

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**Márcio José Batista Cardoso**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ELETROQUÍMICO COM IMOBILIZAÇÃO  
DA UREASE EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**

Campina Grande – PB

2016

**Márcio José Batista Cardoso**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR ELETROQUÍMICO COM IMOBILIZAÇÃO  
DA UREASE EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ramdayal Swarnakar

**Agência Financiadora:** CAPES

Campina Grande – PB

2016

## VITAE DO CANDIDATO

Márcio José Batista Cardoso

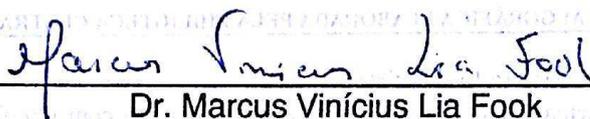
- Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2010).
- Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande (2012).

**MÁRCIO JOSÉ BATISTA CARDOSO**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO COM IMOBILIZAÇÃO  
DA UREÁSE EM MEMBRANAS POLIMÉRICAS**

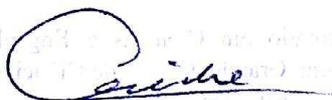
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 21/10/2016



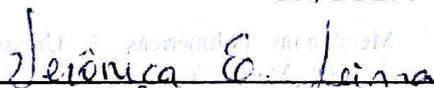
Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Orientador  
PPG-CEMat/UFCG



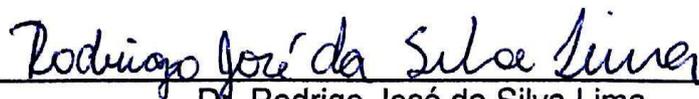
Dr. Carlos Andrés Peniche Covas

Examinador Externo  
UH/CUBA



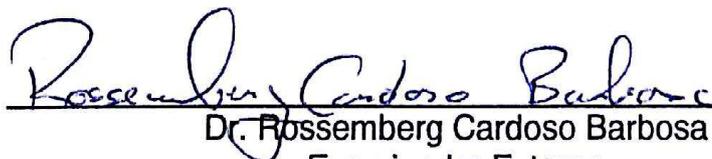
Dr.ª Veronica Evangelista de Lima

Examinadora Externa  
DQ/UEPB



Dr. Rodrigo José da Silva Lima

Examinador Externo  
DF/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa

Examinador Externo  
UFCG

*Dedico este trabalho a Deus.*

*A minha mãe, noiva, irmã, em memória do meu irmão e a  
todas as pessoas que acreditaram no meu potencial e  
contribuíram neste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Esses 4 anos de pesquisa e trabalho do doutorado não foi resultado apenas do esforço individual, mas sim de inúmeras contribuições adquiridos durante toda minha trajetória profissional, acadêmica e como cidadão, ao lidar com pessoas (infelizmente algumas não estão mais entre nós) e instituições que foram fundamentais nessa árdua jornada de trabalhos, desafios, construção e amadurecimento. Apesar de ser uma tarefa praticamente impossível listar todos que de alguma forma contribuíram para minha formação, faço meu agradecimento a algumas pessoas nessa minha jornada.

A **Deus**, por sempre me conduzir em cada momento da minha vida e fortalecer nos momentos difíceis permitindo alcançar vitórias, alegrias e por ter colocado no meu caminho pessoas incríveis que sempre irá fazer parte da minha vida.

A minha mãe **Maria Margarene Batista Carlos**, pelo carinho, pela dedicação em meus estudos, pelos ensinamentos e pelo amor incondicional.

A minha noiva **Keilly Granjeiro Wanderley** pelo amor, carinho, ajuda, por acreditar em minha pessoa e sempre me motivar a dar sempre o melhor de mim.

Ao meu tio **Dr. Pedro Carlos de Assis Júnior** que sempre me motivou e acreditou no meu potencial, pelos ensinamentos, carinho, ajuda, me dando sempre bons conselhos, sem o qual hoje não estaria aqui.

A minha irmã **Paloma** e em memória do meu irmão **Pedro**, a meus primos **Renato, Robson, Alexia, Angélica, Aline, Alex, Felipe, Matheus, David**, e meus tios, **Antônio, José Agailton, Marilene, Margarida, Marinalda, Freire, Sebatião, Iria**, pelo carinho, compreensão, confiança e ajuda ao longo de minha vida.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinícius Lia Fook** pela confiança no meu trabalho, oportunidades, ensinamentos e reconhecimento do meu potencial tanto academicamente quanto como pessoa, que me motivaram diversas vezes a fazer sempre o melhor e não a desistir.

Em memória do Professor **Dr. Ramadaya Swarnakar** meu co-orientador que nesse tempo tive a oportunidade única de conhecer e trabalhar, ao qual sem ele esse trabalho não seria possível, pela sua disponibilidade, ensinamentos, conselhos e reconhecimento que sempre me motivaram. Lembro dos horários que marcava para conversar e de pedir para falar o que eu entendia das discussões dos trabalhos,

sempre disposto a escutar, respeitando o espaço de cada pessoal. Uma pessoa sábia, genial e humilde.

Ao Professor Dr. **Reginaldo Severo de Macedo** ao qual serei sempre grato.

Ao Dr. **Rossemberg Cardoso Barbosa**, amigo, que desde que iniciei o mestrado e tive a oportunidade de conviver, sempre me ajudando nos trabalhos, pelos ensinamentos, conversas e por hoje aceitar esse desafio nessa etapa final contribuindo no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Rodrigo José da Silva Lima**, amigo, colega de trabalho, pelas inúmeras ajudas, pela disponibilidade, confiança, ensinamentos, reconhecimento, pela ajuda no projeto, seminário, qualificação e agora na tese final, você foi o segundo co-orientador no desenvolvimento desta tese.

Aos Professores **Dr. Carlos Andrés Peniche Covas** e **Dr<sup>a</sup> Verônica Evangelista** pela disponibilidade, gentileza e por aceitar esse desafio de me ajudar no final dessa etapa acadêmica contribuindo para melhoria desse meu trabalho.

Ao **Dr. Rodrigo Rezende Alvarenga** que conheci no Congresso de Biomateriais na China, e nos giros do mundo veio a ser membro da banca examinadora da qualificação de doutorado, pela disponibilidade, gentileza e valiosas contribuições sugeridas para melhoria do meu trabalho.

Ao professor Dr. **Raúl García Carrodegus** membro da banca examinadora do seminário de doutorado, pela disponibilidade, gentileza e valiosas contribuições sugeridas.

Aos amigos do CERTBIO da UFCG, **Wladymyr Jefferson, Katilayne Vieira, Klaydson Farias, Thiago Fidelis, Maria Roberta, Waldênia, Izabel, Hugo Yves, Glória, Ítalo, Emanuel, Rita, Antônio Francisco, Lívia, Paulinha, Sérgio Pereira, Dailma, Zélia, Otto, Pedro, Suyana, Daniel, Tania, Vitor, Raid, Bianca, Camila, Paloma** e em memória do **Dr. Bartolomeu Jorge**, companheiros de trabalho que me ajudaram, cada um com seu jeito particular mais colaboraram para que esse trabalho fosse possível.

Ao **corpo docente** de Engenharia de Materiais.

À **CAPES**, pelo auxílio financeiro.

