb-PMMA-block-PDMAEMA modified electrode and the redox center of the protein. The values for heterogeneous electron transfer constant (K_s) and transfer coefficient (α) were determined to be 0.055 ± 0.01 and 0.81 ± 0.08 , respectively. The pH dependence of the formal potential of Mb suggested that protonation accompanies a two electron transfer to Mb. The reduction potential determined as a function of temperature (20-55 °C) revealed a value of reaction center entropy of ΔS^0 of $351.3 \pm 0.0002 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ and enthalpy change ΔH^0 of $-76831.9 \pm 0.8 \text{ KJ/mol}$, suggesting solvent effects and charge ionization atmosphere involved in the reaction. The immobilized protein also exhibit an electrocatalytical response to reduction of hydrogen peroxide, with an apparent K_m of $114.7 \pm 58.7 \text{ } \mu\text{M}$. The overall results substantiates the design and use of RAFT polymers towards to the development of third generation biosensors.

Keyword: Thermodynamics. Protein. Voltammetry. Myoglobin. Copolymers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - a área do eletrodo (cm^2)

Ag/AgCl - Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

ΔH° - variação de entalpia

ΔG° - energia de Gibbs

ΔE_p - variação do potencial de pico

ΔS° - variação de entropia

Co - concentração da espécie oxidada

Cr - concentração da espécie reduzida

CV - Voltametria cíclica

Do - coeficiente de difusão (cm^2s^{-1})

E - potencial do eletrodo

E° - potencial padrão da reação

E_{eq} - potencial de equilíbrio

E_p - potencial de pico

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ / $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ / $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ - Ferro/Ferri cianeto de potássio

F - constante de Faraday (96, 487 C. mol^{-1})

Glu - Gluteraldeído

Hb - hemoglobina

i - corrente do eletrodo

i_a - corrente anódica

i_c - corrente catódica

i_o - densidade de corrente

I_p - corrente de pico

K - constante de equilíbrio

K_m - constante de Michaelis- Menten

K_s - coeficiente de heterogeneidade padrão

L - Cys- cisteína

Mb - mioglobina

n - número de mols de elétrons transferidos na reação

Ox - forma oxidada

PMMA-b-PDMAEMA- polimetil metacrilato com bloco de poli-2-dimetilaminoetil metacrilato

PG - eletrodo de grafite pirolítico

pH - potencial hidrogeniônico

pO₂ - pressão parcial de oxigênio

Pt - platina

R - constante dos gases (8,31J.mol⁻¹K⁻¹)

RAFT - técnica de polimerização (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação)

SAM's - monocamadas auto-organizadas

T - temperatura absoluta, em Kelvin

V - frequência

v - velocidade de varredura

V - volts

VIS - região espectral de comprimento de onda visível

UV - região espectral de ultravioleta

λ - comprimento de onda (nm)

α- coeficiente de eletro-transferência

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da cadeia globínica e o grupo heme da mioglobina.....	4
Figura 2. Grupo prostético heme que é constituído de uma protoporfirina e um átomo de ferro central	5
Figura 3. Ciclovoltamograma, (a)de eletrodo de ouro em solução de Mb e L-Cys,(b) eletrodo de ouro em tampão fosfato pH 6,7, (c) eletrodo de ouro e L-Cys em tampão fosfato pH 6,7 (d), eletrodo de ouro e L-Cys em solução de Mb após CV com taxa de varredura 100 mV/s	6
Figura 4. Ciclovoltamograma para sistema reversível, onde E é o potencial, I a corrente, I _{pa} a corrente anódica, I _{pc} a corrente catódica, A o início do potencial de redução, B o pico de redução e C a início da oxidação	8
Figura 5. Curva potencial de corrente para um sistema reversível, demonstrando que a taxa de transferência de elétrons assume valores limitante, $C_o = C_r$, e $\alpha = 0,5$. As linhas pontilhadas mostram os componentes I _c e I _a	9
Figura 6. Representação esquemática das principais técnicas de imobilização (adaptado da referência 35)	17
Figura 7. Estrutura química do PMMA-b-PDMAEMA sintetizado pela técnica de RAFT	22
Figura 8. Eletrodo de trabalho utilizado durante os experimentos.....	26
Figura 9. Célula eletroquímica utilizada nos experimentos. A célula era composta de três eletrodos: contra eletrodo (fio Pt), eletrodo de trabalho (Au modificado) e de referência.....	28
Figura 10. Representação da célula eletroquímica acoplada ao banho ultratermostático e ao sistema jaquetado, utilizada nos experimentos de variação de temperatura de Mb imobilizada	31
Figura 11. Voltamograma cíclico do eletrodo de Au em 0,5 mol.L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ a 20mVs ⁻¹ , 25 ciclos	33
Figura 12. Voltamograma cíclico de tampão fosfato e Mb/PMMA-b-PDMAEMA em eletrodo Au. Velocidade de varredura 100 mV.s ⁻¹	37
Figura 13. Voltamograma cíclico de Mb/PMMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4 nas velocidades de varredura de 20; 40; 60; 80; 130; 160; 200 mVs ⁻¹	37

Figura 14. Efeito da variação do quadrado da taxa de velocidade de varredura na intensidade de corrente de pico de Mb/MMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato 0,1 mol.L pH 7,4	39
Figura 15. Efeito da taxa de velocidade de varredura na corrente de pico de Mb/PMMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4.....	39
Figura 16. Representação duplo-logaritmo de velocidade de varredura e corrente de pico, para a cinética de transferência eletrônica em Mb-PMMA-b-PDMAEMA	40
Figura 17. Dependência do potencial de pico Ep com o logaritmo da taxa de velocidade de varredura (v) de Mb 15 μmol.L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4.....	41
Figura 18. Dependência do potencial de pico com logaritmo da corrente de pico de Mb 15 μmol.L ⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 7,4.....	42
Figura 19. Efeito da variação de pH no potencial formal padrão encontrado para Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito suporte de tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L ⁻¹	44
Figura 20. Reposta da variação da concentração de H ₂ O ₂ sobre o eletrodo de Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito suporte de tampão fosfato sódio 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4	45
Figura 21. Representação de Lineweaver-Burk da resposta da variação de H ₂ O ₂ sobre o eletrodo de Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito suporte de tampão fosfato sódio 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4	46
Figura 22. Gráfico de E ^o vs temperatura (K) para Mb/PMMA-b-PDMAEMA em ensaio termodinâmico não-isotérmico. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito suporte de tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4.....	48
Figura 23. Gráfico de Gibbs-Helmholtz para Mb/PMMA-b-PDMAEMA/GLU em ensaio termodinâmico não-isotérmico. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , eletrólito suporte de tampão fosfato 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4.....	48
Figura 24. Efeito do tempo de estocagem do biossensor Mb/PMMA-b-PDMAEMA sobre a corrente de pico anódica em tampão fosfato sódio 0,1 mol.L ⁻¹ , pH 7,4. Velocidade de varredura de 100 mV.s ⁻¹ , temperatura de ensaio de 25°C.....	49

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Referencial teórico	3
2.1 Mioglobina	3
2.2 Voltametria	7
2.2.1 Voltametria de proteínas.....	12
2.2.2 Voltametria de proteínas imobilizadas na superfície do eletrodo.....	14
2.3 Técnicas de imobilização de proteínas	16
2.3.1 Adsorção física	17
2.3.2 Filmes delgados	17
2.3.3 Microencapsulamento.....	17
2.3.4 Ligação covalente	18
2.4 Copolímeros sintéticos	18
2.4.1 Polímeros RAFT.....	19
2.4.2 Copolímero PMMA-block-PDMAEMA.....	21
3. Justificativa	23
4. Objetivos.....	24
4.1 Principal.....	24
4.2 Específicos.....	24
5. Metodologia.....	25
5.1 Reagentes.....	25
5.2 Equipamentos	25
5.3 Calibração do sistema potenciostato-galvanostato	26
5.4 Cella eletroquímica.....	26
5.5 Limpeza dos eletrodos de trabalho	27
5.6 Caracterização eletroquímica da superfície de eletrodo de Au	28
5.7 Teste dos eletrodos com sonda de ferro/ferricianeto de potássio	28
5.8 Preparo da solução de mioglobina.....	28
5.9 Espectrofotometria de Mb	29
5.10 Montagem do sistema de voltametria de mioglobina.....	29
5.11 Imobilização da proteína na superfície dos eletrodos.....	29
5.12 Voltametria cíclica de mioglobina imobilizada.....	30

5.13 Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga	30
5.14 Estudo de variação de pH	30
5.15 Estudo da atividade catalítica de H ₂ O ₂	30
5.16 Ensaio termodinâmico de Mb imobilizada	30
5.17 Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do biosensor	31
5.18 Análise de dados	31
6. Resultados e discussão	33
6.1 Determinação da pureza de Mb	33
6.2 Pré-tratamento de eletrodo	33
6.3 Cálculo de concentração de Mb eletroativa na superfície do eletrodo de Mb-PMMA-b-PDMAEMA	34
6.4 Efeito da velocidade de varredura	35
6.5 Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga	40
6.6 Efeito da variação de pH	43
6.7 Determinação da atividade eletrocatalítica de Mb sobre H ₂ O ₂	44
6.8 Efeito da temperatura	46
6.9 Determinação da estabilidade do biossensor	49
6.10 Mecanismo proposto de formação do biossensor de PMMA-b-PDMAEMA	49
7. Conclusão	52
Referências	53

1. Introdução

A busca pelo uso de metodologias que permitam análises químicas, bioquímicas e biológicas de forma simples, rápidas, de baixo custo e com a mínima sofisticação de pré-tratamentos, ainda é um grande desafio e continua sendo o foco de inúmeras pesquisas. Nesse sentido, a área de sensores químicos está em constante crescimento, uma vez que os sensores possuem grande sensibilidade e capacidade de monitoração, além de aplicação em inúmeros procedimentos específicos que permitem o controle de processos bioquímicos [1]. Dentro desse contexto, as pesquisas atuais têm como foco principal minimizar os interferentes, tais como: a passivação gradual da superfície eletródica, adsorção de produtos da reação redox, que podem polimerizar e depositar sobre a superfície do eletrodo. Assim, surgem os eletrodos quimicamente modificados, cuja função principal é a simplificação de procedimentos tradicionais, além de minimizar os fatores acima [2]. Para o desenvolvimento de biosensores formados por proteínas e enzimas, existem vários procedimentos utilizados no processo de imobilização amplamente empregados, como o uso de polímeros, matriz sol-gel, monocamadas auto-organizadas (SAM's), membranas lipídicas e nanomateriais [3]. A estabilidade de uma proteína depende exclusivamente do ambiente termodinâmico em que se encontra, enquanto que sua termoestabilidade depende de interações específicas entre seus resíduos de aminoácidos e esses com o solvente, ficando evidente quando os fatores de entalpia e entropia se alteram, incidindo diretamente sobre as propriedades funcionais do polipeptídeo. Com o intuito de reproduzir biosensores de natureza proteica, com robustez e confiabilidade, é essencial a comunicação eficaz entre as biomoléculas e a superfície eletródica. Essa última etapa é fundamental no desenvolvimento desses dispositivos. São conhecidas inúmeras técnicas para imobilização de proteínas, sendo as mais comuns a ligação covalente, a ligação covalente cruzada, a adsorção física, o encapsulamento, parte das quais com o uso de polímeros naturais ou sintéticos. Nesse sentido, a utilização de polímeros e de copolímeros tem sido bastante utilizada, de modo que se torna peculiar a discussão acerca do processo de eletro-transferência envolvido [4]. Copolímeros sintetizados pela técnica conhecida por RAFT (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação), podem ser de grande valia no sentido acima, dada a flexibilidade ajustável de suas propriedades físico-químicas finais no processo de síntese, direcionando-as às especificidades de imobilização de determinada proteína (como rede

de carga líquida, interação com solvente, potencial de oligomerização, entre outros). A fim de testar a possibilidade de emprego de polímeros RAFT para a construção de biosensores, foi utilizado neste trabalho o copolímero polimetil metacrilato com bloco de poli-2-dimetilaminoetil metacrilato (PMMA-bloco-PDMAEMA). O copolímero foi empregado em ligação cruzada com o reagente bifuncional gluteraldeído, para a imobilização e estudo eletroanalítico de mioglobina equina como proteína modelo, e pela técnica de voltametria cíclica.

2. Referencial Teórico

2.1 Mioglobina

A mioglobina, Mb, é uma proteína monomérica de 153 resíduos de aminoácidos, e com a estrutura terciária formada por 8 α -hélices, classificadas alfabeticamente (Figura 1), formando a estrutura compacta característica da proteína [5]. Em 1958, Max Perutz e John Kendrew determinaram a estrutura da mioglobina por cristalografia de raios X. A mioglobina apresenta uma estrutura “dobrada” extremamente compacta devido à cadeia polipeptídica, e com dimensões de aproximadamente 4,5 x 2,5 nm [6]. Não existe espaço livre na molécula devido às fortes ligações que formam a estrutura compacta. Aproximadamente, 80% de seus resíduos são encontrados em conformações α -hélice [6]. A posição do grupo heme é espectroscopicamente identificada devido à ligação do átomo de ferro. Além disso, a estrutura da mioglobina confirma o particionamento de cadeias hidrofóbicas e hidrofílicas.

No interior da proteína existe um grupo prostético denominado por grupo heme, circundado quase que inteiramente por resíduos não-polares [7]. Dessa forma, os grupos hidrofóbicos situam-se no interior da proteína, com consequente efeito hidrofóbico desempenhando um papel efetivo na manutenção da estabilidade nativa dessa proteína. A mioglobina se liga ao oxigênio no tecido muscular por meio de um átomo de ferro (Fe^{2+}) de seu grupo prostético (heme). A interação do heme com a mioglobina dificulta que a oxidação do ferro ocorra, liberando sua ação para o transporte de oxigênio. O grupo heme é constituído por um anel de porfirina ligado com Fe^{2+} , sendo responsável pelas propriedades de ligação de oxigênio da mioglobina. O grupo heme se liga de forma não-covalente à mioglobina. O anel de protoporfirina possui quatro átomos de nitrogênio, conforme apresentado à Figura 2. O átomo de ferro pode formar duas ligações adicionais, um de cada lado do plano heme. Esses sítios de ligação são chamados, respectivamente de penta e hexa-coordenação. Na mioglobina, o quinto sítio de coordenação é ocupado pelo anel imidazólico de um resíduo de histidina na proteína. Essa histidina é denominada de histidina proximal.

Portanto, através da hexa-coordenação que a Mb irá combinar ao oxigênio [1]. Adici-

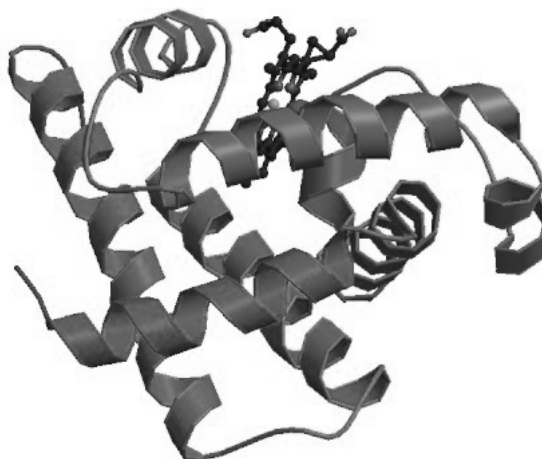


Figura 1: Representação da cadeia globínica e o grupo heme da mioglobina. Fonte: (Protein Data Bank (Brookhaven National Laboratory; <http://www.rcsb.org/pdb>), sob o código 1MBO. Acessado em: 17 dez. 2011).

onalmente, a Mb pode estar combinada ao oxigênio livre, denominando-se por oximioglobina, ou na forma na qual o oxigênio molecular encontra-se desligado, chamada então por deoximioglobina. Apesar do processo de ligação reversível do oxigênio ocorrer diretamente ao átomo de ferro do grupo heme, a ligação do oxigênio pela mioglobina não ocorre de maneira cooperativa, como no pigmento quaternário da hemoglobina [1]. A mioglobina apresenta uma alta afinidade pelo oxigênio observado pelas curvas de ligação ou perfis que são registrados na fração de saturação do oxigênio (expressa como pressão parcial de oxigênio (pO_2)). A curva de ligação da mioglobina com o oxigênio é hiperbólica e rapidamente atinge o nível de saturação, em torno de 30 torr [8]. Embora a função fisiológica da Mb não seja a de uma transportadora de elétrons, ela sofre o processo de oxido-redução. Portanto, essa reação de transferência de elétrons desempenha um papel essencial nos processos biológicos. Isso faz da Mb um modelo para o estudo da eletro-transferência de reações de proteínas contendo grupo heme, biosensoriamento e eletrocatalise [9]. De modo geral, a eletroquímica de Mb tem sido elucidada usando-se eletrodos de mercúrio gotejante, bem como eletrodos de pasta de carbono e eletrodos de ouro quimicamente modificados [10].

Como modelo, a mioglobina é uma proteína bastante empregada em estudos de reações de eletro-transferência devido 1) à facilidade de obtenção, 2) ao custo moderado, 3) à es-

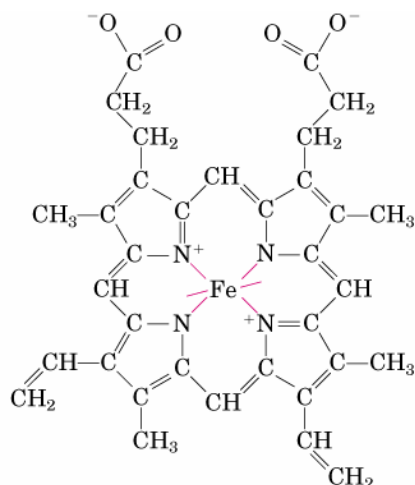


Figura 2: Grupo prostético heme, constituído por um sistema protoporfirina e um átomo de ferro central [1].

trutura química conhecida, 4) à massa molecular relativamente baixa (massa molecular de $616,487 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 5) à relativa facilidade de transferência de carga, 6) a inúmeros trabalhos descritos na literatura e, 7) devido a presença de aminas primárias na sua estrutura, tornando fundamental para crosslinking com gluteraldeído [5]. A transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e a proteína, evitando etapas intermediárias, constitui um biosensor de terceira geração [9]. São vários os métodos de modificação da superfície eletródica para promover uma imobilização adequada do material biológico garantindo-se assim, a funcionalidade do sensor, com um tempo de vida maior. Para permitir a rápida transferência de elétrons, as moléculas da proteína devem formar monocamadas sobre o eletrodo [11]. HU e colaboradores [10], visando melhorar a transferência de elétrons de Mb, relataram o uso de mediadores e promotores quimicamente modificados na elaboração de eletrodos. Estudos de eletroquímica de Mb usando surfactantes, tais como membranas lipídicas e filmes poliméricos, demonstraram que essas materias podem aumentar a taxa de transferência de elétrons entre a proteína e a superfície do eletrodo [9]. Exemplificando, a Figura 3 apresenta um ciclovoltagemograma de Mb tratado com L-Cys utilizando eletrodo de ouro modificado em tampão fosfato $0,1\text{M}$ pH $6,7$ [12]. Outros estu-

dos relatam que Mb incorporada em filmes poliméricos adsorvidos a eletrodos de grafite pirolítico, PG, apresentaram picos ciclovoltagemétricos quase reversível para o Fe Mb (III) / Fe (II), demonstrando que a transferência de elétrons entre Mb e eletrodos de PG foi facilitada na presença de filme [9]. Eletroquímica direta de Mb imobilizada foi também descrita utilizando-se eletrodo de carbono vítreo modificado com poros de sílica [10]. Picos redox correspondentes a redução de Fe (III) para Fe (II) de Mb foram também observadas [10]. Peng e colaboradores [9] utilizaram eletrodo de pasta de carbono modificada com nanopartículas magnéticas para promover a adequada imobilização de Mb, constituído um biosensor em plataforma de detecção. Os autores atribuíram essa rápida transferência eletrônica às propriedades das nanopartículas magnéticas.