## EPIGRAFE

*“O Cientista precisa escrever, não só para ser compreendido,  
mas principalmente para não ser mal entendido.”*

*McClelland*

*“É ótimo celebrar o sucesso, mas mais importante ainda é assimilar  
as lições trazidas pelos erros que cometemos”*

*Bill Gates*

## RESUMO

Os biossensores são dispositivos analíticos capazes de identificar substâncias específicas, qualitativamente e/ou quantitativamente, utilizados em diversas aplicações, que vêm se aprimorando ao longo dos anos. Esses dispositivos analíticos apresentam um amplo crescimento econômico, com destaque dos dispositivos de diagnósticos e point of care, devido suas respostas rápidas e precisas na determinação de doenças, variações de substâncias no corpo humano que venham a ser prejudicial ou não à saúde. A ureia é uma dessas substâncias presentes no corpo humano e o aumento da taxa de ureia no sangue ocorre em casos de insuficiência renal aguda ou crônica, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação acentuada, catabolismo proteico aumentado, perda muscular. Alguns medicamentos também podem causar aumentos da ureia. Apesar das inúmeras patentes, artigos, dissertações e teses, a pesquisa no desenvolvimento de biossensores para acompanhamento da taxa de ureia ainda se mostra presente atualmente. Essas observações motivaram a estudar e desenvolver um biossensor para detecção de ureia. Para tal, foram estudadas: a preparação do eletrodo em fita de aço inox com eletrodeposição de antimônio; modificação da fase cristalina formada e a imobilização da enzima urease em membranas poliméricas de acetato de quitosana e acetato de celulose sobre o eletrodo. Sendo caracterizados por difração de raios X (DRX), microscopia ótica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliação das propriedades do biossensor: sensibilidade; linearidade; período de estabilidade; seletividade; reprodutibilidade e repetibilidade. As imagens obtidas por MO mostram que a condição da eletrodeposição altera o recobrimento da superfície das fitas de aço inox com diminuição dos defeitos, com o tratamento térmico há uma modificação superficial dos eletrodos. As imagens obtidas por MEV mostram também uma superfície rugosa e porosa em que há um crescimento de estruturas de formas distintas. Os resultados de DRX mostram que a condição de eletrodeposição afeta na formação do tamanho dos cristalitos e o tratamento térmico modifica a fase cristalina formada na eletrodeposição. As imagens obtidas por MO das membranas de acetato de quitosana e acetato de celulose com e sem enzima uréase apresentam uma superfície uniforme sem alteração morfológica. As imagens de MEV mostram que as membranas poliméricas recobrem os eletrodos, no entanto, as membranas de quitosana formam camadas mais densas. Os resultados de sensibilidade, linearidade e período de estabilidade mostram que todos os biossensores são sensíveis a concentrações de ureia e apresentaram faixa de linearidade onde suas respostas são melhores, o período de estabilidade foi inferior a 2 minutos na maioria dos casos. Os resultados de seletividade mostram que os biossensores são seletivos sofrendo mínima alteração na presença creatinina. Na reprodutibilidade verificou-se que os biossensores são reprodutíveis com mínima de variação das biorespostas. Os resultados de repetibilidade mostram que os biossensores começam a sofrer variação dos resultados com poucas medições. Os resultados indicam que tanto as membranas de acetato de quitosana quanto de acetato de celulose são viáveis para imobilização da enzima e que a modificação do antimônio metálico para o óxido com o tratamento térmico utilizado nos eletrodos dos biossensores melhora significativamente as propriedades do biossensor.

**Palavras-chave:** Biossensores. Membranas poliméricas. Urease. Antimônio.

## ABSTRACT

Biosensors are analytical devices able to identify specific substances qualitatively and / or quantitatively, used in various applications, which have been improved over the years. These analytical devices have a broad-based economic growth, especially of diagnostics and point of care devices because of its fast, accurate answers in determining diseases, variations of substances in the human body that may be harmful or not to health. Urea is one of these substances in the human body and increased blood urea ratio occurs in acute or chronic renal failure, congestive heart failure, severe dehydration, increased protein catabolism, muscle loss. Some medications can also cause increases in urea. Despite the numerous patents, articles, dissertations and theses, research in the development of biosensors for urea rate monitoring are still present today. These observations prompted us to study and develop a biosensor for urea detection. To this end were studied: the preparation of the electrode in stainless steel ribbon with electrodeposition antimony, modification of the crystalline phase formed and immobilizing the urease enzyme in polymer membranes of chitosan and cellulose acetate on the electrode. They were characterized by X-ray diffraction (XRD), optical microscopy (OM) and scanning electron microscopy (SEM) and evaluation of biosensor properties: sensitivity, linearity, period of stability, selectivity, reproducibility and repeatability. The images obtained by OM show that the condition of the electrodeposition coating changes the surface of stainless steel strips with decreasing defects with heat treatment there is a surface modification of electrodes. The images obtained by SEM also show a roughened, porous surface in which there is a growth of different forms of structures. The XRD results show that the electrodeposition condition affects the formation of crystallite size and heat treatment modifies the crystal phase formed in electrodeposition. The images obtained by OM of chitosan and cellulose acetate membranes with and without enzyme urease have a uniform surface without morphological changes. The SEM showed that the polymer membrane overlying pictures electrodes, however, the chitosan membranes formed thicker layers. The results of sensitivity, linearity and stability period showed that all biosensors are sensitive to concentrations of urea and showed linearity range where answers are best, the period of stability was less than 2 minutes in most cases. The selectivity results show that the biosensors are selective and suffer minimal changes in the presence of creatinine. In the reproducibility, it was found that the biosensors are reproducible with minimal variation in bioresponse. The repeatability results show that the biosensor begin to undergo variation in results with few measurements. The results indicate that both chitosan and cellulose acetate membranes are viable for enzyme immobilization and modification of the metal oxide with antimony for the heat treatment used in the electrodes of the biosensor significantly improves the biosensor properties.

**Keywords:** Biosensors. Polymeric membranes. Urease. Antimony.

## PUBLICAÇÕES

A partir da elaboração do trabalho da **tese de doutorado intitulada “Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico com Imobilização da Urease em Membranas Poliméricas”** foi publicado e está sob avaliação as seguintes publicações:

Artigo completo submetidos:

- ✓ Effect of Process of Electrodeposition and Modification of the Crystalline Structure of Antimony in Strips of Stainless Steel for Development of Electrodes for Biosensors submetido a revista “**Materials Science and Engineering C**” em 08 de junho de 2016.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos:

- ✓ CARDOSO, M. J. B.; FARIAS, K. A.; EULALIO, H. Y. C.; MARINHO, T. M. A.; VASCONCELOS, A. S.; LIMA, R. J. S.; SWARNAKAR, R.; M. V. L. FOOK. **Caracterização da Eletrodeposição de Antimônio em Fitas de Aço Inox para Desenvolvimento de Biossensores**. In: 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015, Campina Grande. 4ª Edição do Workshop de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais, 2015.
- ✓ CARDOSO, M. J. B.; FARIAS, K. A.; EULÁLIO, H. Y. C.; MARINHO, T. M. A.; LIMA, R. J. S.; FOOK, M. V. L. **Avaliação do Efeito da Imobilização da Uréase em Diferentes Membranas Poliméricas nas Propriedades do Biossensor Enzimático em Fitas**. In: 9º Congresso Latino-Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2016, Foz do Iguaçu, PR, Brasil 13º Congresso da Sociedade Latino Americana de Biomateriais, Engenharia de Tecidos e Órgãos Artificiais - SLABO (9 COLAQB), 2016.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do marco histórico dos biossensores (Fonte: Própria).....	21
Figura 2 - Mercado total de Biossensores: Percentual de Receitas no Mundo (Gaspar, 2010). .....	22
Figura 3 - Componentes fundamentais de um biossensor (Fonte: Própria). .....	23
Figura 4 - Classificação dos biossensores (Moreira et al., 2010; Melo, 2008; Singh et al., 2008; Malhotra; Turner, 2003;). .....	23
Figura 5 - Fluxograma dos tipos de biossensores mais usados em função do bioreceptor e transdutor (Fonte: Própria). .....	26
Figura 6 - Esquema de funcionamento de um biossensor de 1ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012)). .....	28
Figura 7 - Esquema de funcionamento de um biossensor de 2ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012)). .....	29
Figura 8 - Esquema de funcionamento dos biossensores da 3ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012)). .....	30
Figura 9 - Esquema de funcionamento dos transdutores (transdutores ativos e simples). .....	30
Figura 10 – Esquema de funcionamento dos transdutores passivos. ....	31
Figura 11 - Esquema de funcionamento dos transdutores compostos.....	31
Figura 12 - Esquema do processo de eletrodeposição (Adaptado de: (Stenger, 2008)). .....	35
Figura 13 - Reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease (Laprotax, 2011a). .....	37
Figura 14 - Representação do esquema de sítios ativos da urease (Andrea Graydon, Alexander Berchansky, Michal Harel, 2015).....	37
Figura 15 - Métodos de imobilização enzimática (Dalla-Vecchia et al., 2004). .....	38
Figura 16 - Estrutura química da quitosana (S. Rubens & Pavone, 2008). .....	40
Figura 17 - Estrutura molecular da celulose (Stock Royalty, 2016).....	42
Figura 18 - Estrutura molecular do acetato de celulose (Stock Royalty, 2016). .....	42
Figura 19 - Estrutura química da ureia (Wikipédia, 2014) .....	43
Figura 20 - Eletrodeposição do óxido de antimônio sobre o aço inox (Fonte: Própria). .....	48
Figura 21 - Recobrimento do eletrodo pelo método de mergulho (Fonte: Própria). ..	49
Figura 22 – Microscopia ótica das fitas de aço inox sem e com tratamento térmico respectivamente (Fonte: Própria). .....	55
Figura 23 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria). .....	56

Figura 24 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).....	57
Figura 25 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).....	58
Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria). ....	59
Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria). ....	60
Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria). ....	61
Figura 29 - Padrão de difração de raios X do antimônio e dos óxidos de antimônio (Fonte: Própria). ....	62
Figura 30 - Análise pelo método de Rietveld dos difratogramas de raios X dos eletrodos nas diferentes condições de eletrodeposição sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria). ....	64
Figura 31 - Tamanho de cristalitos de antimônio formados nas diferentes condições de eletrodeposição sem tratamento térmico (Fonte: Própria).....	67
Figura 32 - Tamanho de cristalitos dos óxidos de antimônio formados nas diferentes condições de eletrodeposição com tratamento térmico (Fonte: Própria). ....	67
Figura 33 - Microscopia ótica das membranas de quitosana sem e com enzima urease (Fonte: Própria). ....	69
Figura 34 - Microscopia ótica das membranas de acetato de celulose sem e com enzima urease (Fonte: Própria).....	70
Figura 35 - Membranas de quitosana sem e com imobilização da enzima urease sobre o eletrodo (Fonte: Própria). ....	71
Figura 36 - Membranas de acetato de celulose sem e com imobilização da enzima urease sobre o eletrodo (Fonte: Própria).....	72
Figura 37 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de quitosana (Fonte: Própria).....	74
Figura 38 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose (Fonte: Própria). ....	74
Figura 39 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de quitosana (Fonte: Própria).....	75
Figura 40 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose (Fonte: Própria). ....	75
Figura 41 - Curva de bioresposta com as linhas de linearidade do biossensor "Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria). ....	77
Figura 42 - Curva de período de estabilidade para o biossensor Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit (Fonte: Própria).....	78
Figura 43 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria). ....	86

Figura 44 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria). .....	86
Figura 45 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" (Fonte: Própria). .....	86
Figura 46 - Curva de seletividade do biossensor " Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit " (Fonte: Própria). .....	87
Figura 47 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria). .....	88
Figura 48 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Acet" (Fonte: Própria). .....	88
Figura 49 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor " Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet " (Fonte: Própria). .....	89
Figura 50 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit " (Fonte: Própria). .....	89
Figura 51 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria). .....	90
Figura 52 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria). .....	90
Figura 53 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor " Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet " (Fonte: Própria). .....	91
Figura 54 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit" (Fonte: Própria). .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições de preparação dos eletrodos.....	54
Tabela 2 - Parâmetros Cristalográficos das amostras nas diferentes condições de eletrodeposição com e sem tratamento térmico.....	65
Tabela 3 – Os dados do fator de confiança do refinamento das amostras nas diferentes condições de eletrodeposição sem e com tratamento térmico.....	66
Tabela 4 – Membranas de quitosana e acetato de celulose. ....	68
Tabela 5 - Grupos de biossensores avaliados por sensibilidade, faixa de linearidade e período de estabilidade. ....	73
Tabela 6 - Resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de quitosana. ....	79
Tabela 7 - Resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.....	80
Tabela 8 - Resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de quitosana. ....	82
Tabela 9 - Resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.....	83
Tabela 10 - Biossensores selecionados para realização das caracterizações de seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade.....	85

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3. Biossensores .....	20
3.1 Biossensores eletroquímicos .....	27
3.2 Biossensores Enzimáticos .....	28
3.3 Componentes dos biossensores .....	30
3.3.1 Transdutores .....	30
3.3.2 Materiais e Designer dos Transdutores .....	32
3.3.3 Eletrodeposições .....	33
3.4 Componente Biológico dos Biossensores .....	35
3.4.1 Bioreceptor .....	35
3.4.2 Enzima Urease .....	36
3.4.3 Imobilização do Componente Biológico .....	38
3.5 Polímeros Naturais .....	39
3.5.1 Quitosana .....	40
3.5.2 Acetato de Celulose .....	41
3.6 Analito - Ureia .....	43
3.7 Estado da Arte .....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	47
4.1 Local da Pesquisa .....	47
4.2 Reagentes e Materiais .....	47
4.3 Métodos .....	47
4.3.1 Preparação do eletrodo referência .....	47
4.3.2 Preparação do eletrodo sensor .....	49
4.4 Caracterização da eletrodeposição do Antimônio .....	49
4.4.1 Microscopia Óptica (MO) .....	49
4.4.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	50
4.4.3 <i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	50
4.5 Caracterização morfológica das membranas poliméricas .....	51
4.5.1 Microscopia Óptica (MO) .....	51
4.5.2 <i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	51

4.6	Caracterização das Propriedades dos Biossensores .....	51
4.6.1	Sensibilidade .....	51
4.6.2	Faixa de Linearidade .....	52
4.6.3	Período de estabilidade .....	52
4.6.4	Seletividade .....	52
4.6.5	Reprodutibilidade.....	53
4.6.6	Repetibilidade .....	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	54
5.1	Caracterização da eletrodeposição do Antimônio .....	54
5.1.1	<i>Microscopia Óptica (MO)</i> .....	54
5.1.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i> .....	59
5.1.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	62
5.2	Caracterização físico-química e morfológica das camadas matriz dos eletrodos .....	68
5.2.1	Microscopia Óptica (MO) .....	68
5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	70
5.3	Caracterizações das Propriedades do Biossensores .....	73
4.3.1	Sensibilidade .....	73
4.3.2	Faixa de Linearidade .....	76
4.3.3	Período de Estabilidade .....	77
4.3.4	Seletividade.....	85
4.3.5	Reprodutibilidade .....	87
4.3.6	Repetibilidade .....	89
6.	CONCLUSÃO .....	92
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	94
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95
Anexo I	.....	103
Anexo II	.....	108
Anexo III	.....	121

## 1. INTRODUÇÃO

Os elevados índices de pesquisas no desenvolvimento de dispositivos analíticos denominados “biossensores”, desde seu primeiro biossensor em 1962 até a atualidade, devem-se as suas características tais como: menor tempo de análise, possibilidade de miniaturização, portabilidade, menor custo operacional, seletividade, bom limite de detecção, aplicações online e no campo de medição, por dispensarem elaborado pré-tratamento das amostras (praticidade), entre outras (Alhadeff, 2011; Moreira et al., 2010). Esses dispositivos analíticos são constituídos por quatro componentes fundamentais: analito (elemento que deseja identificar e quantificar); bioreceptor (elemento de reconhecimento biológico); transdutor (conversor de um sinal elétrico, químico ou mecânico em outro sinal correspondente) e o detector/processador (tornar o sinal visível, mensurável), capazes de converter a concentração de um analito em outro sinal proporcional a sua concentração, através Da Integração De Um Elemento Biológico Sensor Com Um Transdutor (Calil; Roberto, 2011; Moreira et al., 2010; Fatibello-Filho, O; Capelato, 1992).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o bioreceptor, ou seja, elemento de reconhecimento biológico e quanto ao transdutor (Alhadeff, 2011; Melo, 2008; Singh et al., 2008). Dentre os diferentes tipos de biossensores, os eletroquímicos que podem ser de três tipos: amperométrico, condutimétrico ou potenciométrico destacam-se principalmente devido a propriedades tais como: elevada seletividade, sensibilidade e baixo custo além de apresentarem uma variedade de produto de reações mensuráveis no processo catalíticos, que incluem prótons, elétrons, luz e calor (Chambers et al., 2008; Davi et al., 2011). Propriedades essas que são associadas ao elemento de reconhecimento biológico tais como: ácidos nucleicos, anticorpo, antígeno, células, enzima, organelas, tecidos etc. (Calil; Roberto, 2011; Rodrigues, 2014).