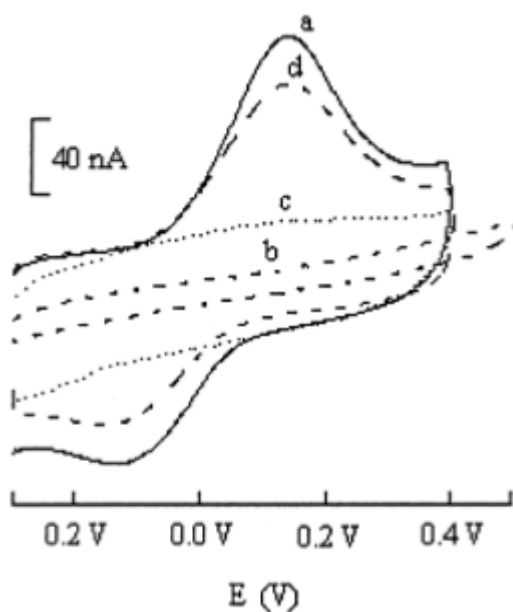


Figura 3: Ciclovoltagemogramas (a) de eletrodo de ouro em solução de Mb e L-Cys, (b) eletrodo de ouro em tampão fosfato pH 6,7, (c) eletrodo de ouro e L-Cys em tampão fosfato pH 6,7 (d), eletrodo de ouro e L-Cys em solução de Mb após um registro de CV. Taxa de varredura 100 mV.s^{-1} [12].

É conhecido que a eletro-transferência direta de Mb baseia-se na reação de um elétron acoplado a um próton [10]. A eletro-transferência pode ser facilitada, dependendo da biomolécula, de qual procedimento utilizado e da maneira como a proteína é imobilizada [9].

2.2 Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia em fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície [13]. É uma técnica classificada como dinâmica. Essa técnica compreende um grupo de métodos eletroanalíticos em que a informação sobre o analito é observada por meio de medidas de corrente em função do potencial aplicado [14]. Um exemplo de processo eletroquímico que ocorre na interface eletrodo-solução está representado na equação abaixo:



onde Ox é a forma oxidada, Red é a forma reduzida e ne^- o número de elétrons envolvidos no processo de oxido-redução.

A magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxiredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na cela eletroquímica. Dentre as técnicas voltamétricas, podem-se destacar a voltametria de varredura linear, a voltametria por pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada, a voltametria cíclica, a voltametria de redissolução e a voltametria adsortiva de redissolução [15]. A voltametria é muito utilizada na química inorgânica, na físico-química e na bioquímica para estudos fundamentais de processos de redução e oxidação, processos de adsorção em superfícies e mecanismos de transferências de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados. As aplicações analíticas nas áreas ambiental, industrial e médica, entre outras, são também variadas [13]. A voltametria cíclica é provavelmente uma das técnicas eletroquímicas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas em solução ou imobilizadas sobre eletrodos, fornecendo informações tanto quantitativas quanto qualitativas sobre o sistema. Isso tem resultado num extensivo uso da voltametria cíclica nos campos da eletroquímica. O voltamograma resultante fornece informação de uma determinada espécie como função da varredura de potencial aplicado ao sistema [16]. Operacionalmente, inicia-se a aplicação do potencial a um valor no qual nenhuma reação de oxiredução ocorra (Figura 4), com a variação desse

potencial até a promoção de uma transferência de carga entre o analito e a superfície do eletrodo, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos [17].

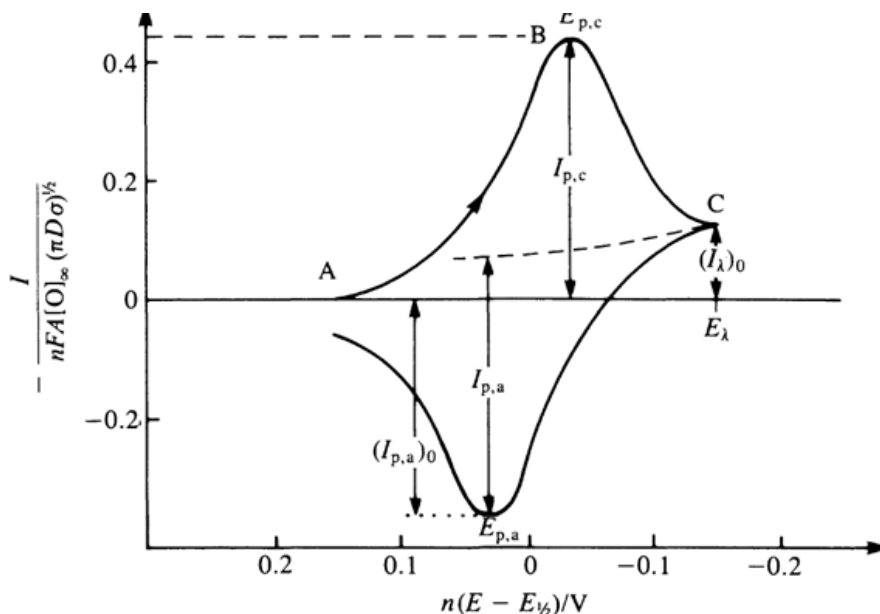


Figura 4: Ciclovoltamograma para sistema reversível, onde E é o potencial, I a corrente, $I_{p,a}$ a corrente anódica, $I_{p,c}$ a corrente catódica, A o início do potencial de redução, B o pico de redução e C o início da oxidação ([18], Fig. 9.3).

Existem dois processos principais que determinam as reações que ocorrem na superfície de um eletrodo: a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo; normalmente, podem ocorrer, também, reações químicas acopladas a alguns desses processos. A relação entre corrente e potencial pode ser expressa pela equação de Butler-Volmer abaixo, válida quando não existe limitação de transporte de massa [14]:

$$i = A \cdot i_0 \exp \left[\frac{(1 - \alpha)nF}{RT(\eta)} \right] - \exp \left[\frac{-\alpha nF}{RT(\eta)} \right] \quad (2)$$

Nesse formalismo essencial da eletroquímica, i representa a corrente que perpassa o eletrodo de trabalho; i_0 corrente de troca (A/m^2); E potencial do eletrodo (V); E_{eq} o

potencial de equilíbrio (V); A , a área de superfície do eletrodo (cm^2); T , a temperatura absoluta (K); n , número de elétrons envolvidos na reação; F , a constante de Faraday; R , a constante universal dos gases, e α , o coeficiente de transferência de carga. O valor de α , normalmente entre 0,3 e 0,7 (ótimo em 0,5 para processos puramente reversíveis), é representativo da barreira de energia de ativação para um processo de simples transferência de elétron [16] (cap. 3).

A corrente depende tanto do potencial operacional como da concentração da superfície de cada forma redox (oxidação-redução). A Figura 5 mostra as curvas do potencial de corrente para condições reversíveis, onde $C_o(0, t) = C_r(0, t)$ e $\alpha = 0,50$. Grandes potenciais negativos aceleraram o movimento de carga no sentido catódico e também desaceleraram o movimento de carga no sentido oposto. Como resultado, o componente anódico da corrente torna-se insignificante e a corrente se funde com o componente líquido catódico. A aceleração e a desaceleração da corrente anódica e catódica não são necessariamente simétricas (como mostrado na Figura 5) e divergem para valores de α diferentes de 0,5. Da mesma forma, nenhuma contribuição da corrente catódica é observada no potencial positivo [14].

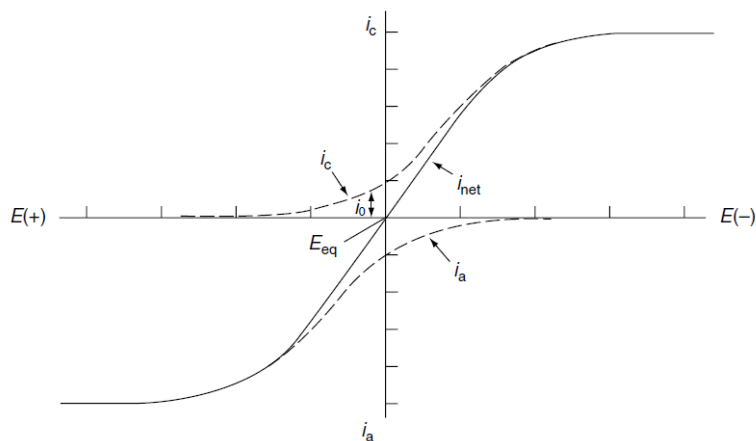


Figura 5: Curva potencial de corrente para um sistema reversível, demonstrando que a taxa de transferência de elétrons assume valores limitantes, $C_o = C_r$, e $\alpha = 0,5$. As linhas pontilhadas mostram os componentes i_c e i_a [14].

Quando uma cela eletroquímica está em equilíbrio, i_c iguala-se a i_a , correspondendo à corrente de troca i_0 . Quando niveladas pela área de superfície eletródica (A), as cor-

rentes tornam-se, respectivamente, densidade de corrente (j) e densidade de corrente de troca (j_0). A densidade de corrente de troca pode ser obtida por linearização da função de Butler-Volmer acima, e fornece resultados importantes, como o coeficiente de heterogeneidade padrão (K_s), que é a constante da velocidade de transferência de carga, ou a resistência de transferência de carga (R_{ct}) [16] (cap. 3).

Para uma reação reversível, ou seja, para uma reação que ocorre com velocidade suficiente para estabelecer um equilíbrio na interface, a equação de Butler-Volmer (equação 2) se reduz à equação de Nernst (equação 3), pois como a cinética da reação de transferência de carga é rápida (K_s menor que 10^{-1} cm.s⁻¹, onde K_s é o coeficiente cinético de heterogeneidade padrão), apenas a etapa de transferência de massa será relevante para o processo.

$$E = E^0 + \left(\frac{2,3RT}{nF}\right) \log\left(\frac{C_0}{C_R}\right) \quad (3)$$

Portanto, nos processos limitados por difusão, considera-se que a velocidade do processo de transferência do elétron é maior que a de transporte de massa. Assim, a corrente de pico do voltamograma é proporcional a raiz quadrada da velocidade de varredura. A corrente do pico, nesse caso, é dada pela equação de Randles-Sevcik abaixo [14]:

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (4)$$

Onde n é o número de elétrons envolvidos no processo; A , é a área do eletrodo (cm²); D , é o coeficiente de difusão (cm²s⁻¹); C , é a concentração da espécie em solução (mol.cm⁻³); e ν , é a velocidade de varredura de potencial aplicado (V.s⁻¹).

Portanto, nos processos limitados por difusão, considera-se que a velocidade do processo de transferência de elétrons na superfície está em equilíbrio. Nesse caso, a corrente de pico (i_p) é proporcional à concentração da espécie eletroativa, à raiz quadrada da velocidade de varredura, à área do eletrodo, e ao coeficiente de difusão, conforme a equação 4.

Sistemas eletroquímicos podem comportar-se reversivelmente ou não, o que incide

diretamente no mecanismo de transferência de elétrons, bem como no formalismo empregado para a extração de parâmetros eletroanalíticos [18] (cap. 9). Existem vários critérios para diagnosticar se um sistema eletroquímico comporta-se reversivelmente, dentre eles: 1) i_p proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura; 2) E_p independente da velocidade de varredura; 3) E_p de 28,5/n mV em 25^oC; 4) $E_p - E_p/2$ de 56,5/n mV em 25^oC, onde $E_p/2$ representa o potencial que confere metade da resposta máxima de corrente [19] (cap. 3).

Em sistemas puramente irreversíveis, ou seja, aqueles em que a taxa de transferência de carga não é alta o suficiente para manter o equilíbrio de reagentes e produtos próximos à superfície do eletrodo segundo previsto pela relação de Nernst (equação 3, o equilíbrio de transferência de elétrons não ocorre. Dessa forma, a velocidade de transferência não mantém o equilíbrio das espécies eletroativas na superfície do eletrodo. Com isso, a forma do voltamograma cíclico é modificada, podendo ocorrer uma ausência de pico na varredura reversa de potencial. Porém, essa característica não significa que o sistema seja eletroquimicamente irreversível, pois uma reação química rápida acoplada ao processo de transferência eletrônica pode estar consumindo rapidamente a espécie formada na varredura direta. A corrente de pico catódica do voltamograma para sistemas irreversíveis é dada por:

$$i_p = 2,99 \cdot 10^5 (\alpha n)^{1/2} A C D^{1/2} \nu^{1/2} \quad (5)$$

Os principais critérios eletroquímicos para detectar um sistema irreversível são: 1) ausência de pico na varredura reversa de potencial; 2) i_p proporcional à raiz quadrada da velocidade de varredura ($\nu^{1/2}$) e ao valor de α ; 3) alteração em E_p de 30/n α (mV) para variação a cada década em ν ; 4) E_p de 48/n α F mV em 25^oC [19] (cap. 4).

Para um sistema quase-reversível (com Ks entre 10⁻¹ e 10⁻⁵ cm/s [16] (cap. 3)), a corrente é dada pela transferência de carga e transporte de massa. A forma do voltamograma é uma função de Ks $\sqrt{\pi aD}$, onde $a = nF\nu/RT$. Quando Ks $\sqrt{\pi aD}$ aumenta, o processo se aproxima de um caso reversível. Para pequenos valores de Ks $\sqrt{\pi aD}$ (ou seja, ν é rápido), o sistema exibe um comportamento irreversível. Em geral, o voltamograma de

um sistema quase-reversível é mais definido e exibe uma grande distância entre os picos dos potenciais, se comparados com um sistema reversível [14].

A Figura 4 representa a forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica, em que o potencial é varrido linearmente com o tempo no eletrodo de trabalho estacionário, em uma solução sem agitação, usando-se um potencial em forma de triângulo. Durante a varredura do potencial, o potenciostato mede a corrente resultante *versus* o potencial aplicado. Porém, o potencial é aplicado na forma de escada, com degraus de potenciais pequenos (da ordem de 10 mV) e tempo de duração pequena (50 ms), em que a corrente é lida apenas no final desse intervalo. O objetivo dessa variação é conseguir minimizar a contribuição da corrente capacitiva, que é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo-solução, na corrente total. Como as etapas de potencial são pequenas, as equações para as respostas da voltametria cíclica são consideradas como idênticas às provenientes da voltametria cíclica de varredura linear [16] (cap. 3).

2.2.1 Voltametria de proteínas

A voltametria vem sendo utilizada como ferramenta de análise para o estudo direto de proteínas desde 1950. No entanto, até o final da década de 1980, esses estudos eram direcionados para a análise qualitativa de metaloproteínas, ou seja, na caracterização da transferência de elétrons entre o centro redox (metálico) da proteína e o eletrodo [20]. Neste sentido métodos voltamétricos vêm sendo cada vez mais utilizados para estudar proteínas com centro redox ativo. Estudos prévios utilizando métodos voltamétricos tornaram-se primordiais na determinação de potenciais redox em sítios de proteínas. É sabido que, com eletrodos adequados, transportadores de elétrons, tais como citocromos, ferredoxinas e proteínas contendo cobre, ferro, e enxofre entre outros elementos, resultam em respostas eletroquímicas reversíveis [21].

Investigações da eletroquímica de proteínas e de enzimas podem fornecer um bom modelo para estudos sobre a elucidação dos mecanismos de transferência de elétrons entre essas biomoléculas em sistemas biológicos. As realizações de transferência direta de elétrons entre os eletrodos e o centro redox de enzimas também têm sido aplicadas a biosensores e biorreatores de enzima [22].

Grandes esforços têm sido feitos em eletroquímica de proteína e métodos confiáveis estão sendo desenvolvidos para aumentar a eletro-transferência entre os eletrodos e proteínas. Esses estudos tem resultado em uma melhor transferência eletrônica dos centros redox proteicos, por incorporação a filmes modificados na superfície do eletrodo, como monocamadas auto-organizadas (SAM's) de moléculas, filmes de surfactante, filmes de lipídios, filmes de polímeros eletroativos, filmes de materiais sol-gel, entre outros [23].

Eletrodos enzimáticos combinam a especificidade de uma enzima a um sistema eletroquímico e têm sido usados para a detecção de vários analitos. É possível monitorar eletroquimicamente essas concentrações, num intervalo devidamente pré-estabelecido da enzima imobilizada na superfície do eletrodo [24].

Na superfície do eletrodo próxima à proteína ocorrem dois processos distintos. Inicialmente, o elétron tem que ser transferido da enzima para o substrato para formar o produto (transferência de elétrons), seguindo-se a redução do produto sintetizado (transferência de elétrons eletroquímica). Normalmente, a transferência eletroquímica de elétrons é o passo limitante e desempenha um papel crucial na transferência cinética de elétrons (processos irreversíveis ou quase-reversíveis) [25]. A maioria das proteínas não exhibe eletro-transferência direta na superfície do eletrodo. Estudos de eletroquímica direta de proteínas têm sido o foco de inúmeros trabalhos, mas poucas delas são providas de eletroquímica direta em condições experimentais otimizadas, mesmo com o rápido desenvolvimento da tecnologia na superfície e com o conhecimento atual de eletrodos quimicamente modificados [21].

As proteínas apresentam um problema específico para a eletroquímica uma vez que, devido a sua interação com os tipos mais comuns de superfícies de eletrodos, não produzem respostas eletroquímicas significativas [22]. Além disso, o processo de eletro-transferência direta entre a superfície do eletrodo e o centro redox de proteínas, sem modificação do sensor, é dificultada devido a vários fatores, tais como: a desnaturação e adsorção de proteínas sobre eletrodos, as orientações desfavoráveis no eletrodo, e passivação gradual da superfície eletródica [25], centros redox metálicos (grupos prostéticos) imersos na estrutura polipeptídica, portanto distantes da camada favorável para transferência de carga à superfície de eletrodos, e interações com solvente e solução eletrólito [18] (Cap. 17).