Entre os elementos de reconhecimento biológico as enzimas que são, por definição, proteínas, possuem extraordinária capacidade de catalisar reações biológicas com um alto grau de especificidade, são componentes de extrema importância para a fabricação de biossensores propiciando alta sensibilidade e seletividade (Hansen, 2011; Melo, 2008).

Quanto ao suporte, para garantir as biorespostas das enzimas nos biossensores, faz-se necessário a utilização de técnicas de imobilização com o

objetivo de reutilizar, estabilizar e reduzir a inativação por distorções da sua estrutura nativa por influência da temperatura, pH e de solventes orgânicos (Fernandes, 2012; Mendes et al., 2011; Sujoy; Aparna, 2013). Os métodos para imobilização do elemento de reconhecimento biológico são: oclusão (matriz, encapsulamento ou micro encapsulamento); ligações químicas (ligações covalentes simples e ligação covalente cruzadas (crosslinking) (Oliveira et al., 2013a). O acetato de celulose e quitosana são polímeros originados dos polímeros naturais celulose e quitina, respectivamente, que se destacam em aplicações de biossensores como matrizes de fixação do elemento de reconhecimento biológico (Mendes et al., 2011; Vieira, 2011).

A aplicação dos biossensores está relacionada a detecção rápida e precisa dos analitos, ou seja, substâncias de interesse ou que venham a ser devido as concentrações presentes, nos diversos setores tais como: saúde; veterinária; agricultura; industrial e no controle de poluentes. A ureia é uma substância largamente distribuída na natureza sendo monitorada para várias aplicações principalmente sobre a saúde humana, animal, agricultura e outras (Oliveira et al., 2013b).

A função metabólica renal é determinada pela quantidade de ureia no sangue e na urina, que ocasiona sérios riscos à saúde. A ureia mesmo não tendo a boa especificidade para diagnosticar mudanças da função renal, é mais sensível a alterações primárias das condições renais, sendo, por isso um importante indicador em casos que a envolvam. O aumento da taxa de ureia no sangue ocorre em casos de insuficiência renal aguda ou crônica, insuficiência cardíaca congestiva, desidratação acentuada, catabolismo proteico aumentado, perda muscular, alguns medicamentos também podem causar aumentos da ureia (Abensur, 2011; Soares, 2011; Barbosa, 2008). Embora se encontrem disponíveis métodos espectrofotométricos e colorimétricos para a determinação da concentração de ureia, os métodos enzimáticos são mais seletivos, fator que leva a que estes sejam geralmente preferidos (Bernardi, 2011; Catoni, 2011).

Diante deste pressuposto, esse projeto propõe o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico enzimático em fita metálica com imobilização da enzima urease em membranas poliméricas naturais: acetato de quitosana e acetato de celulose para detecção de ureia e caracterização do processo de eletrodeposição na preparação dos eletrodos e da membrana polimérica para imobilização da enzima.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3. Biossensores

Os biossensores são dispositivos capazes de identificar substâncias específicas, qualitativamente e/ou quantitativamente vêm sendo aprimorados ao longo dos anos tanto em melhorias nos dispositivos já existentes quanto no desenvolvimento de novos. Isso origina-se de suas características vantajosas frente aos métodos laboratoriais convencionais, ou seja: menor tempo de análise (minutos a horas), possibilidade de miniaturização e aplicação *on-line* e no campo de medição, portabilidade, menor custo operacional, de projeto e ao consumidor final (Calil; Roberto, 2011; Moreira et al., 2010; Furtado et al., 2008).

A pesquisa em Biossensores é multidisciplinar, sendo portando fundamental para o desenvolvimento de uma determinada aplicação, profissionais de diferentes áreas tais como: engenharias (elétrica, química, ciências dos materiais etc.), química, física, biologia, medicina entre outras. As pesquisas em biossensores são relativamente recentes de grandes prospecções, especialmente como tentativa de substituição na análise e monitoramento de analitos em aplicações que são questões de saúde pública, como é o caso da detecção rápida de vírus, bactérias, câncer, armas químicas e biológicas, água, solo e alimentos (Calil; Roberto, 2011; Moreira et al., 2010; Uygun; Sezgintürk, 2011; Lee et al., 2008).

Historicamente os biossensores tiveram seu início em meados de 1962, quando foi desenvolvido o primeiro biossensor, que ficou conhecido como “*eletrodo enzimático*”, devido as tiras enzimáticas presentes no eletrodo, que servem como materiais biocatalíticos. Este pequeno dispositivo foi utilizado com a finalidade de detectar a taxa de glicose e monitorá-la, significando o controle do diabetes, no sangue. Após esse acontecimento, os biossensores exibem um vasto marco histórico como apresentado na Figura 1 (Amarante et al., 2014; Feng et al., 2012; Ilidio, 2011; Santos, 2012).

• 1912	✓	Início das pesquisas.
• 1962	✓	Primeira descrição de um biossensor: eletrodo enzimático amperométrico para glicose.
• 1969	✓	Primeiro biossensor potenciométrico: Urease imobilizada num eletrodo de amônia que permite detectar ureia.
• 1970	✓	Invenção do transistor de campo-efeito sensível a Íons. (Ion-Selective Field-Effect Transistor (ISFET)).
• 1972/5	✓	Primeiro biossensor comercial: Biossensor de glicose produzido por Yellow Springs Instruments).
• 1975	✓	Primeiro biossensor baseado em micróbios. Primeiro imunossensor: ovalbumina num fio de platina.
• 1980	✓	Primeiro sensor óptico de pH para gases no sangue.
• 1982	✓	Primeiro biossensor baseado em fibras ópticas.
• 1983	✓	Primeiro imunossensor de ressonância de superfície de plasma.
• 1984	✓	Primeiro biossensor amperométrico.
• 1987	✓	Lançamento do biossensor de glicose no sangue MediSense ExacTech™.
• 1990	✓	Lançamento de um biossensor baseado em SPR Pharmacia BIACore.
• 1992	✓	Lançamento de um analisador de sangue do tamanho de uma mão pela i-STAT.
• 2000	✓	Introdução de dispositivo de monitorização de glicose não-invasivo pela Cygnus Inc. (GlucoWatch).
• 2006/2008	✓	FDA aprova 4 modelos que proporcionam monitorização contínuo de glicose.
• 2012	✓	Biochip mede nível de glicose na saliva.
• 2014	✓	Biossensor para Detecção câncera.

Figura 1 - Representação do marco histórico dos biossensores (Fonte: Própria)

O mercado dos biossensores é categorizado como um mercado em ascensão, com um número crescente de aplicações à medida que cada novo biossensor é desenvolvido. A Figura 2 apresenta os percentuais de receita do mercado de biossensores para as áreas da indústrias de processo, meio ambiente, biodefesa, diagnóstico, laboratórios de pesquisas e point of care nos anos de 2006 a 2009, e as previsões até 2016, mostrando que as aplicações de biossensores em exames e diagnósticos médicos (point of care) é o maior mercado e provavelmente dominarão no futuro, visto que, o desenvolvimento de novos tipos de biossensores para testes de diagnóstico devem contribuir para essas tendências (Gaspar, 2010).