Não obstante, são variados os trabalhos que utilizam eletrodos não modificados em

voltametria direta de proteínas. Exemplificando, eletrodos de membrana de celulose, construídos com membranas de diálise com variados limites de exclusão e cargas, foram utilizados para investigar o comportamento eletroquímico de diversas proteínas, como Hb, citocromos, e citocromo c [26]. Foram analisados diversos fatores, tais como o tratamento da membrana, efeito de carga, espécies positivas, força iônica, pH, efeito da espessura da camada. Esse estudo demonstrou que a eletroquímica do citocromo c no eletrodo de membrana foi essencialmente regida por interações eletrostáticas favoráveis, e que outros fatores (especialmente adsorção e a presença de formas desnaturadas) não desempenharam um papel dominante.

Um dos principais objetivos da modificação de eletrodos em voltametria direta de proteínas é melhorar a capacidade de reconhecimento e amplificar sinais de corrente, aumentando também a seletividade do analito pelo efeito eletrocatalítico induzido pelo modificador [10]. Proteínas tais como mioglobina (Mb), hemoglobina (Hb) e peroxidase são as mais estudadas em voltametria direta. Qial (*et al.*) identificaram um significativo aumento da transferência de elétrons entre as proteínas e eletrodos modificados, quando comparado à transferência de carga de proteínas em solução. Esses autores incorporaram duas heme proteínas (hemoglobina e mioglobina) em micelas de lecitina para formar filmes compostos em eletrodos de pasta de carbono, e concluíram que esses filmes apresentam rápida transferência de elétrons [27].

2.2.2 Voltametria de proteínas imobilizadas na superfície do eletrodo

A produção de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da Química, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínica e ambiental, e que tem levado à crescente busca por sensores de melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade [28]. A maior proporção de trabalhos reportados na literatura enfatiza a eletroquímica direta de proteínas imobilizadas na superfície de eletrodo e os mecanismos de transferência eletrônica. A realização de transferência direta de elétrons, evitando o uso de mediadores e promotores, tem sido aplicada aos biosensores de terceira geração, tais como camadas auto-organizadas (SAM's). Nesse sentido, tem-se observada a formação espontânea de uma camada polimérica auto-organizada em substrato áurico, resultando em uma

estrutura ordenada e orientada [29]. A natureza da ligação tem sido correlacionada à quimiossorção na superfície do ouro, por ligações com caráter covalente, com consequente aumento da estabilidade das monocamadas formadas [29].

A aplicação de modificação eletródica tem sido muito explorada, visto que monocamadas bem organizadas e compactas oferecem vantagens tais como seletividade, sensibilidade, curto tempo de resposta e potencial reduzido em aplicações eletrocatalíticas. A literatura têm demonstrado que a modificação da superfície eletródica pode afetar sensivelmente a velocidade de transferência eletrônica entre compostos eletroativos e o eletrodo [30].

A aplicação de SAM's em eletroquímica tem sido muito explorada, visto que monocamadas bem organizadas e compactas oferecem vantagens tais como seletividade, sensibilidade, curto tempo de resposta e potencial reduzido em reações eletrocatalíticas [30]. Nesse sentido, Sato *et al.* evidenciaram a resposta redox de Mb utilizando eletrodo de pasta de carbono modificado com óxido de poli-etileno (PEO) [31]. Imobilização de Mb e Hb utilizando polímero hidrofílico foi utilizada por Forero *et. al* [32] no desenvolvimento de biosensores. Nesse estudo, foram utilizadas duas técnicas distintas de imobilização, a adsorção e o aprisionamento. A técnica de adsorção apresentou alta resposta de imobilização de Mb, e os autores atribuíram essa resposta à interação com o polímero de DMAEM-dimetil etil amino metacrilato. Xie *et al.* [33] investigaram a atividade eletroativa de Mb utilizando o copolímero óxido de polipropileno, com a formação de um filme na superfície do eletrodo. Com as técnicas de voltametria cíclica e com microbalança de cristal de quartzo, os pesquisadores caracterizaram o biosensor, que exibiu picos reversíveis e boa atividade catalítica [33].

O uso de promotores pode ser utilizado para aumentar a taxa de transferência de elétrons entre as proteínas e a superfície de eletrodos. Assim, Zang *et al.* [25] investigaram a transferência direta de elétrons de catalase imobilizada em uma fina película de sílica de sol-gel na superfície do eletrodo de ouro, e monitoramento na presença de L-cisteína. Os eletrodos modificados podem ser fabricados de forma fácil e simples em uma única etapa. Varma *et al.* realizaram um estudo da cinética de catalase, com eletrodo de Pt modificado com celulose e PTFE (politetrafluoretileno) utilizando a técnica de voltametria cíclica (CV). Os autores concluíram que a eletro-transferência ocorreu de maneira satisfatória, reforçando o conjunto de trabalhos que apresentam o uso de media-

dores como de significativa importância para viabilizar ou otimizar o desenvolvimento de diversos biosensores [24].

2.3 Técnicas de Imobilização de Proteínas

Até a metade da década de 70, grande parte dos eletrodos utilizados em voltametria consistiam de eletrodos convencionais como platina, mercúrio, ouro e carbono, desprovidos de modificações superficiais [28]. As principais desvantagens encontradas envolviam fenômenos de adsorção do analito na superfície do eletrodo, baixas velocidades de algumas reações eletroquímicas, e o alto custo desses materiais nobres para aplicação prática em larga escala. Verificou-se, posteriormente que essas desvantagens poderiam ser controladas, favorecendo assim o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados para várias aplicações. O desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados (EM) tem sido de crescente interesse nas áreas de ciências e tecnologia, com utilização em diversos campos, tais como: eletrocatalise, síntese orgânica, conversão de energia solar, cinética de transferência de elétrons, permeação de membranas e sensores químicos [28]. Uma variedade de métodos tem sido então empregada na modificação de eletrodos, dentre as quais destacam-se 1) aplicação de filmes poliméricos na superfície do eletrodo, alterando as propriedades de transporte, 2) utilização de materiais biológicos junto à superfície do eletrodo, 3) mediadores que favoreçam a transferência de elétrons à superfície do eletrodo [34], entre outros. São diversas também as variações experimentais para a aplicação de tais procedimentos. A principal vantagem dos filmes poliméricos, por exemplo, reside no fato de que os mesmos podem também atuar como barreira para excluir interferentes, como Nafion para a determinação mutuamente exclusiva de dopamina sem a interferência de ácido ascórbico [34]. Da mesma forma, há uma variedade de métodos para imobilização de proteínas em superfície de eletrodos. Dentre os procedimentos mais comuns destacam-se 1) a adsorção física, 2) a ligação covalente (*cross-linking*), 3) a ligação covalente cruzada com matriz polimérica, e 4) o encapsulamento em matrizes, entre outros. A escolha do melhor método depende de vários fatores, como solubilidade, estabilidade, temperatura e aplicabilidade do produto [35]. A Figura 6 exemplifica as principais técnicas de imobilização.

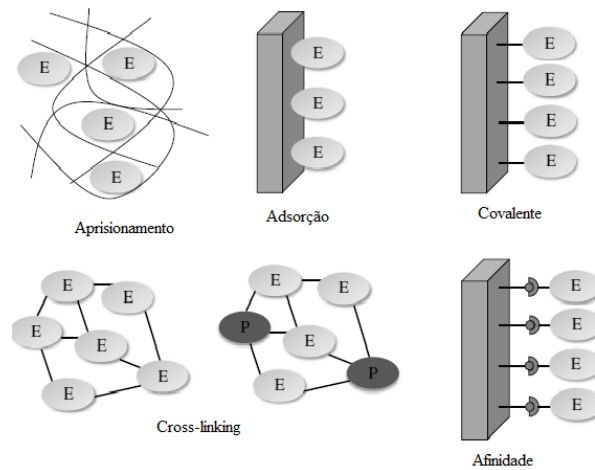


Figura 6: Representação esquemática das principais técnicas de imobilização (adaptado da referência) [35].

2.3.1 Adsorção Física

A adsorção física envolve a adsorção de moléculas em suportes insolúveis que resulta em interações do tipo polar, iônica, Van der Waals, ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas. A adsorção é um método bastante simples, mas geralmente é pouco utilizada devido ao fato de proporcionar aparatos pouco sensíveis. Pode também envolver perda de material e tempo de vida muito curto do biosensor, pois a união é considerada fraca [16] (cap. 3).

2.3.2 Filmes delgados

A imobilização de espécies moleculares sobre o sensor por técnicas citadas pode levar ao recobrimento de uma ou, no máximo, poucas monocamadas (SAM's). Dessa forma o recobrimento com filmes poliméricos têm sido amplamente utilizado por permitir a imobilização de camadas da biomolécula, resultando no aumento da resposta eletroquímica. De acordo com a aplicação desejada, os polímeros inertes, quimicamente ativos e ou polímeros eletroativos podem ser utilizados [36].

2.3.3 Microencapsulamento

Nesse método, o biomaterial é confinado entre membranas, ficando a biomolécula aprisionada dentro de uma matriz polimérica. Essa técnica é também apropriada para processos que envolvam substratos e produtos de baixa massa molecular apresentando problemas para substratos e produtos de maiores massas moleculares. Esse processo pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes [10].

2.3.4 Ligação Covalente

A imobilização é realizada por meio de ligações covalentes de grupos funcionais não reativos e de grupos funcionais reativos (hidroxila, amino, fenólico) ligados à superfície do suporte. A desvantagem desse tipo de imobilização é que ela provoca estresse na proteína, podendo causar alterações conformacionais, que resultam em perda de atividade catalítica. Complementarmente, essa técnica apresenta inúmeras vantagens, como forte ligação entre a proteína e o suporte; aumento de estabilidade térmica; menor susceptibilidade a problemas decorrentes de variações recorrentes de pH, solvente e temperatura [16] (cap. 3). Adicionalmente, podem ser utilizados reagentes bifuncionais como, por exemplo, gluteraldeído, que reage com o grupo amino, formando ligações cruzadas o que permite a imobilização de biomoléculas na superfície polimérica [35]. As ligações cruzadas de proteínas geralmente levam à formação de filmes proteicos com propriedades de hidrogel. Quando ligações covalentes são incorporadas ao hidrogel, um filme compacto e estável é formado. Para formação do filme, carbodiimidas são geralmente utilizadas, onde se unem com aminas primárias resultando na formação de ligações imidas [34]. Portanto, essa imobilização consiste na formação de ligações químicas cruzadas entre os grupos amino do suporte, e com os grupos amino das biomoléculas [11].

2.4 Copolímeros sintéticos

Polímeros são materiais constituídos a partir de unidades repetidas de monômeros, originando um composto com alto peso molecular. Os polímeros podem ser obtidos de forma natural ou sintética. Copolímeros são polímeros constituídos de diferentes unidades de repetição, e são divididos em uma classes de acordo com a forma em que as diferentes unidades de repetição são distribuídas nas cadeias poliméricas [18] (cap. 17). Os polímeros oferecem grande potencial no desenvolvimento de materiais com propriedades importantes de seletividade e de sensibilidade. Polímeros são foco de intensa pesquisa, como polímeros condutores, com propriedades eletrônica e eletroquímica estáveis [37]. Os polímeros condutores são bastante utilizados em reações que envolvem transporte de carga, no qual sítios do monômero oxidado se difundem por intermédio do filme polimérico. Os filmes poliméricos bem aderidos podem ser formados na superfície de eletrodos, como platina e ouro em experimentos eletroquímicos [37].

Entre os materiais poliméricos, destacam-se os copolímeros em bloco que são polímeros formados pela presença de dois ou mais blocos em uma cadeia polimérica. Nesse caso, cada bloco é formado por uma sequência específica de repetição de um ou mais tipos de monômeros [38]. Existem inúmeras técnicas desenvolvidas para a síntese de copolímeros em bloco por meio de mecanismos de crescimento de cadeias, e que podem ser realizados sem a ocorrência de etapas indesejadas. Dentre as técnicas mais empregadas, podem-se destacar a Polimerização Iônica, a Polimerização Radicalar Livre (Free Radical Polymerization, FRP) e a Polimerização Radicalar Controlada (Controlled Radical Polymerization, CRP). A síntese por CRP pode ser realizada por meio de algumas variantes técnicas conhecidas como Transferência Atômica Reversível (ATRP), Polimerização Mediada por Nitróxido (NMP) e Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT) [39].

2.4.1 Polímeros RAFT

A ciência vem estudando mecanismos de produção de novos materiais, pela demanda tecnológica exigida, como por exemplo, materiais nanotecnológicos de baixo custo, e com capacidade funcional e reproduzível. Nesse contexto, os polímeros destacam-se como os mais promissores para aplicações em áreas que vão desde a fabricação de nanodispositivos até os biomateriais [40]. Um método bastante utilizado para a produção de materiais poliméricos é a polimerização radicalar livre (FRP), considerada uma polimerização por condensação. Ela se baseia na propriedade de substâncias que apresentam insaturações ativas para reagir em cadeia por via radicalar, formando as estruturas poliméricas. Essa técnica é bastante eficiente para a produção de polímeros das mais diversas massas molares. Esse método também fornece uma alta polidispersidade, embora com limitada produção dos copolímeros. A FRP apresenta vantagens, entre suas vantagens, o baixo custo dos materiais utilizados e a facilidade da síntese. A polidispersidade, considerada como a diferença entre as massas molares das cadeias poliméricas, resulta da velocidade com que as cadeias são formadas e terminadas (em poucos segundos), em comparação ao tempo total da polimerização, que é um processo lento [41]. Outra desvantagem desse método consiste na dificuldade em se produzir um copolímero com propriedades definidas. Visto que a reação de polimerização ocorre com a presença de mais de um

monômero no meio de síntese, torna-se necessário determinar a concentração e a reatividade do monômero, para que seja possível conhecer a composição do copolímero. Por intermédio da FRP não é possível formação de copolímeros em blocos, devido ao fato de que as cadeias terminadas não permitem a adição de outras cadeias, não sendo viável a reinicialização da síntese por via radicalar [41].

Devido às peculiaridades dos materiais poliméricos, a capacidade de caracterização completa tem importância vital para as técnicas de síntese de polímeros. Para a caracterização de polímeros é crucial a determinação de parâmetros tais como: a massa molar média, o grau de ramificação, a proporcionalidade entre os monômeros. Portanto, é necessário determinar os parâmetros estruturais dos produtos obtidos da síntese, objetivando-se correlacionar tais parâmetros com suas propriedades em nível micro ou macroscópico. A caracterização de um copolímero se faz por intermédio da determinação de seu grau de polimerização, que é proporcional à sua massa molar; em outras palavras, quanto maior a massa molar, maior é o número de monômeros na cadeia do copolímero e, conseqüentemente, maior é a polimerização da cadeia [42].

A literatura tem abordado a necessidade de união entre técnicas avançadas de síntese controlada de polímeros, técnicas de caracterização dos mesmos e estudo de agregação em solventes seletivos. Assim, tem-se buscado agregar informações a respeito do comportamento de um copolímero específico em solução. Essas informações fornecem as bases para as relações que regem a dependência das propriedades do copolímero com sua estrutura, possibilitando a previsão das propriedades de um material polimérico, pela análise da estrutura química das cadeias dos copolímeros que o formam e, portanto, contribuindo para o desenvolvimento da ciência e tecnologia dos materiais [43].

A química dos polímeros teve um salto com o início das técnicas de polimerização radical controlada (CRP), que busca suprir as falhas da FRP. Essas técnicas atuais são, via de regra, essenciais para a síntese de polímeros variados, pois permite controlar as reações de polimerização. Tendo em vista essa nova situação, tornou-se crescente o estudo da síntese de polímeros, visto a evolução de técnicas Polimerização Radical Controlada (PRC) e o avanço de técnicas de caracterização, permitindo a obtenção dos mais variados polímeros, para as mais diversas aplicações, tais como: materiais médico-hospitalares, dispositivos eletrônicos, dispositivos ópticos e aplicações tecnológicas. A variante de PRC considerada

mais eficaz é a RAFT (*Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer*). A técnica RAFT baseia-se em uma reação de polimerização radicalar na presença de agentes de transferência de cadeia, fazendo com que as cadeias poliméricas cresçam de forma controlada, de maneira similar ao que ocorre na polimerização por adição [44].

Com o avanço dessas técnicas tornou-se possível sintetizar copolímeros com diversas estruturas e com peso molecular desejado. Embora muito se conheça sobre as utilidades dos copolímeros anfífilos obtidos por RAFT, tais como estabilização de emulsões, remoção de agentes oxidantes e/ou poluentes, e incorporação de fármacos para sua liberação em tecidos alvos, pouco se conhece sobre o seu uso em técnicas eletroanalíticas [45]. Para a síntese de copolímeros, empregando-se a técnica de Polimerização Radicalar Controlada (CRP) utilizando RAFT, é necessário o uso de agentes de transferência de cadeia (CTA), sendo o mais utilizado o ditiobenzoato de cumila (DTBC) [44].

Quando um dibloco AB de um copolímero, ou tribloco ABA desse polímero é dissolvido em solvente específico, e atua como solvente apropriado para o bloco A e não apropriado para o B, as moléculas do copolímero podem se juntar e formar micelas. Estudos de micelação de blocos de copolímeros hidrofílicos-hidrofóbicos tem recebido destaque na literatura pois, devido às suas propriedades específicas, podem ser aplicados no âmbito tecnológico [39].

2.4.2 Copolímero PMMA-block-PDMAEMA

PDMAEMA (poli-2-dimetilaminoetil metacrilato) é um polímero funcional que apresenta carga positiva em pH baixo (Figura 7). Copolímeros com blocos de PDMAEMA geralmente apresentam miscibilidade em meio aquoso em função do valor de sua temperatura crítica inferior de solução (LCST) [46]. A solubilização do copolímero em água, regulada pela mudança na energia livre de Gibbs, pode ser então comprometida acima dessa temperatura [46]. Relações capazes de prever o comportamento de polímeros com base em sua estrutura química são necessárias para a síntese de materiais com propriedades desejadas [45]. As propriedades físico-químicas dos sistemas baseados em polímeros do tipo PDMAEMA, com utilização resultante em sistemas coloidais especializados, estão intimamente ligadas à estrutura química dos materiais que os formam, ou seja, às propriedades químicas, às interações entre as cadeias e às formas de agregação em solução dos

polímeros [45]. Os copolímeros PDMAEMA podem ser formados por blocos de diferentes polaridades, apresentando caráter anfifílico, justificando-se o crescente interesse por seu estudo [38].