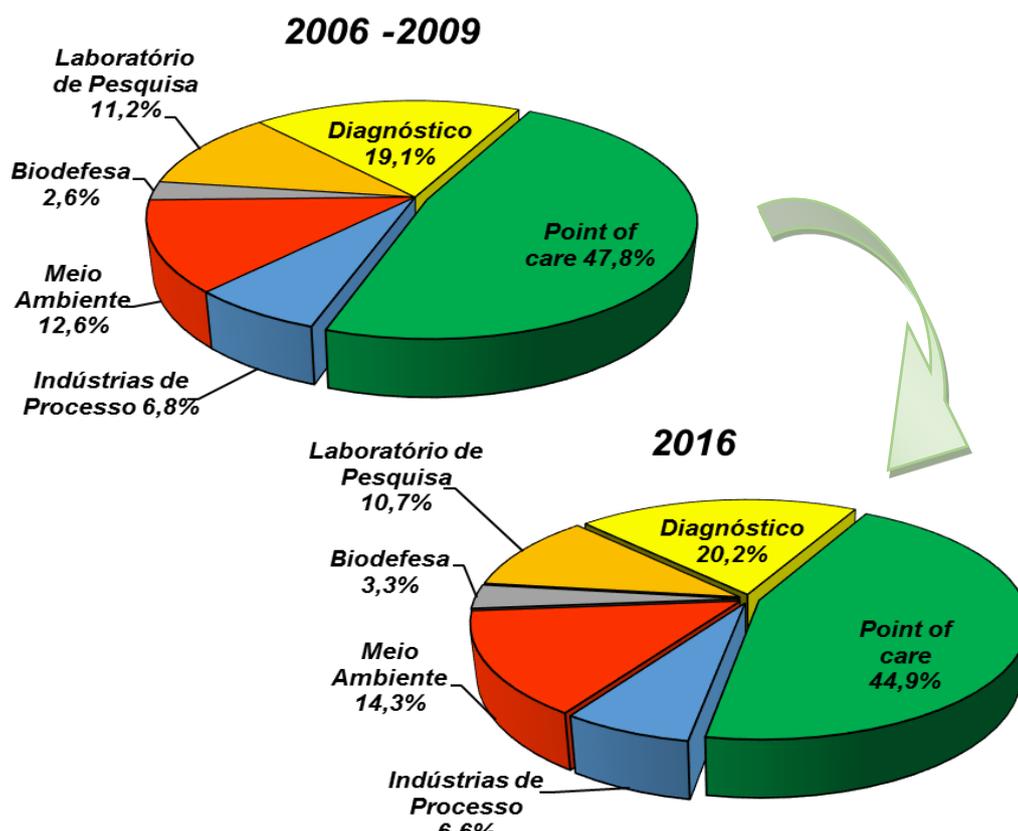


Figura 2 - Mercado total de Biossensores: Percentual de Receitas no Mundo (Gaspar, 2010).

Os biossensores são definidos como “um dispositivo analítico capaz de converter a concentração de um analito (sinal biológico) em outro sinal proporcional a concentração do analito, através da integração de um elemento biológico sensor com um transdutor” (Xia; Wei; Wan, 2010). Os biossensores são constituídos por: analito,

bioreceptor; transdutor e o detector/processador, sendo os componentes fundamentais o bioreceptor e o transdutor (Figura 3).

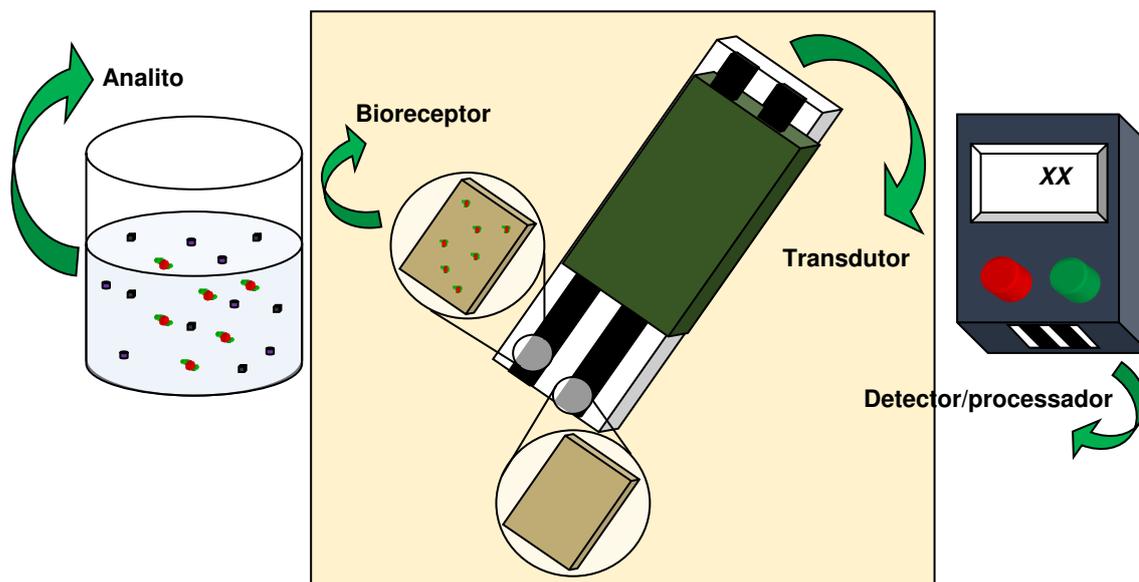


Figura 3 - Componentes fundamentais de um biossensor (Fonte: Própria).

Estes dispositivos podem ser classificados de acordo com o bioreceptor ou transdutor utilizado no seu desenvolvimento como ilustra a Figura 4.



Figura 4 - Classificação dos biossensores (Moreira et al., 2010; Melo, 2008; Singh et al., 2008; Malhotra; Turner, 2003;).

Baseados nas mudanças das propriedades ópticas das substâncias que podem ser absorção, índice de refração, fluorescência, fosforescência, refletividade, ressonância plasmônica de superfície (SPR), comprimento de onda, interferometria, elipsometria entre outras são desenvolvidos os biossensores ópticos. As variações da propriedade ópticas se dão pela reação bioquímica produzida entre a substância biológica seletiva e o analito. Esse tipo de biossensor apresenta vantagens como o seu tamanho reduzido, velocidade de resposta, boa biocompatibilidade e a não necessidade de elementos ativos na biocamada (Barbosa, 2008; L. M. D. C. Silva, 2011).

Nos biossensores calorimétricos o princípio de funcionamento baseia-se na medida do calor envolvido na reação química pela interação da substância biológica e o analito. As variações das temperaturas envolvidas nessas reações são determinadas por termistores de alta sensibilidade, entretanto em sistemas com troca de calor muito baixas não são utilizados por apresentam dificuldades de medições (Barbosa, 2008; Moreira et al., 2010).

Os biossensores piezelétricos ou acústicos são baseados nas propriedades piezelétricas dos transdutores, cristais anisotrópicos, que quando submetidos a um stress mecânico geram um dipolo elétrico. O stress mecânico nesse caso é produzido pelo aumento de massa no cristal piezelétrico pela adsorção do analito, microviscosidade, onda de cisalhamento e superfície acústica. Os biossensores piezelétricos são formados pelo revestimento superficial dos cristais anisotrópicos com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente ao analito. Os cristais de quartzo têm sido muito utilizados no desenvolvimento desse tipo de biossensor, pois sua frequência pode oscilar na faixa de megahertz ( $10^6$  ciclos/s) de maneira proporcional a massa do cristal, além de serem seletivos às variações de massa (Barbosa, 2008; Calil & Roberto, 2011; J. J. de B. Silva, 2004).

Imunossensores são biossensores que se baseiam na formação de um complexo antígeno/anticorpo, nas quais o antígeno ou o anticorpo são imobilizados em uma superfície. Empregam duas técnicas sensíveis e específicas na detecção do analito, técnicas eletroquímicas e imunológicas. São altamente seletivos, estáveis e sensíveis (Furtado et al., 2008; Moreira et al., 2010; Oliveira, 2011).

Sensores celulares são biossensores que empregam células inteiras como elemento de reconhecimento biológico, essas células são imobilizadas na superfície

do sensor. Dentre os elementos de reconhecimento biológico utilizados encontram-se as bactérias, algas e as leveduras (Moreira et al., 2010; Porfírio, 2014).

Sensores de tecido são biossensores que utilizam os tecidos animais, fúngicos ou vegetais como elemento bioreceptor e os sensores microbiológicos utilizam as funções metabólicas dos organismos vivos tais como bactérias, leveduras e fungos para medir poluentes (Porfírio, 2014; L. M. D. C. Silva, 2011).

Existe ainda uma classificação dos biossensores em relação ao sistema de reconhecimento biológico, ou seja, quanto ao processo químico entre bioreceptor e o analito esses podem ser classificados em duas categorias: biocatalíticos e bioatividade (Oliveira, Consolin-Filho, et al., 2013; Porfírio, 2014; Vieira, 2011).

Os biocatalíticos se baseiam nas reações catalisadas pela substância biológica ativa, que está imobilizado na superfície do sensor. Essa substância biológica provoca a reação de catálise quando entra em contato com o analito, produzindo um ou mais produtos. Comumente nesse sistema de reconhecimento biológico são utilizados três tipos de biocatalizadores: as enzimas, as células e os tecidos (Furtado et al., 2008; Vieira, 2011).

Já os de bioatividade têm, como princípio, a interação por ligação química da substância biológica que está imobilizada no sensor e o analito formando um complexo termodinamicamente estável. Nesses tipo de sistema de reconhecimento biológico são utilizados os antígenos, os anticorpos, ligação proteica ou receptor proteico e DNA ou oligonucleotídeos (Porfírio, 2014; P. Rubens et al., 2008).

O fluxograma da Figura 5 mostra um esquema com os biossensores mais utilizados baseados no tipo de transdutor e bioreceptor, indicando também que tipo de grandeza é detectada.

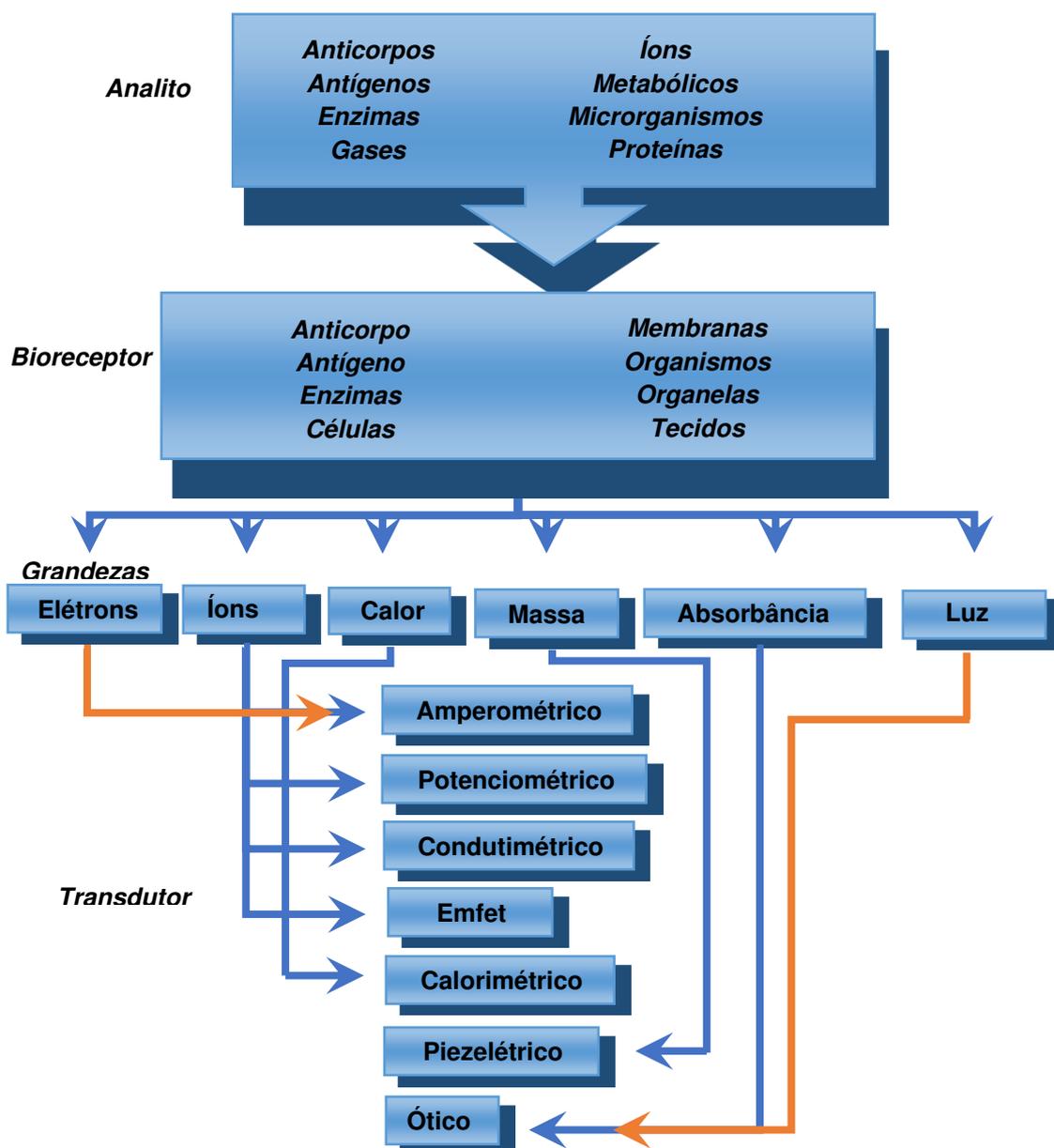


Figura 5 - Fluxograma dos tipos de biossensores mais usados em função do bioreceptor e transdutor (Fonte: Própria).

Dentre essas classificações, os primeiros biossensores cientificamente propostos, bem como comercializados com sucesso, foram aqueles baseados em sensores eletroquímicos e enzimáticos para análise múltipla, constata-se que mais de cinquenta por cento dos biossensores relatados na literatura são eletroquímicos (Amarante et al., 2014; L. M. D. C. Silva, 2011).

### 3.1 Biossensores eletroquímicos

Fundamentados no princípio da eletroquímica, através de estudo de sistemas capazes de conferir potencial elétrico a partir de reações de oxirredução (célula galvânica) ou sistemas nos quais ocorrem processos de oxirredução ao receberem trabalho útil elétrico (eletrolise), ou seja, na análise da inter-relação dos fenômenos químicos e elétricos são desenvolvidos os biossensores eletroquímicos (Ticianelli & Gonzalez, 2005). Esses são caracterizados por: serem simples, sensíveis com limites de detecção exponencialmente baixos, confiáveis, apresentarem respostas rápidas; baixo custo, operarem em condições em que não necessita pré-tratamento das amostras e permitirem efetuar determinações em amplas faixas de concentração (Thévenot, Toth, Durst, & Wilson, 2001).

Dependendo do princípio de medição, os biossensores eletroquímicos podem ser subdivididos em: amperométrico, potenciométrico, impedanciométrico e condutimétrico (Alhadeff, 2011; Soares, 2011).

Os amperométricos se baseiam em reações de oxidação e redução, que envolve determinado analito para medição de suas concentrações, essas reações geram um fluxo de corrente entre os eletrodos, essa corrente é gerada sobre um potencial constante (Andrade, 2006; Vieira, 2011).

Por sua vez os condutimétricos se baseiam na medição da condutância da solução contendo o analito gerada por reações catalíticas, que produzem ou consomem espécies químicas que alteram a condutividade global da solução (Melo, 2008).

Já os potenciométricos, em geral, são formados por dois eletrodos, um de referência e outro seletivo (sensor), que se baseiam na produção de um potencial significativo no eletrodo de íons seletivos, devido ao acúmulo de carga na superfície do eletrólito. Nesse contexto, o bioreceptor consome ou produz espécies químicas fortemente polares ou íons, em decorrência da reação química (catálise), e essas espécies químicas são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (Arya, Datta, & Malhotra, 2008; Pohanka & Republic, 2008; Thévenot et al., 2001).

E os impedanciométricos, baseiam se na variação da impedância, ou seja, medi a capacidade de um circuito de resistir ao fluxo de uma determinada corrente

elétrica quando se aplica uma certa tensão elétrica, produzida entre os eletrodos de referência e o sensor (Soares, 2011).

O avanço de um biossensor baseado na eletroquímica requer muita consideração no modo do processo de reconhecimento, na tecnologia de fabricação e os materiais escolhidos para os elementos sensores devem primeiro ser avaliados com cuidado antes de qualquer desenvolvimento. A detecção eletroquímica é uma parte crítica de investigação dos biossensores eletroquímicos e desempenha um papel importante no desenvolvimento do biossensor (Liu, 2012).