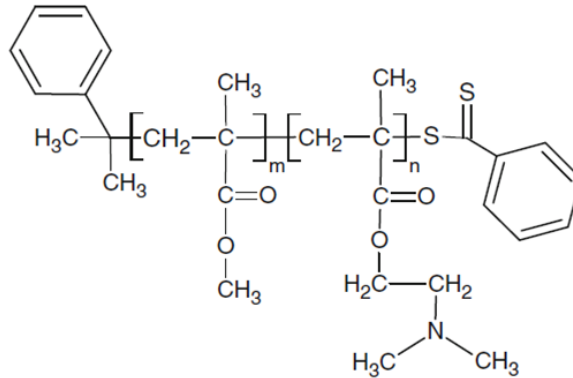


Figura 7: Estrutura química do PMMA-b-PDMAEMA sintetizado pela técnica de RAFT [45].

Baines *et al.* investigaram a micelização de blocos de copolímeros com caráter hidrofóbico/hidrofílico utilizando poli-2-dimetiletil metacrilato (PDMAEMA) em maior proporção e caráter hidrofílico, e poli-metilmetacrilato (PMMA) em menor proporção e hidrofóbico. Segundo os autores, esses copolímeros em bloco tem capacidade de formar micelas. Esse estudo sugeriu a existência de interações repulsivas entre as cadeias hidrofílicas catiônicas de PDMAEMA, e que desempenham papel fundamental na determinação do tipo da associação existente. Os autores determinaram o efeito de carga por protonação do componente DMAEMA em HCl, e perceberam que quando PDMAEMA é completamente ionizado, se comporta como um polieletrólito catiônico. Análises de ultracentrifugação mostraram que a presença de um sal (KCl) pode controlar a repulsão de cargas, favorecendo a micelização [47].

Gohy *et al.* estudaram as interações existentes entre o pH da solução e blocos do copolímero PMMA-b-PDMAEMA, levando-se em consideração a constante de dissociação do polímero, com valor de pKa de 6,6 para PDMAEMA. Esse valor é relativamente baixo para resultar em alteração conformacional da cadeia, com resultante estabilização do grupo amina por uma carbonila [39]. O homopolímero PDMAEMA tem um comportamento mais ácido com o aumento do grau de protonação, devido às repulsões de cargas

positivas ao longo da cadeia. Existem dois processos responsáveis pela organização molecular do polímero: a interação eletrostática e a interação hidrofóbica. Em pH acima ou abaixo do ponto isoelétrico, não há efeito significativo no tamanho dos agregados [39]. A capacidade do copolímero PMMA-b-PDMAEMA em formar micelas em solução aquosa e em pH acima de 6,0 foi determinada por Lee *et al.*. Em meio ácido, os grupos amina da cadeia lateral estão protonados, favorecendo o caráter hidrofílico do copolímero, permitindo que o polímero se comporte como um polieletrólito. Por conseguinte, a adição de base faz com que o bloco DEAEMA se torne hidrofóbico. Acima do pH crítico, o copolímero agrega formando micelas [41]. Entre as aplicações do polímero PMMA-b-PDMAEMA, destacam-se sua atividade antibacteriana, hemostática e antitumoral, além de aplicações potenciais em áreas do meio ambiente, drogas, sensores, tintas, membranas [48]. Entretanto, não foi encontrada aplicação de um polímero RAFT tal como PMMA-b-PDMAEM como substrato para a elaboração de biosensores, tal como o pretendido nesse trabalho.

3. Justificativa

Copolímeros de síntese radicalar controlada por RAFT constituem compostos de variada aplicabilidade tecnológica e industrial. Compostos dessa natureza tem chamado atenção recente devido à possibilidade de desenvolvimento de estruturas poliméricas com massa molecular, arquitetura e composição previsíveis a partir de condições experimentais flexíveis. Essa variabilidade estrutural e funcional ajustável na síntese de copolímeros RAFT pode permitir sua aplicação inédita na elaboração de biosensores específicos para moléculas alvo de interesse biotecnológico. Nesse sentido, pretendeu-se nesse trabalho avaliar o potencial uso de um polímero RAFT, o copolímero PMMA-bloco-PDMAEMA, para o estudo de voltametria direta de transferência de carga de mioglobina como proteína modelo, imobilizada em filme polimérico à superfície de eletrodo de ouro.

4. Objetivos

4.1 Principal

Estudar a transferência de carga de mioglobina imobilizada em copolímero RAFT de PMMA-b-PDMAEMA por voltametria cíclica.

4.2 Específicos

1. Determinar a pureza da amostra de mioglobina por espectrofotometria;
2. Modificar a superfície de eletrodo de ouro visando à imobilização de grupos funcionais de PMMA-b-PDMAEMA;
3. Imobilizar a Mb na superfície do eletrodo de ouro modificada por PMMA-b-PDMAEMA (Mb/PMMA-b-PDMAEMA);
4. Realizar ensaios de voltametria cíclica de Mb/PMMA-b-PDMAEMA;
5. Determinar parâmetros cinéticos de transferência de carga de Mb/PMMA-b-PDMAEMA;
6. Estudar o comportamento do complexo Mb/PMMA-b-PDMAEMA em diferentes faixas de pH;
7. Avaliar a atividade catalítica de Mb/PMMA-b-PDMAEMA sobre H_2O_2 ;
8. Determinar parâmetros termodinâmicos associados à transferência de carga de Mb/PMMA-b-PDMAEMA;
9. Avaliar a estabilidade e reprodutibilidade de Mb/PMMA-b-PDMAEMA.

5. Metodologia

5.1 Reagentes

A mioglobina utilizada foi de sangue equino, marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), lote 04447006). Acetona (C_3H_6O), teve procedência da empresa Merck Co. (99,00% de pureza) e gluteraldeído, ($C_5H_8O_2$), procedência Sigma, 25,00% de pureza.

PMMA-b-PDMAEMA foi cedido pelo Prof. Dr. Fábio Herbst Florenzano, do Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG, sem purificação posterior. A síntese do polímero PMMA-block-PDMAEMA foi realizada por Florenzano em que foram utilizados metacrilato (MMA) 99% adquirido da Sigma-Aldrich, DMMEMA 98% adquirido da Sigma-Aldrich e peróxido de benzoíla (BPO) obtido da Vetec Brazil. Resumidamente, essa foi realizada por um bloco de PMMA, seguindo-se utilização de reagente BPO como iniciador. Os blocos de PMMA foram purificados por precipitação em metanol e secagem em vácuo. Esses blocos de PMMA foram posteriormente utilizados como agentes de transferência de cadeia de macro (macroCTA's) em uma copolimerização usando DMAEMA como monômero e BPO como iniciador. Os copolímeros resultantes foram purificados por precipitação em n-hexano. Os produtos foram confirmados por 1H -RMN (Bruker INOVA DPX300 espectrômetro).

Demais reagentes para elaboração de solução eletrólito, solução tampão, padrão de calibração do sistema potenciostato-galvanostato e espectrofotômetro, foram de grau analítico. Foi utilizado como eletrólito suporte uma solução tampão de fosfato de sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em pH 7,4, preparada por dissolução dos sais na água e ajuste de pH. O sistema potenciostato-galvanostato foi calibrado com solução de ferro/ferricianeto de potássio $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ em $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl.

5.2 Equipamentos

- Potenciostato/galvanostato PG-39MCSV, Omni Metra Instrumentos Científicos Ltda (Nova Friburgo, Rio de Janeiro);
- Ultrassom Ultracleaner 1400 – UNIQ – modelo –usc -1400;
- Miniagitador magnético processado Quimis Q221M;
- Balança analítica – KERN 410;
- Espectrofotômetro Biochrom – Libra S22;

- Banho ultratermostático com circulação Quimis (modelo Q214-S);
- Termômetro digital Minipa MT600 com saída RS232;
- pHmetro - Marte Brasil MB-10, série: 126431701.

5.3 Calibração do sistema potenciostato-galvanostato

O sistema PG-39MCSV foi calibrado empregando-se o registro elétrico e químico do sinal de corrente obtido em ensaios distintos. Para o primeiro, foram conectadas as extremidades das garras RE1-WE e RE2-CE um resistor de 100Ω , seguindo-se a rampa linear de $-0,1$ a $+0,1$ V a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Para a calibração química, foram empregados 5 ml de solução de ferricianeto de potássio 10 mM em KCl 0,5 M, seguindo-se a imersão da superfície de contato dos eletrodos de trabalho (pasta de carbono e carbono vítreo), auxiliar (platina) e de referência (Ag/AgCl), próximos um do outro, e monitoramento do sinal eletroquímico. Este foi obtido por voltametria cíclica a $200 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ e faixa de $-0,2$ a $+0,6$ V. O sinal de reversibilidade característico foi utilizado como critério para análises paramétricas dos eletrodos, como potencial de pico anódico e catódico.

5.4 Cella Eletroquímica

O eletrodo de trabalho foi elaborado em corpo vítreo, e a superfície utilizada consistiu de discos de Au (marca Sigma-Aldrich-265802, 99,9% de pureza) 2 mm de diâmetro e 0,5 mm espessura. Também foram utilizados discos de 5 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura obtidos e confeccionados por ourives local, a partir de lingotes de ouro de 2 g (99 % pureza). Cada disco foi soldado com solda de prata a fio de cobre de 2 mm de espessura e 10 cm de comprimento, conforme a Figura 8.



Figura 8: Eletrodo de trabalho utilizado durante os experimentos.

Os ensaios, utilizando-se o eletrodo de trabalho, foram precedidos por otimização da aquisição de sinal eletroquímico por voltametria cíclica, na solução eletrólito de ferro/ferricianeto de potássio, até a obtenção de um voltamograma estável e reversível com I_{pa}/I_{pc} próximo à unidade. O eletrodo de referência de Ag/AgCl foi construído em corpo vítreo colocado sobre uma ponteira plástica de 1 ml. Ao corpo, foi afixado um fio de prata (marca Sigma-Aldrich-267430, 99,99% de pureza) de 5 mm de diâmetro, 5 cm de comprimento e 0,5 mm de espessura, utilizando-se resina Epoxi (Araldite[®]) polimerizada com 20 μL de HF. O fio de prata foi anodizado por cronoamperometria a um potencial de 0,5 V durante 300 s, em célula eletrolítica contendo KCl 3 mol.L⁻¹. A ponteira plástica teve sua extremidade fundida em bico de gás com um fio de platina de 0,5 mm de espessura por 1,0 cm de comprimento. Após preenchimento de 0,8 ml de KCl 3 mol.L⁻¹, a ponteira foi firmemente ajustada ao corpo vítreo contendo o segmento metálico. O eletrodo de referência foi testado frente a um eletrodo Ag/AgCl Metrohm Inc, pela determinação de potencial formal padrão E^0 de uma solução de KCl a 3 mol.L⁻¹ contendo 10 mM de ferro/ferricianeto de potássio (1:1). Os ensaios foram realizados por voltametria cíclica, com varredura de potencial de -0,2 a 0,6 V, e taxa de varredura a 100 mV.s⁻¹. O eletrodo auxiliar foi confeccionado em corpo vítreo (segmento de pipeta com capacidade para 2 ml, e 8 cm de comprimento). No corpo, foi introduzido um fio de platina de 1,0 cm de comprimento e 0,5 mm de espessura, soldado a um fio de cobre de 2 mm de espessura e 10 cm de comprimento, essa extremidade para o contato elétrico ao potenciostato. O conjunto foi finalizado utilizando-se resina Epoxi (Araldite) polimerizada com 20 μL de HF, para vedação, isolamento e imobilização dos segmentos metálicos.

5.5 Limpeza dos eletrodos de trabalho

Os eletrodos de Au confeccionados foram tratados com solução piranha composta por H₂SO₄ concentrado e H₂O₂, que é um potente agente oxidante, a 30 % (3:1) por apenas 20 s, a fim de se evitar a degradação da resina formada, seguindo-se lavagem abundante em água destilada e tratamento mecânico com pasta de Al₂O₃. Feito isso, prosseguiu-se com ultrasonicação por 30 min em água deionizada, lavagem com EtOH 95%, e secagem ao ar, seguido por fluxo de N₂ sobre a superfície dos eletrodos de trabalho, por um mínimo de dois minutos. Imediatamente antes dos ensaios, os eletrodos eram tratados com o fluxo

do gás por 60 s. Quando não utilizados, os eletrodos de trabalho foram mantidos em solução de H_2SO_4 a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. A desareação das soluções tamponadas, contudo, não apresentou diferença de perfil nem magnitude de corrente, em relação às não tratadas, optando-se por evitar o uso de fluxo de N_2 nas soluções proteicas, de modo a reduzir a desnaturação provocada pela agitação nas mesmas.

5.6 Caracterização eletroquímica da superfície de eletrodo de Au

Para aferir a resposta eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho, este foi imerso em 6 mL de solução de H_2SO_4 a $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, seguindo-se voltametria cíclica com varredura de potencial de +0,1 a +1,6 V, e velocidade de varredura a $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, durante 25 ciclos. O perfil resultante foi comparado aos já reportados [49]. A célula eletroquímica montada pode ser visualizada na Figura 9.



Figura 9: Célula eletroquímica utilizada nos experimentos. A célula era composta de três eletrodos: contra eletrodo (fio Pt), eletrodo de trabalho (Au a Au modificado) e de referência (Ag/AgCl).

5.7 Teste dos eletrodos com sonda de ferro/ferricianeto de potássio

Foi utilizada como sonda para aferir a corrente produzida sobre o eletrodo de Au, uma solução de KCl a 3 mol.L^{-1} contendo 10 mM de ferro/ferricianeto de potássio (1:1). Os ensaios foram realizados por voltametria cíclica, com varredura de potencial de -0,2 a +0,6 V, e taxa de varredura a $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Usualmente, foi empregada uma amplificação de 5 mA e 500 μA para, respectivamente, eletrodo nu e eletrodo tratado.

5.8 Preparo da solução de mioglobina

A solução de mioglobina foi preparada em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, na concentração $15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ por mL de tampão fosfato. Devido aos aglomerados da estrutura protéica da proteína que causaram baixa solubilidade em meio aquoso, as amostras de Mb eram deixadas em repouso por 15 min em temperatura ambiente até a completa dissolução. Optou-se pela não agitação, para que não houvesse possível desnaturação da proteína.

5.9 Espectrofotometria de Mb

Soluções de Mb pipetadas em cubeta de quartzo ($1\text{mg}/\text{mL}$) foram monitoradas espectrofotometricamente a 200-450 nm a fim de se obter informações a respeito do grau de pureza da proteína. Os dados foram analisados por médias de absorbância obtida de uma solução controle preparada à temperatura ambiente. Foi empregado o tampão fosfato como solução de referência nos ensaios.

5.10 Montagem do sistema de voltametria de mioglobina

O sistema de voltametria foi composto por módulo potenciostato-galvanostato conectado a um microcomputador para aquisição, filtragem e análise de dados. A configuração utilizada foi de três eletrodos (trabalho – ouro, referência – Ag/AgCl, e auxiliar – fio de Pt), imersos em tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4. A voltametria cíclica foi conduzida a uma taxa de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em potencial de -0,3 a +0,7 V.

5.11 Imobilização da proteína na superfície dos eletrodos

O eletrodo de ouro, previamente limpo, era tratado com fluxo de nitrogênio por 60 s. Em seguida, pipetava-se no eletrodo $30 \text{ }\mu\text{l}$ de solução contendo Mb e copolímero PMMA-b-PDMAEMA ($10 \text{ mg}/\text{L}$) simultaneamente, deixando-se secar à temperatura ambiente por aproximadamente 40 min. Posteriormente à secagem do eletrodo, foram pipetados $30 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de glutaraldeído (GLU 3%) sobre a superfície do eletrodo modificado, deixando-se secar naturalmente. Finalmente, o eletrodo era abundantemente lavado com EtOH 95% e água destilada com auxílio de uma pisseta, no intuito de se desorver a Mb não complexada ao polímero. Imediatamente após os ensaios eletroquímicos o eletrodo, era acondicionado em um béquer com solução tampão fosfato para assegurar à integridade do complexo formado.

5.12 Voltametria cíclica de mioglobina imobilizada

Os ensaios foram realizados com 6 mL de solução eletrólito de 0,1 mol.L⁻¹ de tampão fosfato de sódio pH 7,4. Para tanto, a superfície de cada eletrodo contendo a proteína supostamente imobilizada era lavada com água destilada, com posterior secagem ao ar e fluxo de N₂ por 60 s, e imersão na célula eletroquímica contendo o tampão. Os ensaios foram conduzidos a uma varredura de potencial de -0,3 a +0,7 V, em velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹, quando não especificada. Foi empregada uma janela de amplificação de 500 μA para a obtenção dos dados.

5.13 Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga

Os parâmetros cinéticos de Mb/PMMA-b-PDMAEMA foram determinados com soluções de tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4, variando-se a taxa de varredura em 20, 40, 60, 80, 100, 130, 160, 180, 200, 250, 300, 350, 400, e 500 mV.s⁻¹.

5.14 Estudo de variação de pH

Esse estudo foi realizado preparando-se soluções de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ em valores de pH de 4,0; 4,5; 5,0 ; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; e 7,5, com auxílio de soluções de NaOH e HCl a 0,1 mol.L⁻¹. Os voltamogramas cíclicos foram registrados a cada troca de tubos com taxa de varredura de 100 mV.s⁻¹, e faixa de potencial -0,3 a 0,7 V, e varredura de 3 ciclos consecutivos por ensaio.

5.15 Estudo da atividade catalítica de H₂O₂

Para a determinação da atividade catalítica da Mb sobre o substrato H₂O₂, onde ocorre a redução de H₂O₂ por catálise, realizou-se o monitoramento da resposta voltamétrica após a adição sequencial de 30 μL de solução de 0,165 mol.L⁻¹ H₂O₂ na solução de eletrólito suporte. Para isso, foi preparada um série de tubos contendo 5 ml de solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4. Inicialmente, o voltamograma cíclico era registrado entre a faixa potencial -0,3 a +0,7 V sem adição de H₂O₂. Ao tubo subsequente, eram adicionados 30 μL de H₂O₂. A adição de peróxido de hidrogênio na série de tubos seguintes era então realizada seguindo-se uma progressão de 30 μL por vez, e com correção de volume.

5.16 Ensaio termodinâmico de Mb imobilizada

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia proposta [50, 51, 52] e foi conduzida de forma não- isotérmica com o eletrodo de referência Ag/AgCl em contato com a solução tampão apenas por meio de um fio de Pt de 5 cm, preservando-se o corpo do eletrodo fora da solução eletrolítica. Dessa forma, o eletrodo de referência era mantido em temperatura constante de 25^o, monitorada por sensor Pt100 acoplado a termômetro digital Minipa. Os eletrodos auxiliar e o de trabalho, por sua vez, eram mantidos imersos em célula eletroquímica jaquetada conectada a banho ultratermostático de circulação (vazão de 10 L/min) conforme a Figura 10, e com variação termal até 65 C^o. Todos os ensaios eram realizados após equilíbrio térmico da célula, conforme monitoramento do termômetro.

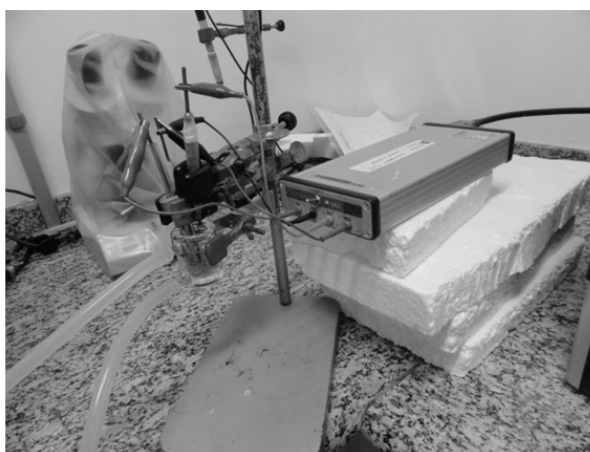


Figura 10: Representação da célula eletroquímica acoplada ao banho ultratermostático e ao sistema jaquetado, utilizada nos experimentos de variação da temperatura de Mb imobilizada.

5.17 Estudo da estabilidade e reprodutibilidade do biosensor

Para a determinação do tempo de vida útil do biosensor de Mb/PMMA-b-PDMAEMA, realizou-se um monitoramento diário da resposta do dispositivo, usando sempre um mesmo eletrodo de trabalho. Durante a avaliação da estabilidade do eletrodo, a estocagem foi realizada em temperatura ambiente, em soluções de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,4. Os testes de reprodutibilidade da medida, foram efetuados com eletrodos diferentes, utilizando-se sempre o mesmo protocolo de imobilização.

5.18 Análise de dados

O planejamento experimental foi realizado por parcelas inteiramente casualizadas, a um mínimo de triplicatas para a obtenção de referenciais estatísticos (média e desvio-

padrão da média). Ajustes (linear e não linear) e modelos estatísticos (ANAVA, $p < 0.05$) foram empregados conforme a especificidade das análises. Os dados resultantes foram avaliados utilizando-se o programa estatístico de domínio público R (CRAN, Comprehensive R Archive Network [53]), com pacotes específicos para cada análise. Os gráficos foram também elaborados com auxílio desse.

6. Resultados e Discussão

6.1 Determinação da pureza de Mb

Amostras de mioglobina a 1 mg/mL em tampão fosfato foram aferidas quanto ao grau de pureza por espectrofotometria, por comparação ao coeficiente de extinção molar reportado por Postnikova e colaboradores [54]. O valor do coeficiente de extinção molar em A_{409} , região pertencente à banda de Soret, foi de $142,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, sendo a pureza da amostra de 90,29%.

6.2 Pré-tratamento de eletrodo

A Figura 11 apresenta o ciclo voltamograma obtido a partir da metodologia de limpeza da superfície do eletrodo de Au, pelo perfil voltamétrico em $0,5 \text{ mol.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$. De acordo com trabalhos anteriores o perfil voltamétrico apresenta nessas condições a formação de óxido de ouro em um determinado intervalo de potencial. Com a inversão de sentido da varredura, o óxido é reduzido com um potencial de pico de redução em aproximadamente 1,0 V [49]. O pico de redução ocorre devido à redução do óxido de ouro, considerado um processo rápido em temperatura ambiente e em baixas velocidades de varredura [55].

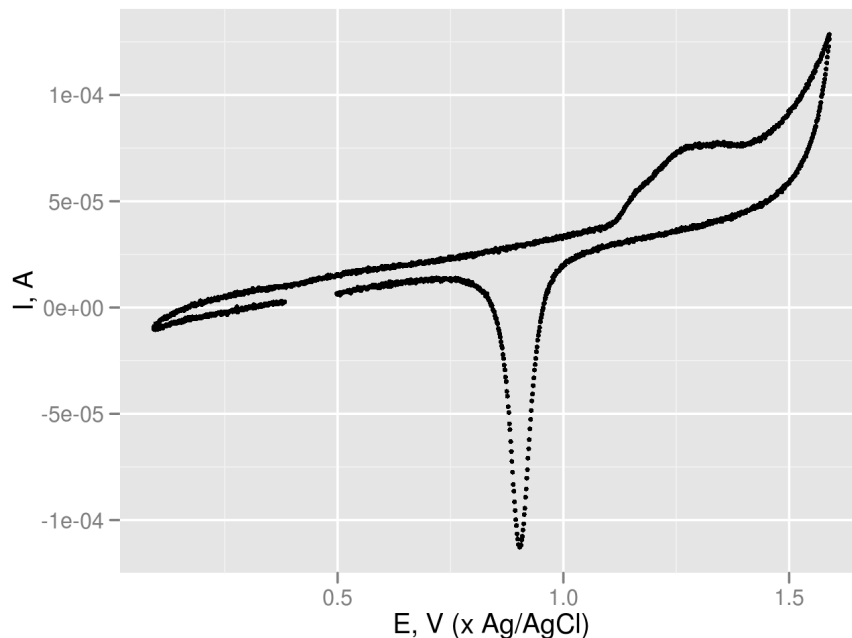


Figura 11: Voltamograma cíclico do eletrodo de Au em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 a 20 mVs^{-1} , 25 ciclos.

A área eletroquímica (A_{real}), ou área eletroativa, é a área total da superfície, incluindo

cavidades, ondulações e defeitos em nível atômico. Portanto a referida área fornece dados a respeito da quantidade de sítios disponíveis na superfície do sensor [56]. A área eletroativa foi calculada pela integração do pico de redução do ciclo voltamograma do eletrodo de ouro, considerando o fator de rugosidade (fr), de acordo com a equação 6.2:

$$A_{real} = \frac{q_{real}}{\sigma_t} \quad (6)$$

$$fr = \frac{A_{geom}}{A_{real}} \quad (7)$$

Onde a área geométrica A_{geom} foi obtida de acordo com a carga de redução teórica σ_t de $390 \mu\text{C}$ necessária para redução da camada de óxido de ouro e q_{real} é carga medida experimentalmente. Por esse procedimento, a média de área eletroativa obtida foi de $1,146 \pm 0,137 \text{ cm}^2$. Considerando que a área geométrica média dos eletrodos foi de $0,220 \text{ cm}^2$, o fator de rugosidade (fr) calculado pela equação 6.2 foi de 5,35, o que sugere uma grande ondulação superficial dos eletrodos de trabalho.

6.3 Cálculo de concentração de Mb eletroativa na superfície do eletrodo de Mb-PMMA-b-PDMAEMA

A concentração de Mb na superfície do eletrodo modificado foi obtida utilizando a equação 8 abaixo, conforme relatado por Zheng e colaboradores [57]:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 \nu AC}{4RT} \quad (8)$$

Onde n é o número de elétrons, F a constante de Faraday, ν a velocidade de varredura, A a área eletroativa, C a concentração da espécie eletroativa, R a constante geral dos gases e T a temperatura absoluta.

A média da superfície de concentração foi de $9,8 \cdot 10^{-11} \pm 1,13 \cdot 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$, utilizando valores abaixo da saturação de Mb. Esse resultado está próximo do valor de 7.4×10^{-11} reportado anteriormente [9], e maior do que o valor teórico previsto de 1.58×10^{-11} para uma monocamada de mioglobina [58]. Por outro lado, dada a extensão plausível de cobertura do dibloco de PDMAEMA na superfície do eletrodo (PMMA-b-PDMAEMA possui

uma massa molecular estimada entre 30 a 100 kg·mol⁻¹ [59, 60], e raio hidrodinâmico de 2,2 nm [47]), frente à cobertura de Mb (Mb, uma massa molecular de 17.500 kg·mol⁻¹ [61], e raio hidrodinâmico de 0.21 nm [62]), pode-se sugerir que a monocamada de Mb esteja, na verdade, embebida na matriz polimérica de PMMA-b-PDMAEMA. Para tanto, buscou-se avaliar a espessura da camada de PMMA-b-PDMAEMA presente à superfície eletródica, conforme a relação 9 que segue [63]:

$$C_{dl} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \kappa}{d} \quad (9)$$

Onde C_{dl} representa a capacitância da dupla camada elétrica, ε_0 a constante de permissividade elétrica no vácuo, $8,85 \times 10^{-12}$ F·m⁻¹, d a espessura de camada polimérica em cm² e κ a constante de permissividade elétrica do polímero (PMMA, 1.08 [64]). O valor de C_{dl} , por sua vez, foi determinado segundo a Eq. 6.5 abaixo [65]:

$$\frac{i_a - i_c}{2} = C_{dl} \cdot \nu \quad (10)$$

Onde i_a e i_c representam, respectivamente, a corrente anódica e catódica ao centro do ciclovoltagemograma de tampão somente (Figura 12), descontada a linha de base. Com base nesse formalismo, foi encontrado um valor de C_{dl} de $5,3 \times 10^{-7}$ F·cm⁻². Pela Eq. 9, o valor da espessura polimérica de cobertura do eletrodo foi de 180,3 nm. Considerando o raio hidrodinâmico de PMMA-b-PDMAEMA acima, pode-se concluir que uma plausível monocamada de Mb encontra-se à superfície do eletrodo imersa numa matriz polimérica possuindo várias camadas de PMMA-b-PDMAEMA.

Dessa forma, o copolímero PMMA-b-PDMAEM pode ter aumentado a densidade funcional de grupos eletroativos à superfície do eletrodo. A integração dos picos resultou em pouca variação da superfície eletroativa do complexo em função da velocidade de varredura ($1,5 \cdot 10^{-11}$ a $3,5 \cdot 10^{-11}$ cm²), o que está de acordo com um comportamento de eletro-transferência confinada à superfície, ou a um comportamento eletroquímico em camada delgada [66, 19].

6.4 Efeito da velocidade de varredura

A Figura 12 apresenta os ciclovoltamogramas de tampão e mioglobina imobilizada. Pelo perfil ciclovoltamétrico, pode-se observar que o sinal amperométrico resultou em picos significativos, tanto anódico como catódico, apenas quando foi adicionada Mb. Ensaios de adsorção de Mb sobre a superfície do eletrodo não resultaram em potenciais de pico detectáveis.

A Figura 13 apresenta o voltamograma cíclico de Mb/PMMA-bloco-PDMAEMA em diversos valores de taxa de varredura. Os ciclovoltamogramas resultantes evidenciam um deslocamento observado no potencial de pico catódico para valores mais negativos com o aumento da velocidade de varredura, o mesmo ocorrendo no processo inverso. Como explicitado no capítulo de referencial teórico deste trabalho, processos eletrocatalíticos podem ser classificados como reversíveis, irreversíveis e quase-reversíveis [16] (cap. 3). Esse diagnóstico é essencial para a eletroanálise de mecanismos de transferência de carga em estudos de voltametria, e precede a determinação de parâmetros eletrocinéticos, base da elucidação mecanística interfacial. O grau de reversibilidade de um sistema eletroquímico, melhor definido termodinamicamente, leva em conta as taxas de transferência de carga em que o processo redox ocorre em ambas as direções (anódico e catódico). Nesse caso, uma reação reversível segue a equação de Nernst (comportamento nernstiniano, equação 3), em que as transferências de carga à superfície do eletrodo são suficientemente rápidas, mantendo as taxas das espécies redox a valores fornecidos por essa relação. A Figura 13 parece não apresentar um comportamento puramente reversível, posto que os potenciais de pico parecem depender da velocidade de varredura [18] (cap. 9). Além disso, o valor da razão entre as correntes de pico, i_{p_a}/i_{p_c} , foi de $0,84 \pm 0,08$, não condizente com o valor unitário previsto para sistemas reversíveis puros [18] (cap. 9).

Em eletroanálise diversas relações entre grandezas são utilizadas para a extração de parâmetros eletroanalíticos por meio de equações de reta ou linearizações [16] (cap. 3). As vantagens em se trabalhar com a estratégia acima resume-se: 1) na convergência de apenas dois parâmetros de estimativas (inclinação ou coeficiente angular, e intercepto), 2) na facilidade de ajustes lineares por métodos correntes, como quadrados mínimos, 3) na necessidade de poucas medidas experimentais para estabelecer a relação linear, 4) na robustez do tratamento estatístico do modelo linear, 5) no alto grau de confiabilidade

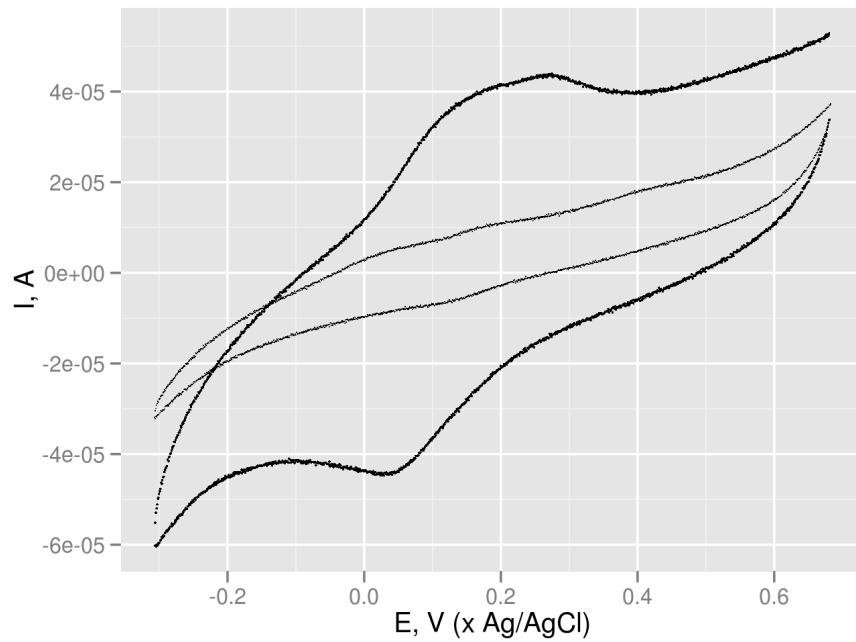


Figura 12: Voltamograma cíclico de tampão fosfato e Mb/PMMA-b-PDMAEMA em eletrodo Au. Velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} .

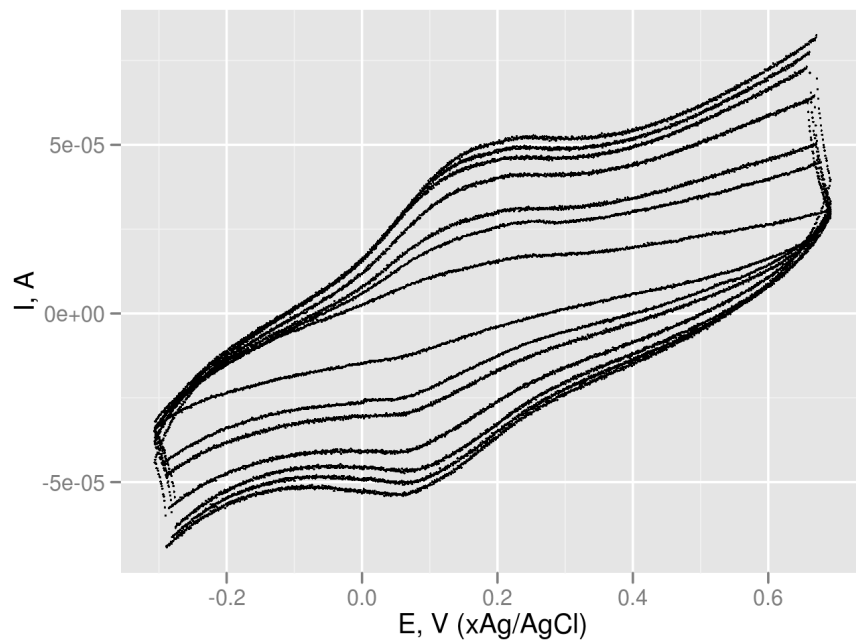


Figura 13: Voltamograma cíclico de Mb/PMMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4 nas velocidades de varredura de 20; 40; 60; 80; 130; 160; 180; 200 mV.s^{-1} .

na interpolação de dados, 6) no reduzido número de premissas que satisfazem o método (igualdade de variâncias, normalidade de dados obtidos independentemente) [67]. Na investigação de estudos voltamétricos avalia-se a relação linear entre grandezas puras ou transformadas, tais como a corrente, o potencial de pico, ou a velocidade de varredura, na busca de modelos mecanísticos do processo de transferência de carga, o grau de reversibilidade do sistema, bem como de parâmetros termodinâmicos e eletrocatalíticos [18] (cap. 9). Dessa forma, a equação de Randles-Sevcic (4) exemplifica o formalismo que relaciona a corrente de pico com o quadrado da velocidade de varredura.

O resultado apresentado à Figura 14 mostra que as correntes de pico de oxidação e redução aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura no intervalo de 20 a 200 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Acima dessa taxa de varredura, contudo, o gráfico parece apresentar um desvio da linearidade, marcadamente no processo de oxidação. Por esse razão, o ajuste de quadrados mínimos para os picos de oxidação foi conduzido excluindo-se os dois últimos pontos, em todas as velocidades. Ainda assim, os coeficientes de determinação, que espelham a proporção de variância na ordenada explicada pela variância na abscissa, segundo o modelo linear aplicado [68], resultaram em um valor inferior para o processo de oxidação no eletrodo. Em síntese, esses dados sugerem que o processo aproxima-se de uma transferência de carga difusional [14], embora tenha havido desvios do modelo em taxas maiores de velocidade de varredura.

A fuga à linearidade do modelo difusional de Randles-Sevcic pode ter sido originada frente a um comportamento de transferência de carga confinada à superfície [69, 19, 16] ou à estrutura de uma camada delgada formada pelo polímero junto ao eletrodo [70, 19, 16]. Assim, os dados de taxa de varredura contrastados pelos valores de corrente de pico, apresentados à Figura 15 apresentaram também um perfil linear. Esse resultado reforça que a cinética de transferência eletrônica seja dirigida mais pela teoria de voltametria de camada delgada (ou filme fino) [70, 19, 16], do que controlada por difusão simples.