### 3.2 Biossensores Enzimáticos

São dispositivos que utilizam como elemento de reconhecimento biológico as enzimas, que são catalizadores biológicos altamente específicos e seletivos (Melo, 2008). Foram aperfeiçoados baseado nesse princípio de funcionamento três gerações de biossensores.

A primeira geração ocorreu pela obtenção dos sinais amperométricos, produzidos pela oxidação ou redução de um reagente ou produto da reação do substrato e a enzima sobre a superfície do eletrodo. A Figura 6 ilustra um esquema de funcionamento de um biossensor de 1ª geração, um exemplo dessa geração é biossensor para glicose que contém a enzima glicose oxidase imobilizada numa membrana de um eletrodo para  $O_2$  (Eletrodo de Clark), onde é possível monitorar a concentração de oxigênio ou a produção de peróxido de hidrogênio (Galli, 2009; Janegitz, 2012).

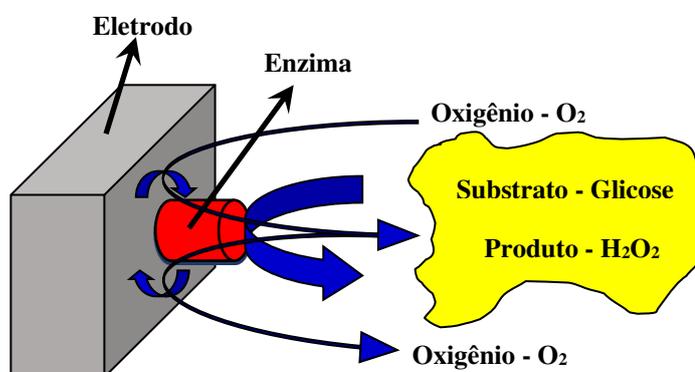


Figura 6 - Esquema de funcionamento de um biossensor de 1ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012).

A segunda geração se baseiam na utilização de mediadores de elétrons que atuam na transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo. Os mediadores de elétrons auxiliam na eletroatividade, que tem a finalidade de diminuir o potencial de trabalho aplicado (potencial de detecção) dos biossensores eletroquímicos enzimáticos. Os mediadores podem estar livres em solução ou imobilizados junto com a enzima. A Figura 7 ilustra um esquema de funcionamento de um biossensor de 2ª geração. Um exemplo é o biossensor para glicose contendo  $\beta$ -ciclodextrina/tetratiofulvaleno e a enzima glicose oxidase, que com o aumento da concentração de glicose, há um aumento da corrente de pico de oxidação do mediador fazendo com que seja possível quantificar o analito de interesse (Bernardi, 2011; Janegitz, 2012).

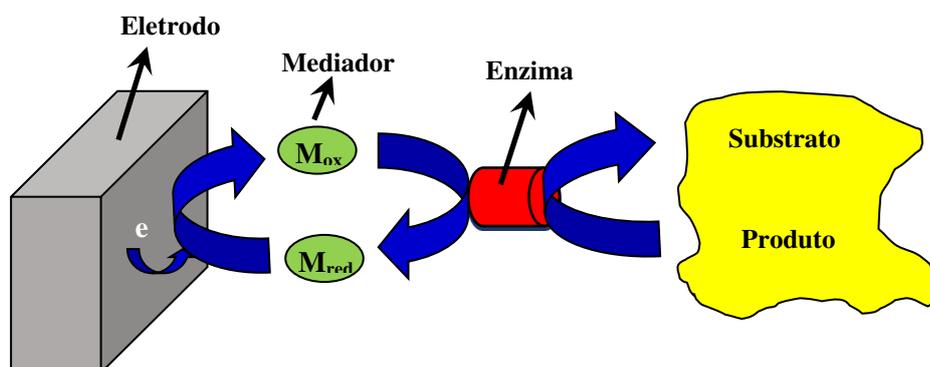


Figura 7 - Esquema de funcionamento de um biossensor de 2ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012).

E a terceira geração dos biossensores se caracteriza pela transferência direta de elétrons entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima, sem a utilização de mediadores de elétrons e sob baixos potenciais. Nesta geração do biossensor a transferência dos elétrons está associada, ou ocorre durante a transformação catalítica do substrato para o produto (Bernardi, 2011; Galli, 2009; Soares, 2011). O esquema de funcionamento dos biossensores da 3ª geração é ilustrado na Figura 8.

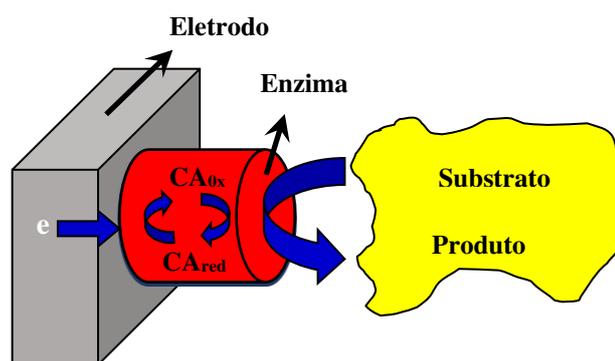


Figura 8 - Esquema de funcionamento dos biossensores da 3ª geração (Adaptado de: (J. C. de C. Santos, 2012)).

### 3.3 Componentes dos biossensores

#### 3.3.1 Transdutores

O transdutor é um dispositivo que converte um tipo de energia em outro, ou seja, ele converte uma magnitude física (temperatura, pressão, luminescência, força, posição entre outras) em um sinal elétrico normalizado. A Figura 9 ilustra um esquema de funcionamento dos transdutores.

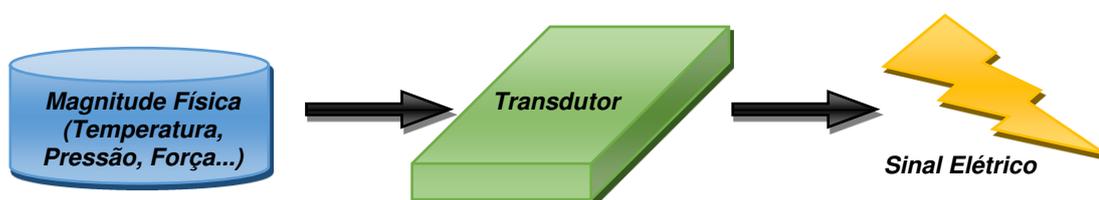


Figura 9 - Esquema de funcionamento dos transdutores (transdutores ativos e simples).

Esses dispositivos são classificados em quatro tipos de acordo com o princípio de funcionamento, que são: ativos, passivos, simples e compostos.

Transdutores ativos geram um sinal elétrico em resposta a um estímulo e não precisam receber energia externa para produzir um sinal de saída (Figura 9).

Transdutores passivos precisam ser excitados por uma fonte externa de energia para produzir um sinal de saída. A Figura 10 ilustra o esquema de funcionamento desse tipo de transdutor.

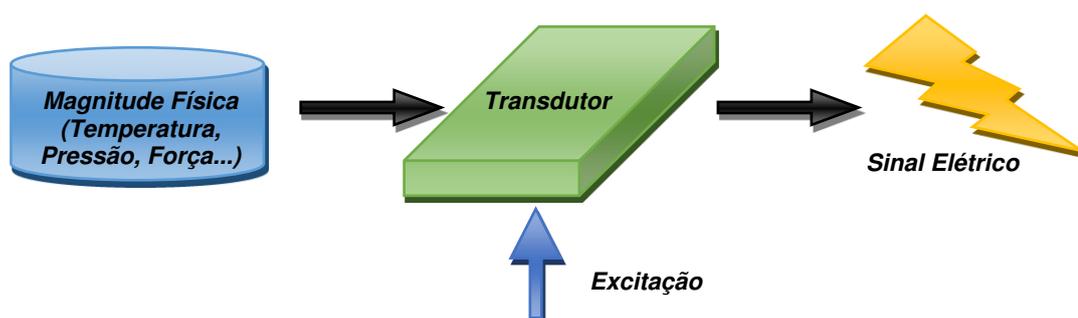


Figura 10 – Esquema de funcionamento dos transdutores passivos.