Em outro tratamento empregando-se os mesmos dados, o gráfico de duplo logaritmo de velocidade de varredura por corrente de pico também resultou em uma linha reta para ambos os processos anódico e catódico, e com valores de inclinação de 0,72 para a redução (preto) e 0,90 para a oxidação (branco). Esse valor encontra-se em uma faixa intermediária

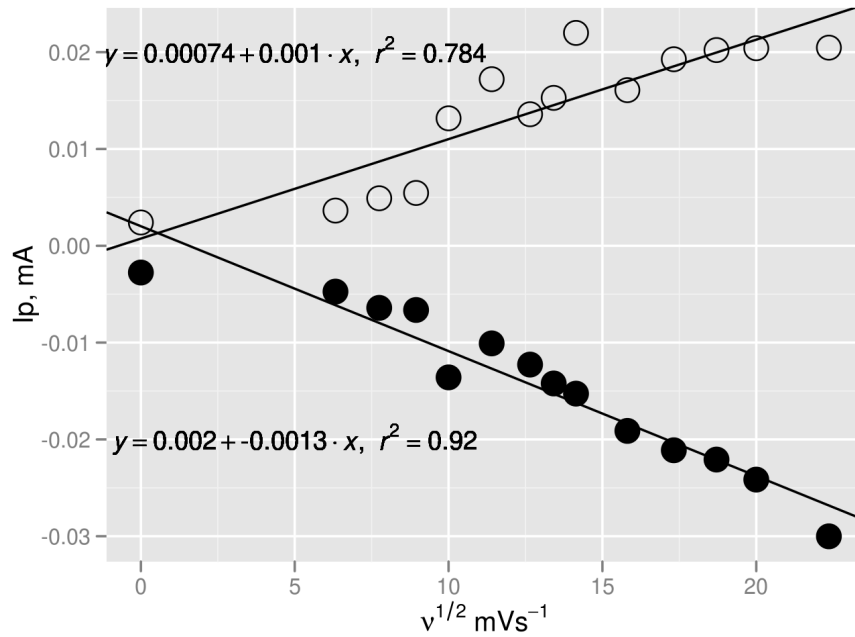


Figura 14: Efeito da variação do quadrado da taxa de velocidade de varredura na intensidade de corrente de pico de Mb/PMMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4.

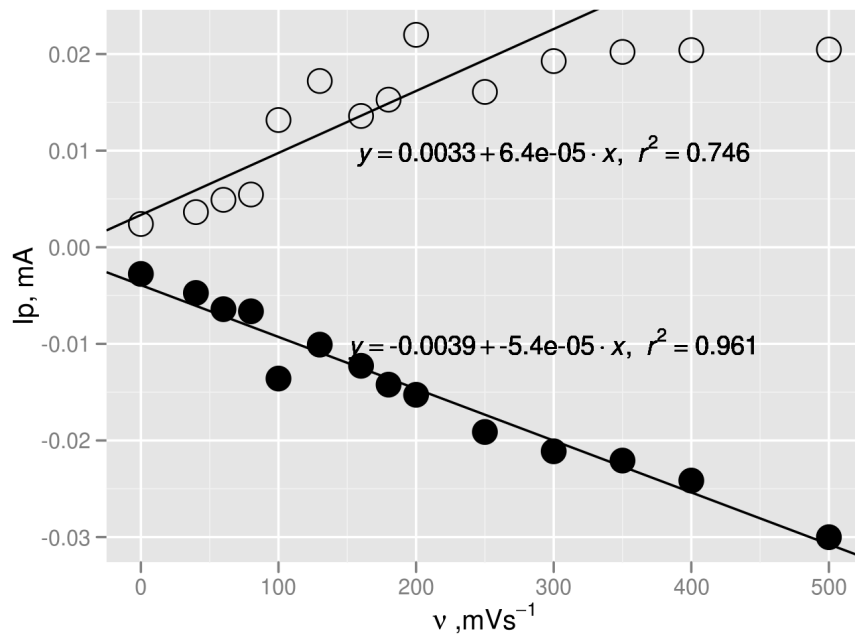


Figura 15: Efeito da taxa de velocidade de varredura na corrente de pico de Mb/PMMA-b-PDMAEMA em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4.

reportada na literatura entre um processo puramente difusional (valor de 0,5) e 1,0 para processo puramente adsortivo [71]. Dessa forma tem-se que processo sugerido para a transferência de carga à superfície do eletrodo modificado com o filme polimérico de Mb-PMMA-b-PDMAEMA possa ter sido decorrente de uma camada delgada ou filme fino [19] (Cap. 10) como suporte eletrônico à essa transferência dos grupos redox proteicos [70].

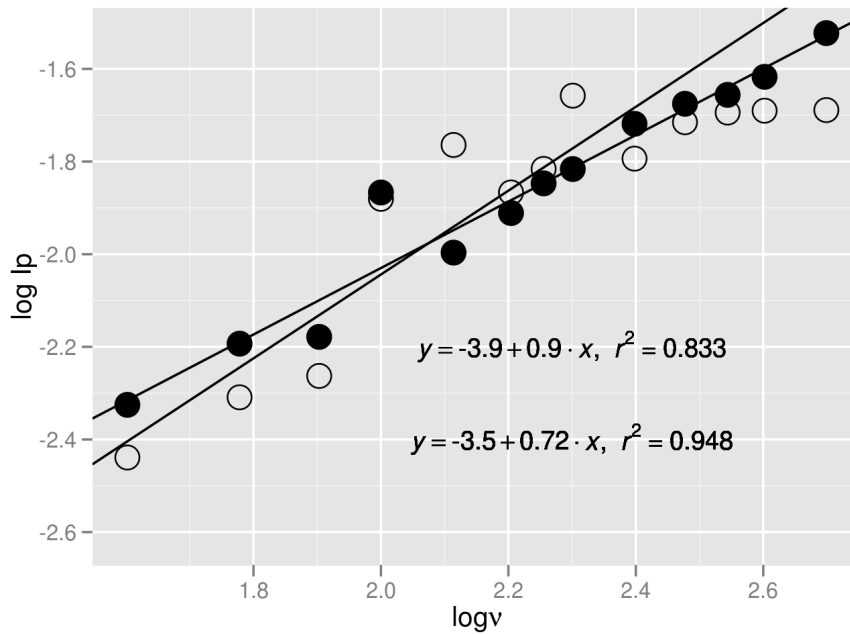


Figura 16: Representação duplo-logaritmo de velocidade de varredura e corrente de pico, para a cinética de transferência eletrônica em Mb-PMMA-b-PDMAEMA.

6.5 Determinação dos parâmetros cinéticos de transferência de carga

Tendo em vista um mecanismo de quase-reversibilidade para a transferência de carga no sistema Mb/PMMA-b-PDMAEMA, procurou-se estabelecer os parâmetros eletrocatalíticos de transferência de carga (α) e de coeficiente de heterogeneidade padrão (K_S), a fim de auxiliar na elucidação do mecanismo reacional à superfície do eletrodo. Esses parâmetros eletrocatalíticos foram obtidos a partir do tratamento de Laviron, considerando valores ΔE_p maiores que 200 mV, como segue [72]:

$$E_{pc} = E^0 - \frac{RT}{\alpha nF} \cdot \log \nu \quad (11)$$

$$E_{pa} = E^0 + \frac{RT}{(1-\alpha)nF} \cdot \log \nu \quad (12)$$

Dessa forma, a partir de uma representação linear de $\log \nu$ versus E_p , pode-se determinar E^0 por extrapolação infinita ao eixo da ordenada, e α a partir da inclinação. O valor do coeficiente de heterogeneidade padrão pode então ser obtido por [69]:

$$\log(K_s) = \alpha \cdot \log(1-\alpha) + (1+\alpha) \cdot \log \alpha - \log \frac{RT}{F\nu} - (1-\alpha)\alpha nF \frac{\Delta E_p}{2.3RT} \quad (13)$$

A Figura 17 apresenta os resultados do tratamento de Laviron para modelos de transferência de carga confinados à superfície, conforme as equações acima. Por esse tratamento, foram encontrados valores de $n\alpha$ de $0,81 \pm 0,08$ e K_s de $0,055 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$. O baixo valor para o coeficiente K_s reforça a natureza quase-reversível do processo eletrocatalítico. A pequena variação de K_s com a velocidade de varredura também reforça um quadro adsorptivo para a transferência de carga [16, 19].

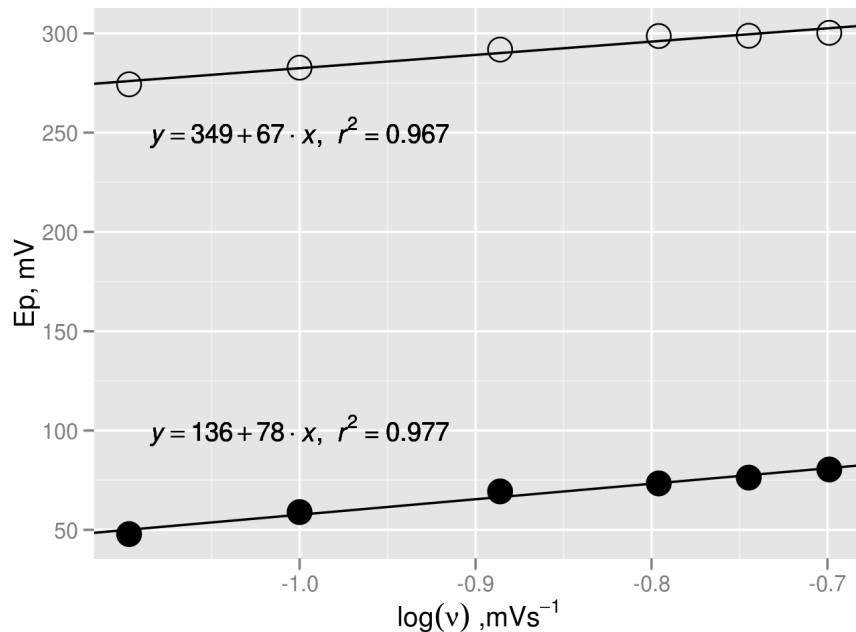


Figura 17: Dependência do potencial de pico E_p com o logaritmo da taxa de velocidade de varredura (ν) de Mb $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4.

O valor elevado para $n\alpha$ sugere a existência de dois elétrons envolvidos na transferência de carga à superfície do eletrodo modificado. A fim de validar esse resultado, buscou-se

uma determinação alternativa para o valor do coeficiente de transferência de carga por extrapolação linear de Tafel à equação de Butler-Volmer, conforme segue [16] (cap. 3):

$$\eta = \frac{2.3RT}{\alpha nF} \cdot \log i_0 - \frac{2.3RT}{\alpha nF} \cdot \log i \quad (14)$$

Onde η representa a sobretensão (potencial aplicado acima do potencial de equilíbrio), e i_0 a corrente de troca, conforme mencionado anteriormente (2), e representada pela faixa de corrente gerada quando o potencial aplicado iguala-se ao potencial de equilíbrio da reação ($\eta \simeq 0$). Dessa forma, uma representação linear do logaritmo da velocidade de varredura *versus* potencial de pico (E_p) pode fornecer o valor de b da inclinação de Tafel, como segue [73]:

$$E_p = \frac{b}{2} \cdot E + constante \quad (15)$$

A Figura 18 apresenta os resultados do tratamento. A partir desse, o valor $n\alpha$ foi de 0,77, condizente com o esperado acima para a transferência de dois elétrons durante um processo quase-reversível ($0,3 < \alpha < 0,7$) [18] (cap. 9).

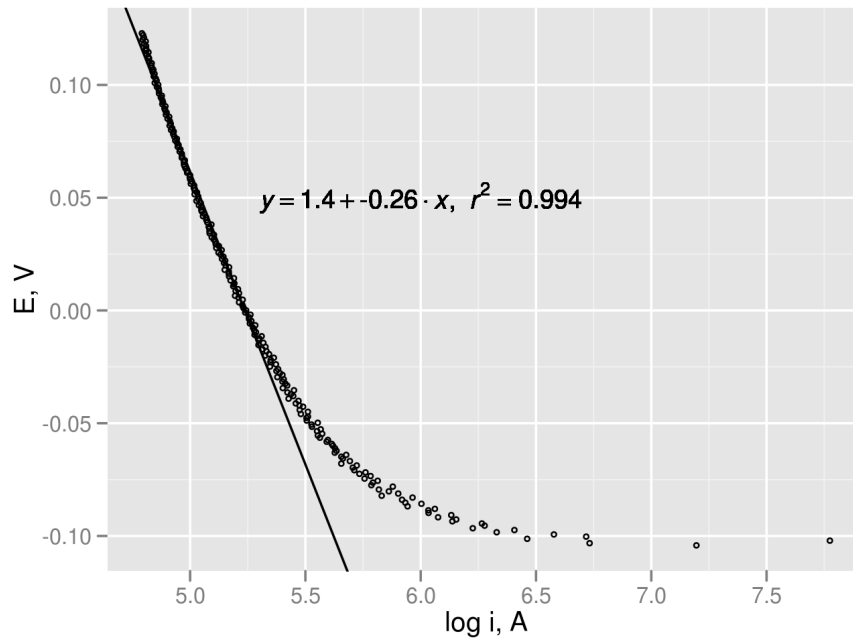


Figura 18: Dependência do potencial de pico com logaritmo da corrente de pico de Mb $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,4.

A Tabela 1 evidencia um sumário dos resultados obtidos da eletroanálise. O potencial de oxidação formal (E^0) para Mb indica valores obtidos com reprodutibilidade, porém difere dos valores da literatura. Isto pode ser devido à interação entre a proteína e o polímero, como relatado em [9, 66]. O valor αn reflete a quase-reversibilidade da reação [14].

Tabela 1: Parâmetros eletroanalíticos encontrados para a resposta ciclovoltamétrica de Mb/PMMA-b-PDMAEMA ($n=3$).

Parâmetros	média \pm sd
E^0 (V)	0,18 \pm 0,03
αn	0,80 \pm 0.27
K_s (s^{-1})	0,055 \pm 0,01

O coeficiente de transferência de carga, que mede o potencial da interface eletrodosolução, assumiu um valor médio aproximado para α de 0,40 em um processo quase-reversível, com o número de elétrons envolvidos na reação sendo igual a dois. O coeficiente de heterogeneidade padrão, K_s , que sinaliza a facilidade cinética da reação, sugere que a cinética foi de natureza lenta. Essa taxa reduzida de transferência pode ter sido devida à complexidade das moléculas submetidas à transferência de elétrons, e ao rearranjo molecular que pode suceder essa transferência [57]. Resultados aproximados também foram reportados ([5, 57]). Complementarmente, o parâmetro K_s , tal como determinado pelo modelo proposto por Laviron, utilizando-se ΔE_p maior que 200 mV/s [69], sofreu variação significativa com a velocidade (0,03-0,10 s^{-1}), o que também reforça a quase-reversibilidade da reação [16] (cap. 3).

6.6 Efeito da variação de pH

A eletrotransferência de Mb também foi analisada pela variação de pH, no intuito de se obter informações mecanísticas sobre o processo de transferência do complexo Mb-polímero. Os experimentos foram conduzidos na faixa de pH 4,0-7,5 em tampão fosfato por voltametria cíclica com taxa de varredura de 100 mV.s $^{-1}$. Os resultados apresentados à Figura 19 mostram um comportamento linear, com inclinação de -0,025 \pm 0,001 para Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Esse valor aproxima-se do valor teórico -0,029 V/pH, sugerido

para reações de transferência de carga acopladas a um processo químico envolvendo um próton H^+ e dois elétrons [16] (cap. 3).

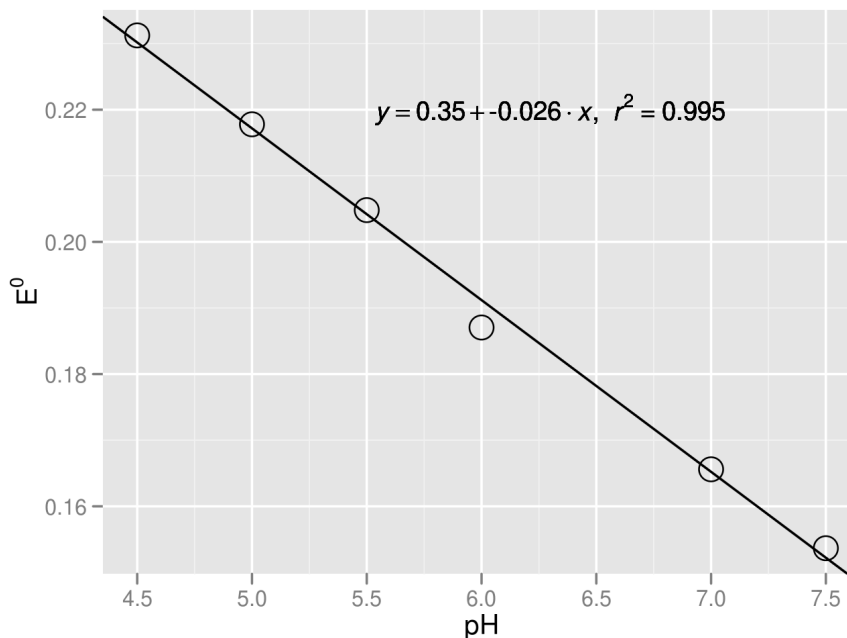


Figura 19: Efeito da variação de pH no potencial formal padrão encontrado para Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, eletrólito suporte de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Houve também uma variação no valor do coeficiente de heterogeneidade padrão K_s com pH, reforçando também a existência de prótons H^+ durante a eletrotransferência, sendo encontrado um valor de $0,33 \text{ s}^{-1}/\text{pH}$ para a inclinação linear de K_s com pH.

6.7 Determinação da atividade eletrocatalítica de Mb sobre H_2O_2

Com o objetivo de explorar a atividade catalítica de Mb imobilizada no eletrodo, foram conduzidos ensaios para verificar uma plausível atividade pseudocatalase para o composto Mb-polímero. Neste trabalho, o aumento do pico da corrente de redução, característico da atividade catalítica, ocorreu com o aumento da concentração de H_2O_2 em uma série crescente de concentrações de $0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 20). Por essa Figura pode-se observar um platô do substrato H_2O_2 de $0,27 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, na resposta catalítica, devido à saturação na atividade pseudoperoxidase de Mb, demonstrando um mecanismo cinético típico de Michaelis-Menten, conforme já reportado [72].

Tem sido relatado na literatura que, com a adição de H_2O_2 , o pico de redução de

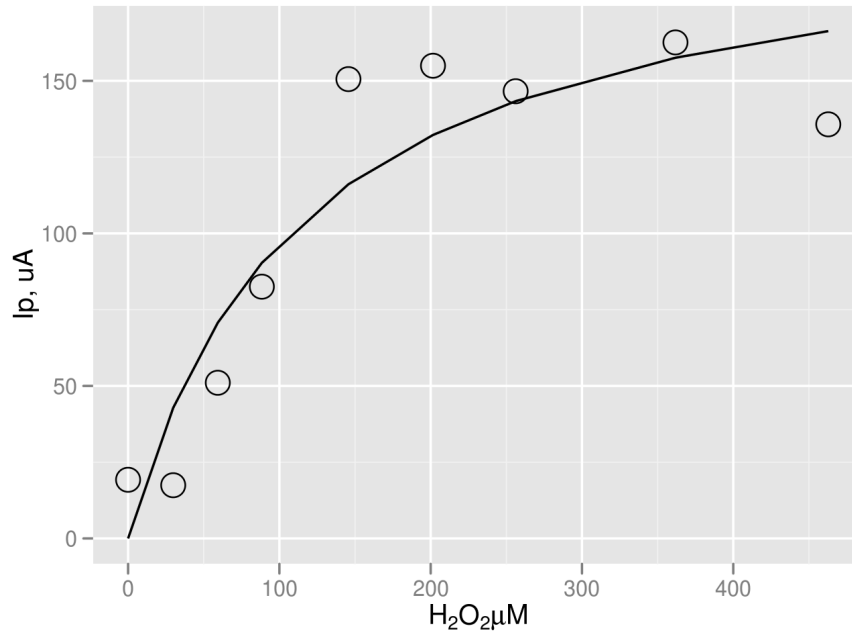


Figura 20: Resposta da variação da concentração de H₂O₂ sobre o eletrodo de Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de 100 mV.s⁻¹, eletrólito suporte de tampão fosfato sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4.

ferroproteínas tende a aumentar e o de oxidação desaparece por completo, o que demonstra um típico processo eletrocatalítico de redução de H₂O₂. Dessa forma, a constante catalítica (K_m) pode ser expressa por uma adaptação da equação de cinética enzimática de Lineweaver-Burk como segue [74]:

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_m}{I_{max}} \cdot \frac{1}{C} \quad (16)$$

Onde I_{ss} é a corrente medida após a adição de H₂O₂; C é a concentração de H₂O₂ e I_{max} é o valor máximo de corrente medida abaixo das condições de saturação de H₂O₂, e K_m é a constante aparente de Michaelis-Menten para a eletrocatalise. O resultado apresentado à Figura 21 mostrou fuga à linearidade prevista pela equação acima. Esse comportamento curvilíneo de Lineweaver-Burk sugere que apenas em altas concentrações do substrato o modelo foi controlado por catálise simples; em baixas concentrações, contudo, a resposta parece ter sido decorrente de um modelo controlado por transporte de massa [74], com desvios possíveis pelo confinamento de Mb na estrutura polimérica. Esse desvio poderia também ter decorrido do próprio copolímero, reduzindo a difusibilidade do substrato até a Mb imobilizada, e configurando um processo limitado por difusão.

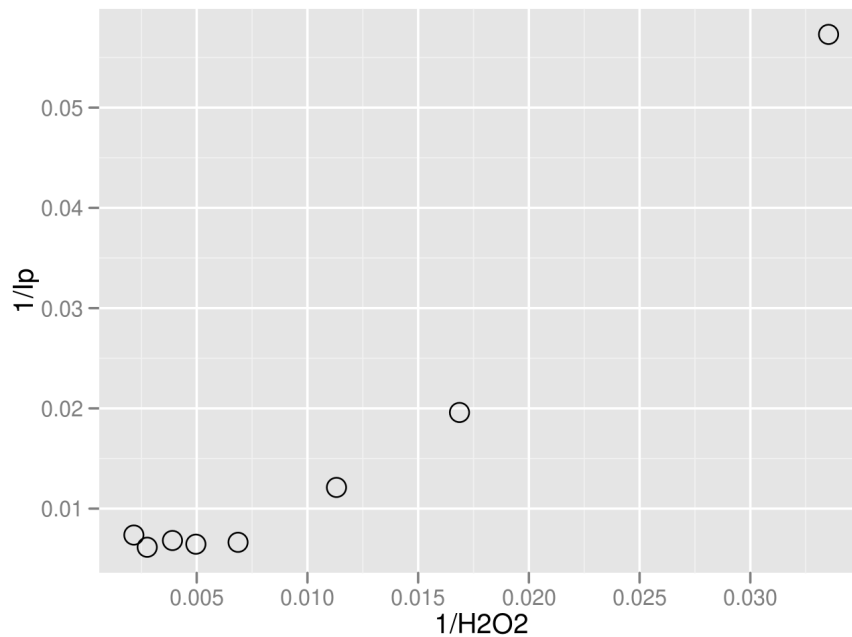


Figura 21: Representação de Lineweaver-Burk da resposta da variação de H_2O_2 sobre o eletrodo de Mb/PMMA-b-PDMAEMA. Velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, eletrólito suporte de tampão fosfato sódio $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4.

Com o desvio da linearidade na representação de Lineweaver-Burk, procedeu-se um ajuste não linear da equação de Michaelis-Mentem aos dados por algoritmo de Gauss-Newton [68], conforme a seguinte relação:

$$I_{ss} = \frac{I_{max} \cdot [H_2O_2]}{K_m + [H_2O_2]} \quad (17)$$

O resultado está apresentado na Figura 20. De acordo com este método, o valor de V_m aparente calculado foi de $207,5 \pm 38,2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, e K_m aparente de $114,7 \pm 58,7 \mu\text{M}$. Esse último, que representa o equilíbrio de formação do complexo Mb- H_2O_2 , foi similar ao reportado na literatura ($137 \mu\text{M}$ [9], $140 \mu\text{A}$ [75], $88 \mu\text{A}$ [72]). Esses resultados indicam que o complexo Mb/PMMA-b-PDMAEMA formado forneceu um ambiente favorável para imobilização de Mb, e preservou a atividade catalítica de Mb para H_2O_2 .

6.8 Efeito da temperatura

A fim de se obter informações acerca do equilíbrio termodinâmico do complexo, foram realizados ensaios não-isotérmicos com variação de temperatura da célula eletroquímica, contudo sem alteração térmica do eletrodo de referência, que permaneceu em contato

com a solução por ponte elétrica de Pt [76, 52, 50]. Os ensaios termodinâmicos foram conduzidos com o complexo Mb/PMMA-b-PDMAEMA com o aumento progressivo de temperatura (20 a 55 °C), em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4. Os parâmetros termodinâmicos do processo redox da mioglobina foram calculados seguindo o procedimento proposto por Tanigushi e colaboradores [77], pelas relações que seguem [52]:

$$\Delta S^0 = nF \left(\frac{d\Delta E^0}{dT} \right) \quad (18)$$

$$\Delta H^0 = -nF \left(\frac{d\Delta E^0/T}{d(1/T)} \right) \quad (19)$$

Dessa forma, a inclinação de um gráfico de T por E^0 pode fornecer a variação de entropia da transferência de carga (ΔS^0), ao passo que $1/T$ por E^0/T , a variação de entalpia envolvida na transição de trocas de carga (ΔH^0) [78], ocorrendo uma mudança da inclinação com a alteração de temperatura. Portanto estes parâmetros são constantes nesta faixa de temperatura. A variação de energia livre do processo, que é proporcional ao potencial, é composta por contribuições entálpicas e entrópicas, pode então ser obtida, seguindo a equação de Gibbs-Helmholtz [18] (cap. 9), ou por:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E^0 \quad (20)$$

Assim, os valores de ΔS^0 , ΔH^0 , e ΔG^0 podem ser extraídos, respectivamente, das Figuras 22 e 23. Os valores encontrados para ΔS^0 (18) e ΔH^0 (19) foram respectivamente, $351,34 \pm 0,0002$ J mol⁻¹ K⁻¹ e $-76831,90 \pm 0,78$ J mol⁻¹. Esses valores indicam uma variação de entropia baixa, porém positiva, em contraposição a uma grande variação negativa de entalpia. A variação positiva de entropia é creditada na literatura a processos de reorganização de solvente, em particular próxima ao grupo prostético metálico de Mb [76], expondo esses sítios àquele. Por outro lado, o alto valor negativo para ΔH^0 pode ter sido devido à hidrofobicidade do grupo heme de Mb, juntamente com uma estabilização de interações eletrostáticas em torno desse [50]. Essa última hipótese fundamenta-se parcialmente no efeito eletrostático da atmosfera iônica negativa em torno do grupo metálico,

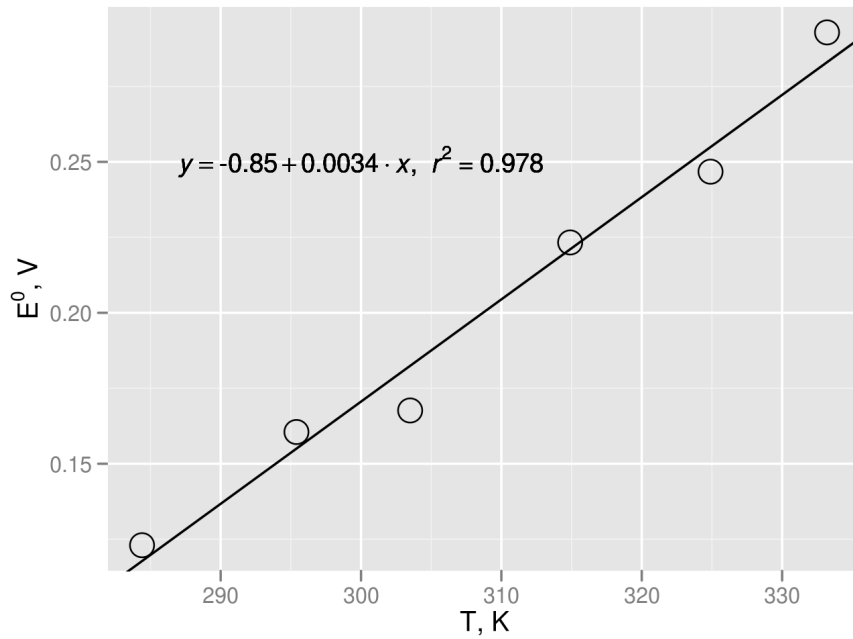


Figura 22: Gráfico de E^0 vs temperatura (K) para Mb/PMMA-b-PDMAEMA em ensaio termodinâmico não-isotérmico. Velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, eletrólito suporte de tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4.

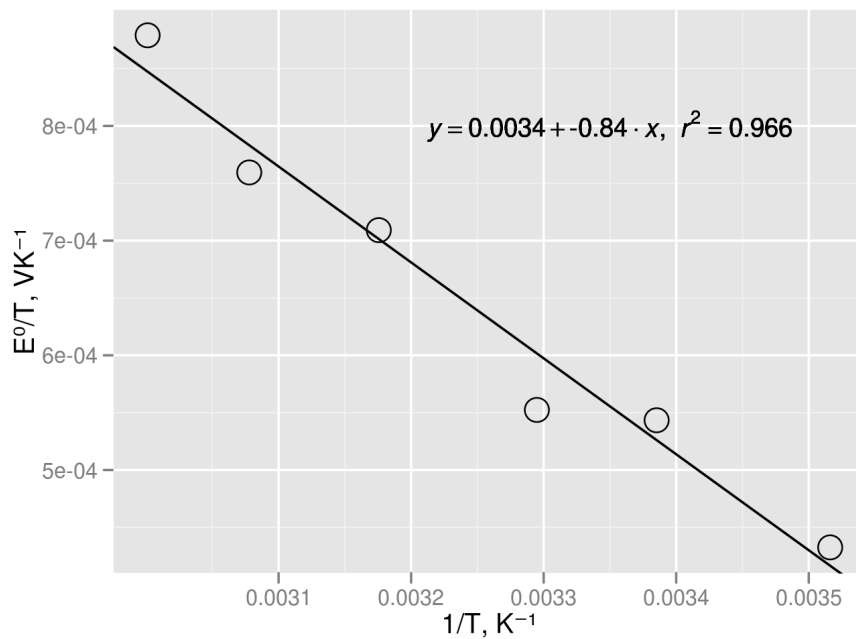


Figura 23: Gráfico de Gibbs-Helmholtz (E^0/T vs $1/T$ (K)) para Mb/PMMA-b-PDMAEMA/GLU em ensaio termodinâmico não-isotérmico. Velocidade de varredura de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, eletrólito suporte de tampão fosfato $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,4.

dado o valor do ponto isoelétrico (pI) para Mb em torno de 7,0 [6]. Um perfil similar aos resultados apresentados foi obtido com Mb em filme de didodecildimetilamônio [79].

6.9 Determinação da Estabilidade do Biossensor Para verificar a precisão, a reprodutibilidade, e o tempo de vida do biossensor Mb/PMMA-b-PDMAEMA, foram realizadas medidas diárias utilizando sempre o mesmo eletrodo de trabalho. O biossensor foi estocado em temperatura ambiente por 4 semanas, em solução tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.}^{-1}$, pH 7,4. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

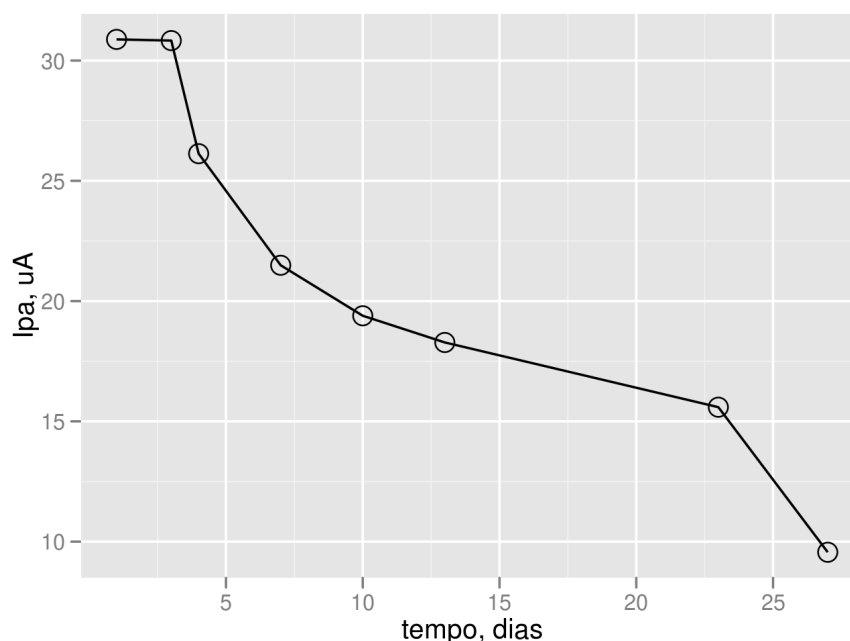


Figura 24: Efeito do tempo de estocagem do biossensor M/PMMA-b-PDMAEMA sobre a corrente de pico anódica em tampão fosfato sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,4. Velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} , temperatura de ensaio de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Apesar da redução nos valores de corrente de pico anódica, o eletrodo pareceu responder satisfatoriamente até o 3^o dia, a partir do qual passou a apresentar significativa redução no sinal amperométrico. Mesmo com essa diminuição na resposta, o biossensor ainda apresentou sensibilidade suficiente para ser utilizado em análises rotineiras, dada a perda aproximada de 50% do sinal amperométrico somente a partir da 3a. semana de estocagem.

6.10 Mecanismo proposto de formação do biossensor de PMMA-b-PDMAEMA

Como reportado por Gohy *et al.* [39], copolímeros neutros de PDMAEMA podem

sofrer associação livre ou mesmo agregação em meio aquoso, devido ao efeito hidrofóbico de seus blocos neutros. Esse dado é corroborado pelo aumento da solubilidade aquosa de PMMA-b-PDMAEMA, devido à presença de uma amina terciária em suas unidades monoméricas. Apesar de PDMAEMA ser considerado um polímero catiônico devido à presença dessas aminas terciárias (Figura 7), o valor de seu pKa situa-se entre 6,5 [39] e 8,0 [80]. Apenas em pH abaixo de 4,5 o bloco de PDMAEMA torna-se quase completamente carregado em solução aquosa [80]. Assim, é possível sugerir um estado parcial neutro ou levemente protonado para os copolímeros dibloco no pH 7,4 dos ensaios de imobilização utilizados nesta monografia. Dessa forma, os copolímeros de PMMA-b-PDMAEMA poderiam cumprir um papel duplo. Por um lado, a estrutura hidrofóbica de PMMA-b-PDMAEMA (Figura 7) poderia interagir com a superfície metálica de ouro dos eletrodos, reforçado pelo efeito hidrofóbico com o solvente aquoso e, simultaneamente à interação com grupos carregados positivamente na proteína, tais como resíduos de histidina (His), lisina (Lys), e arginina (Arg) de Mb. A interação com esses resíduos poderia ocorrer devido à rede de grupamentos éter eletronegativos da estrutura do copolímero, reforçando uma interação ion-dipolo entre Mb e estrutura final de PMMA-b-PDMAEMA. Resultado semelhante foi encontrado por Qiao *et al.* na produção de um biosensor modificado com polietilenoglicol depositado em camadas junto à Mb [81]. Essa interação ion-dipolo é corroborada pela própria agregação de um copolímero dibloco semelhante a PMMA-b-PDMAEMA, metacrilato de poli-(2-(diamino)) etila em bloco com ácido polimetacrílico (PDMAEMA-b-PMAA), em função do aumento nos valores de pH em meio aquoso [39]. Em pH abaixo do ponto isoelétrico (entre 6 e 9, dependendo da natureza e tamanho dos blocos), PDMAEMA forma micelas decorrentes da interação de seus blocos hidrofóbicos. Com aumento do pH, parte dos blocos torna-se ionizado, surgindo interações eletrostáticas entre a estrutura aniônica de PMAA e os blocos catiônicos de PDMAEMA, originando copolímeros dibloco anfífilos. De fato, a estrutura de Mb comporta 19 resíduos de Lys e 2 de Arg, com valores de pK em torno de 10–12 and 12–13, respectivamente, conferindo à Mb uma rede de carga positiva superficial para interação com PMMA-b-PDMAEMA no tampão [82], à despeito da proximidade de seu ponto isoelétrico (7,0; [61]). Os resíduos de His, em número de 6, encontram-se no cerne hidrofóbico da proteína [82], e são considerados menos acessíveis à interação. A presença

de aminas primárias na estrutura proteica, principalmente de resíduos de Lys, poderia reforçar a interação do complexo, face a ligação covalente (*crosslinking*) promovida por gluteraldeído. Complementarmente, a interação de Mb com PMMA-b-PDMAEMA poderia também ser favorecida pelo efeito ou interação hidrofóbica pertinente a ambas as estruturas, dada a extensão de cobertura de Mb/PMMA-b-PDMAEMA à superfície do eletrodo, como mencionado anteriormente. Dessa forma, os vetores da interação Mb-Mb, Mb-polímero e ouro-polímero, em conjunto, poderiam resultar numa maior estabilidade do filme polimérico de Mb/PMMA-b-PDMAEM cataliticamente ativo e aderido ao sensor.

7. Conclusões

- a. A voltametria cíclica da interação Mb/PMMA-b-PDMAEMA exibiu um processo de reação quase-reversível na superfície do eletrodo de ouro modificado, e distinto do eletrodo não modificado de Au, ou tratado apenas com o copolímero;
- b. A média da área eletroativa obtida foi de $1,146 \pm 0,137 \text{ cm}^2$;
- c. O retorno à integridade eletroquímica do sinal do eletrodo de Au foi obtido por extração do copolímero ligado por imersão em acetona por 10 s;
- d. Melhores resultados da imobilização da proteína na superfície áurica foram obtidos com gluteraldeído a 3% e copolímero a $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ em acetona, e Mb a $15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, em tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,4;
- e. O potencial padrão (E^0) de Mb/PMMA-b-PDMAEMA foi de 180 V ($100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$);
- f. A transferência de carga à superfície do eletrodo modificado sugeriu um processo controlado por adsorção ou por camada fina;
- g. O valor do coeficiente de transferência de carga (α) foi de 0,40;
- h. Os valores de K_s obtidos sugerem que a cinética de transferência foi lenta;
- i. Houve variação de K_s com pH, reforçando a existência de prótons H^+ durante a eletrotransferência;
- j. O processo de transferência eletrônica ocorreu na proporção de 2 elétrons para um próton;
- k. O eletrodo modificado exibiu atividade catalítica sobre H_2O_2 , e com constante aparente de Michaelis-Menten (K_m) de $115 \mu\text{M}$;
- l. A análise termodinâmica por ensaio não-isotérmico revelou valores de ΔS^0 e ΔH^0 de, respectivamente, $351,34 \pm 0,0002 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e $-76831,90 \pm 0,78 \text{ J mol}^{-1}$.
- m. A interação de PMMA-b-PDMAEMA com Mb permitiu a formação de um biosensor estável com eletrodo de ouro, com prováveis interações eletrostáticas entre resíduos expostos da proteína e grupos

Referências

- [1] STRYER, L. *Bioquímica*. [S.l.]: New York, 1995. cap.3, p.85–122. p.
- [2] FREIRE, R.; PESSOA, C.; KUBOTA, T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, v. 26, p. 381– 389, 2003.
- [3] AKRAM, M.; STUART, M.; WONG, D. Direct application strategy to immobilize a thioctic acid self-assembled monolayer on a gold electrode. *Analytica Chemistry Acta*, v. 504, p. 243–251, 2004.
- [4] GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, p. 345–359, 2002.
- [5] BILLAH, M. M. et al. Directed immobilization of reduced antibody fragments onto a novel SAM on gold for myoglobin impedance immunosensing. *Bioelectrochemistry*, v. 80, n. 1, p. 49–54, 2010. ISSN 1567-5394. A Selection of Papers presented at the 4th International Workshop on Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing (SMCBS 2009). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539410001258>>.
- [6] TAKANO, T. Structure of myoglobin refined at 2 Å resolution: II. structure of deoxymyoglobin from sperm whale. *Journal of Molecular Biology*, v. 110, n. 3, p. 569–584, 1977. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283677801125>>.
- [7] JOHNSON, K. A.; OLSON, J. S.; JR, G. N. P. Structure of myoglobin-ethyl isocyanide histidine as a swinging door for ligand entry. *Journal of Molecular Biology*, v. 207, n. 2, p. 459–463, 1989. ISSN 0022-2836. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283689902696>>.
- [8] WHITFORD, D. *Proteins Structure and Function*. [S.l.]: England, 2005.

- [9] PENG, H.-P. et al. Sonochemical synthesis of magnetic core shell Fe_2O_4/ZnO_2 nanoparticles and their application to the highly effective immobilization of myoglobin for direct electrochemistry. *Electrochimica Acta*, v. 56, n. 11, p. 4231–4236, 2011. ISSN 0013-4686. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468611001514>>.
- [10] HU, S. e. a. *Biosensors based on direct electron transfer of protein*. [S.l.]: New York, 2008. cap. 17, p. 531–581. p.
- [11] GALLI, A. *Desenvolvimento e caracterização de um Biossensor Bienzimático Imobilizado sobre monocamadas auto organizadas para determinação de açúcares em alimentos*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2007.
- [12] ZHANG, H. M.; LI, N. Q. The direct electrochemistry of myoglobin at a dl-homocysteine self-assembled gold electrode. *Bioelectrochemistry*, v. 53, n. 1, p. 97–101, 2001. ISSN 1567-5394. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030245980001276>>.
- [13] SKOOG, D. A. H. F. J. N. T. A. *Princípios de análise instrumental*. [S.l.]: Porto Alegre, 2002. cap.14, p.300–316. p.
- [14] WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. Wiley-VCH, 2006. 250 p. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/0471790303.fmatter>>.
- [15] ZOSKI, C. G. *Handbook of electrochemistry*. [S.l.]: Amsterdam, 2007. 935p. p.
- [16] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. Book. *Electrochemical methods : fundamentals and applications*. Wiley, New York :, 1980. xviii, 718 p. : p. ISBN 0471055425. Disponível em: <<http://www.loc.gov/catdir/toc/onix02/79024712.html>>.
- [17] BASTOS, M. *Contribuição ao estudo eletroanalítico das bases de Schiff SALEN e piridoxal-5-fosfato e alguns de seus complexos com Cu^{2+} , Co^{+2} , Ni^{2+} e UO_2^{+2}* . Tese (Doutorado) — Puc-Rio, Rio de Janeiro, 1997.
- [18] BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *ELECTROCHEMISTRY Principles, Methods, and Applications*. Oxford University Press Oxford, 1993. 978–984 p.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TWB-48H360D-D6/2/8103c4c3175f9d97d8b36b87bbf8a559>>.

- [19] NOEL, M.; VASU, K. *Cyclic Voltammetry and the frontiers of Electrochemistry*. [S.l.]: Oxford & IBH Publishing Co., 1990.
- [20] SILVA, J. *Estudo Voltamétrico da interação dos íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} com a Enzima Catalase*. Tese (Doutorado) — Universidade de Brasília., 2007.
- [21] ZANG, W.; LI, G. Third generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. *Analytical Sciences*, v. 20, 2004.
- [22] ARMSTRONG, F. A. Recent developments in faradaic bioelectrochemistry. *Electrochimica Acta*, v. 45, p. 2623–2645, 2000.
- [23] MORRIN, A. Characterisation of horseradish peroxidase immobilization on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques. *Biosensors Bioelectronics*, v. 18, p. 715–720, 2003.
- [24] VARMA, S.; MATTIASSON, B. Amperometric biosensor for the detection of hydrogen peroxide using catalase modified electrodes in polyacrylamide. *Journal of Biotechnology*, v. 119, p. 172–180, 2005.
- [25] ZANG, M. e. a. Direct voltammetry of catalase immobilized on silica sol-gel and cysteine modified gold electrode and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 22, p. 247–252, 2006.
- [26] LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *Journal of Electroceramics*, v. 1, p. 79–91, 2006.
- [27] QIAL, Y. Composite films of lecithin and heme proteins with electrochemical and electrocatalytic activities. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 315, p. 537–543, 2007.
- [28] EL-MAALI, N. Voltammetric analysis of drugs. *Bioelectrochemistry*, v. 64, p. 99 – 107, 2004.

- [29] ARAKAWA, T. Effect of the state of gold substrates on the surface composition of two-component alkanethiol self-assembled monolayers. *Electrochemistry Communications*, v. 7, p. 848–852, 2005.
- [30] CHAKI, N. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosensors e Bioelectronics*, v. 17, p. 1–12, 2002.
- [31] SATO, A. et al. Thermal stability and electron transfer reaction of modified myoglobin immobilized on a carbon electrode in poly(ethylene oxide) oligomers. *Electrochimica Acta*, v. 46, n. 1011, p. 1729–1735, 2001. ISSN 0013-4686. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468600007787>>.
- [32] FORERO, C.; ANGELINES, A. M. *Immobilization of myoglobin from horse skeletal muscle (Mb) and hemoglobin I (HbI) from Lucina pectinata in hydrophilic polymer networks for H₂S biosensor application*. Tese (Doutorado) — UNIVERSITY OF PUERTO RICO, 2006.
- [33] XIE, Y.; HU, N.; LIU, H. Bioelectrocatalytic reactivity of myoglobin in layer-by-layer films assembled with triblock copolymer pluronic f127. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 630, n. 12, p. 63–68, 2009. ISSN 1572-6657. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072809000734>>.
- [34] PEREIRA, C. a. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quim.Nova*, v. 25, p. 1012–21, 2002.
- [35] SASSOLAS, L. J. B. B. D. L.-B. A. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *30 (2012) 489–511*, v. 30, p. 489–511, 2012.
- [36] AHUJAA, I. A. M. D. K. R. T. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, v. 28, p. 791–805, 2007.
- [37] BROWN, R. A. *Comprehensive Polymer Science*. [S.l.]: Polymer Properties, 1989.
- [38] LEE, A. S. et al. Characterizing the structure of pH dependent polyelectrolyte block copolymer micelles. *Macromolecules*, v. 32, n. 13, p. 4302–4310, 1999. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma981865o>>.

- [39] GOHY, J.-F. et al. Aggregates formed by amphoteric diblock copolymers in water. *Macromolecules*, v. 33, n. 17, p. 6378–6387, 2000. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma992016j>>.
- [40] MCKEE, M. G. et al. Solution rheological behavior and electrospinning of cationic polyelectrolytes. *Macromolecules*, v. 39, n. 2, p. 575–583, 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma051786u>>.
- [41] LEE, S. B.; RUSSELL, A. J.; MATYJASZEWSKI, K. Atrp synthesis of amphiphilic random, gradient, and block copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate and n-butyl methacrylate in aqueous media. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 5, p. 1386–1393, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm034126a>>.
- [42] CHATTERJEE, U.; JEWRAJKA, S. K.; MANDAL, B. M. The amphiphilic block copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate and methyl methacrylate: Synthesis by atom transfer radical polymerization and solution properties. *Polymer*, v. 46, n. 24, p. 10699 – 10708, 2005. ISSN 0032-3861. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032386105013789>>.
- [43] SORDI, T. de et al. Controlled radical polymerization of 2,3-epithiopropyl methacrylate. *Macromolecular Rapid Communications*, WILEY-VCH Verlag, v. 28, n. 1, p. 63–71, 2007. ISSN 1521-3927. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/marc.200600641>>.
- [44] SAHNOUN, M. et al. Synthetic and characterization aspects of dimethylaminoethyl methacrylate reversible addition fragmentation chain transfer (raft) polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, v. 43, n. 16, p. 3551–3565, 2005. ISSN 1099-0518. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/pola.20813>>.
- [45] FLORENZANO, F. H. Cmc of pmma-block-pdmaema measured by npn fluorescence. *Polym. Bull.*, v. 67, p. 875–884, 2011.
- [46] SOUZA, J. de; NAVES, A.; FLORENZANO, F. Specific thermoresponsiveness of pmma-<i>block</i>-pdmaema to selected ions and other factors in aqueous

- solution. *Colloid & Polymer Science*, Springer Berlin / Heidelberg, p. 1–7. ISSN 0303-402X. 10.1007/s00396-012-2651-9. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00396-012-2651-9>>.
- [47] BAINES, F. L. et al. Micellization of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate-block-methyl methacrylate) copolymers in aqueous solution. *Macromolecules*, v. 29, n. 25, p. 8151–8159, 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma960740l>>.
- [48] NASSAR, A.-E. F.; WILLIS, W. S.; RUSLING, J. F. Electron Transfer from Electrodes to Myoglobin: Facilitated in Surfactant Films and Blocked by Adsorbed Biomacromolecules. *Analytical Chemistry*, v. 67, n. 14, p. 2386–2392, 1995. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00110a010>>.
- [49] HOOGLIET, J. C. et al. Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self-assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4. *Analytical Chemistry*, v. 72, n. 9, p. 2016–2021, 2000. PMID: 10815959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac991215y>>.
- [50] BORSARI, M. Redox thermodynamics of cytochrome c in mixed water organic solvent solutions. *Inorganica Chimica Acta*, v. 349, p. 182–188, 2003.
- [51] BATTISTUZZI, G. e. a. Redox thermodynamics, acid-base equilibria and salt-induced effects for the cucumber basic protein. general implications for blue-copper proteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, v. 2, p. 350–359, 1997.
- [52] SMITH, E. A variable-temperature direct electrochemical study of metalloproteins from hyperthermophilic microorganisms involved in hydrogen production from pyruvate. *Biochemistry*, v. 34, p. 7161–7169, 1995.
- [53] R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>.
- [54] POSTNIKOVA, G. B.; KOMAROV, Y. E.; YUMAKOVA, E. M. Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. *European Journal of Bioche-*

- mistry*, Blackwell Publishing Ltd, v. 198, n. 1, p. 223–232, 1991. ISSN 1432-1033. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16005.x>>.
- [55] COELHO, D. *Caracterização eletroquímica de uma monocamada auto-organizada mista composta por ácido 3- mercaptopropiônico e ácido 11-mercaptoundecanóico*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2007.
- [56] RESSINE, A. et al. Bioelectrochemical studies of azurin and laccase confined in three-dimensional chips based on gold-modified nano-/microstructured silicon. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 5, p. 1001–1007, 2010. ISSN 0956-5663. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566309005016>>.
- [57] ZHEN, Z. Immobilization of myoglobin on nio nanoparticles matrix for preparation of novel biosensor. *Bioelectrochemistry*, v. 38, p. 1533–1537, 2010.
- [58] LIU, H. et al. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme-proteins entrapped in agarose hydrogel films. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 20, n. 2, p. 294–304, 2004.
- [59] SOUZA, V. de et al. Cmc of pmma-block-pdmaema measured by npn fluorescence. *Polymer bulletin*, Springer, p. 1–10, 2011.
- [60] GUO, S. et al. Amphiphilic and biodegradable methoxy polyethylene glycol-block-(polycaprolactone-graft-poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)) as an effective gene carrier. *Biomaterials*, Elsevier, v. 32, n. 3, p. 879–889, 2011.
- [61] NAKAO, S. et al. Separation of proteins by charged ultrafiltration membranes. *Desalination*, v. 70, n. 1–3, p. 191 – 205, 1988. ISSN 0011-9164. [jce:title;International Membrane Technology Conference '88;jce:title](#). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001191648850549>>.
- [62] WILKINS, D. K. et al. Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient nmr techniques†. *Biochemistry*, v. 38, n. 50, p. 16424–16431, 1999. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi991765q>>.
- [63] DU, L. et al. A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. *Electrochimica acta*, Elsevier, v. 51, n. 26, p. 5754–5760, 2006.

- [64] MADANI, M.; ALY, S.; EL-SAYED, S. Dielectric relaxation of new aniline methyl methacrylate copolymer synthesized by gamma irradiation initiated polymerization. *High Performance Polymers*, SAGE Publications, v. 22, n. 5, p. 515–533, 2010.
- [65] ASAKA, K.; OTTOVA, A.; TIEN, H. Mediated electron transfer across supported bilayer lipid membrane (s-blm). *Thin Solid Films*, Elsevier, v. 354, n. 1, p. 201–207, 1999.
- [66] LIU, Y. et al. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on gold colloid/cysteine/nafion-modified platinum disk electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 115, n. 1, p. 109–115, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400505007744>>.
- [67] MEIER, P. C.; ZUND, R. E. *Statistical methods in analytical chemistry*. J. Wiley & sons, 2000. ISBN 9780471293637. Disponível em: <<http://www.worldcat.org/isbn/9780471293637>>.
- [68] CRAWLEY, M. J. *The R Book*. 1st. ed. [S.l.]: Wiley Publishing, 2007. ISBN 0470510242, 9780470510247.
- [69] LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, v. 101, n. 1, p. 19–28, 1979. ISSN 0022-0728. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072879800753>>.
- [70] SANTOS, M. C. dos et al. Electrochemical studies on small electron transfer proteins using membrane electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 541, n. 0, p. 153–162, 2003. ISSN 1572-6657. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072802014274>>.
- [71] GOSSER, D. K. J. *Cyclic voltammetry: simulation and analysis of reaction mechanisms*. [S.l.]: New York, 1993.
- [72] HUANG, J.; ZHENG, J.; SHENG, Q. Direct electrochemistry of myoglobin based on electrodeposition of pd nanoparticles with carbon ionic liquid electrode as basic

- electrode. *Microchimica Acta*, Springer Wien, v. 173, p. 157–163, 2011. ISSN 0026-3672. 10.1007/s00604-010-0529-4. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00604-010-0529-4>>.
- [73] KAMYABI, M. et al. Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid and simultaneous determination of ascorbic acid and dopamine at a bis(4-(4-pyridyl)-2,2:6,2-terpyridine)iron(ii) thiocyanate carbon past modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 632, n. 1–2, p. 170–176, 2009. ISSN 1572-6657. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022072809001417>>.
- [74] KAMIN, R. A.; WILSON, G. S. Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Analytical Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 1198–1205, 1980. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac50058a010>>.
- [75] LIU, A. Direct electrochemistry of myoglobin in titanate nanotubes film. *Anal. Chem.*, v. 77, p. 8068–8074, 2005.
- [76] BATTISTUZZI, G. et al. Redox properties of the basic blue protein (plantacyanin) from spinach. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 69, n. 1–2, p. 97–100, 1998. ISSN 0162-0134. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013497100265>>.
- [77] TANIGUCHI, V. T. et al. Thermodynamics of metalloprotein electron transfer reactions. *Pure and Applied Chemistry*, v. 52, p. 2275–2281, 1980.
- [78] WILLIT, J. L.; BOWDEN, E. F. Adsorption and redox thermodynamics of strongly adsorbed cytochrome c on tin oxide electrodes. *Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 94, n. 21, p. 8241–8246, 1990. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100384a048>>.
- [79] IVANOVA, V. M. E. Direct electron transfer of haemoglobin and myoglobin in methanol and ethanol at didodecyldimethylammonium bromide modified pyrolytic graphite electrodes. *Electrochemistry Communications*, v. 7, p. 323–327, 2005.

- [80] GOHY, J.; ANTOUN, S.; JÉRÔME, R. pH-dependent micellization of poly (2-vinylpyridine)-block-poly ((dimethylamino) ethyl methacrylate) diblock copolymers. *Macromolecules*, ACS Publications, v. 34, n. 21, p. 7435–7440, 2001.
- [81] QIAO, K.; LIU, H.; HU, N. Layer-by-layer assembly of myoglobin and nonionic poly(ethylene glycol) through ion–dipole interaction: An electrochemical study. *Electrochimica Acta*, v. 53, n. 14, p. 4654 – 4662, 2008. ISSN 0013-4686. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013468608001576>>.
- [82] STIGTER D., A. D. D. K. Protein stability: Electrostatics and compact denatured states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 88, n. 10, p. 4176–4180, 1991. Cited By (since 1996) 72. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2>>.