Transdutores simples são dispositivos em que a transdução é feita em apenas um estágio, como ilustrado na Figura 9. Os sensores de posição que produzem uma variação de tensão elétrica na presença de um material magnético é um caso desse tipo de transdução.

Transdutores compostos são dispositivos em que a transdução é feita em vários estágios entre o sinal de entrada e o de saída da magnitude física, que, por sua vez, é transformada em grandezas intermediárias durante o processo, conforme ilustra a Figura 11.

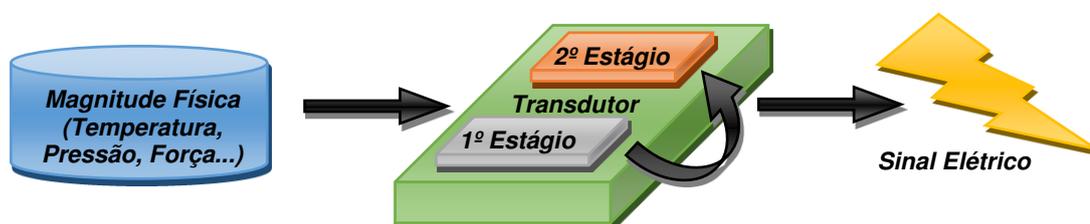


Figura 11 - Esquema de funcionamento dos transdutores compostos.

Os transdutores, são classificados pelo princípio de energia envolvida na transdução, sendo quatro classes: eletroquímicos (eletrólise de espécies que sofrem oxidação-redução), óticos (medida da luminescência ou fluorescência), piezelétricos (alteração de massa e/ou micro viscosidade) e térmicos (absorção ou emissão de radiação eletromagnética) (Atta, Galal, & Ali, 2011; Chaubey & Malhotra, 2002; Skládál, Pohanka, Kupská, & Šafá, 2010).

Os transdutores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para os biossensores, isso baseado no fato de que durante o processo de biointeração, as espécies eletroquímicas (elétrons) são consumidas ou geradas, produzindo assim um sinal eletroquímico (De Souza, Machado, & Avaca, 2003).

Nos biossensores, o transdutor é o componente que recebe as perturbações produzidas pela interação do bioreceptor com o analito e as converte em um sinal que possa ser visualizado e amplificado (Atta et al., 2011; Skládal et al., 2010).

### 3.3.2 Materiais e Designer dos Transdutores

Os materiais utilizados para produção desses diferentes transdutores dependem do tipo de energia envolvida na transdução e das propriedades intrínsecas dos materiais podendo ser: metálicos (ouro, platina, níquel, cobre, antimônio, ligas etc.), poliméricos (polianilina – PANI, polipirrol, politiofeno etc.), cerâmicos (titanato de bário, titanato zirconato de chumbo, óxido de zinco etc.) (Ansari *et al.* 2010; Okafor *et al.* 2008; J. J. B. Silva 2004; Soares 2011).

Os materiais metálicos são condutores caracterizados por diversas grandezas, dentre as quais se destacam: condutividade ou resistividade elétrica, coeficiente de temperatura, condutividade térmica, potencial de contato, comportamento mecânico, etc. Estas grandezas são importantes na escolha adequada dos materiais, uma vez que essas definem se estes são capazes de desempenhar as funções que lhe são atribuídas (Rolim, 2015).

Dentre os diversos materiais metálicos o antimônio é um semimetal, que apresenta quatro formas alotrópicas, nas colorações cinza, cinza azulado, amarela e negra, sendo sua forma mais estável a cinza azulada. Aproximadamente 60% do antimônio é aplicado em retardadores de chama, 20% em ligas para baterias, mancais e soldas e os demais 20% em semicondutores, estabilizantes, catalizadores e em medicamentos. (Medeiros, 2015). Esse metal tem apresentado recentemente estudos mostrando sua aplicação como transdutor nos biossensores, algumas das propriedades apresentadas para sua utilização foram: relação quase linear entre força eletromotriz (f.e.m) em pH na faixa de 2 a 12; leituras reprodutíveis e estáveis; fácil de fabricação e baixo custo (Chan, 2012).

Os íons de antimônio formam-se em diferentes estados de oxidação, sendo os mais comuns o 3+ e o 5+, dos quais, o mais estável é o 3+. Os compostos de antimônio tiveram uma crescente importância na indústria de semicondutores para construção de diodos, detectores de infravermelhos e dispositivos de efeito Hall (H. W. L. dos Santos, 2008).

Já o aço inoxidável é uma liga de ferro e cromo, podendo conter também níquel, molibdênio e outros elementos, que apresenta propriedades físico-químicas superiores aos aços comuns, sendo a alta resistência à oxidação atmosférica a sua principal característica (Teroerde, 2007). O aço inoxidável é um biomaterial empregado na ortopedia, desde a década de 80, pelo fato deste possuir propriedades mecânicas, resistência a corrosão e biocompatibilidade superiores, quando comparados aos materiais convencionais (Sousa, 2006).

Um fator importante na preparação dos transdutores é o design que deve ser altamente específico para o analito de interesse e responder em uma faixa de concentração apropriada, ter um tempo de resposta baixo, apresentar a possibilidade de miniaturização e compensar efeitos externos (como temperatura e humidade) com o propósito de ser utilizado em aplicações práticas (ANDRADE, 2006).

Outro fator relevante no desenvolvimento do transdutor é a miniaturização para que possam ser empregados em situações específicas. Para o desenvolvimento do transdutor metálico com o design específico e redução do tamanho utiliza-se a técnica de eletrodeposição de filmes finos de antimônio sobre uma superfície de fitas aço inox. A técnica de eletrodeposição para obtenção de filmes finos, tem sua origem datada em 1805, e veio desenvolvendo-se ao longo dos anos, sendo empregada em aplicações diversas, desde simples revestimentos em objetos metálicos de uso comum, tais como talheres e ferramentas, até a fabricação de dispositivos avançados como as interconexões em circuitos integrados de alta escala de integração (Araújo, 2005).

### **3.3.3 Eletrodeposições**

A técnica de eletrodeposição consiste no crescimento de um determinado material em um substrato sólido, o eletrodo, que está imerso num banho contendo os íons do material a ser depositado, o eletrólito. As camadas crescem devido as reações eletroquímicas, ou seja, reações químicas produzidas pela corrente elétrica. Essas reações ocorrerão na interface do eletrodo com o eletrólito e sempre terão envolvidas a transferência de cargas entre os dois meios (Araújo, 2005).

O mecanismo de eletrodeposição pode ser dividido em uma sequência de etapas que explicam como se forma o depósito nesse processo. A presença de íons do material a ser depositado na superfície do eletrodo se deve a um transporte dos

íons disponíveis do eletrólito naquela região. Este transporte é denominado de transporte de massa, e pode ocorrer por três formas (Lisboa & Barin, 2009; Stenger, 2008).

1. Difusão: é o movimento de íons proveniente a um gradiente de concentração na solução, estabelecido pelo consumo de íons do eletrólito, próximo à superfície do eletrodo (Lisboa & Barin, 2009).

2. Migração: é o movimento dos íons do eletrólito promovido por um gradiente de potencial elétrico. A corrente elétrica que provoca reações eletroquímicas também circula pelo eletrólito, fechando o circuito (Araújo, 2005).

3. Convecção: é o deslocamento das espécies acompanhando o movimento de massa na solução. A solução pode circular devido a flutuações na temperatura e ou agitação mecânica entre outras (Araújo, 2005; Stenger, 2008).

O processo de eletrodeposição dos íons presentes no material a ser depositado sobre a superfície do eletrodo pode ser descrito em uma sequência de passos:

1. Transporte de íons da solução para a superfície do eletrodo;
2. Transferência de elétrons na superfície do eletrodo-eletrólito;
3. Formação dos adátomos;
4. Difusão dos adátomos na superfície dos eletrodos;
5. Aglomeração dos adátomos e formação de núcleos;
6. Incorporação dos adátomos no núcleo formado;
7. Evolução das características morfológicas do depósito.

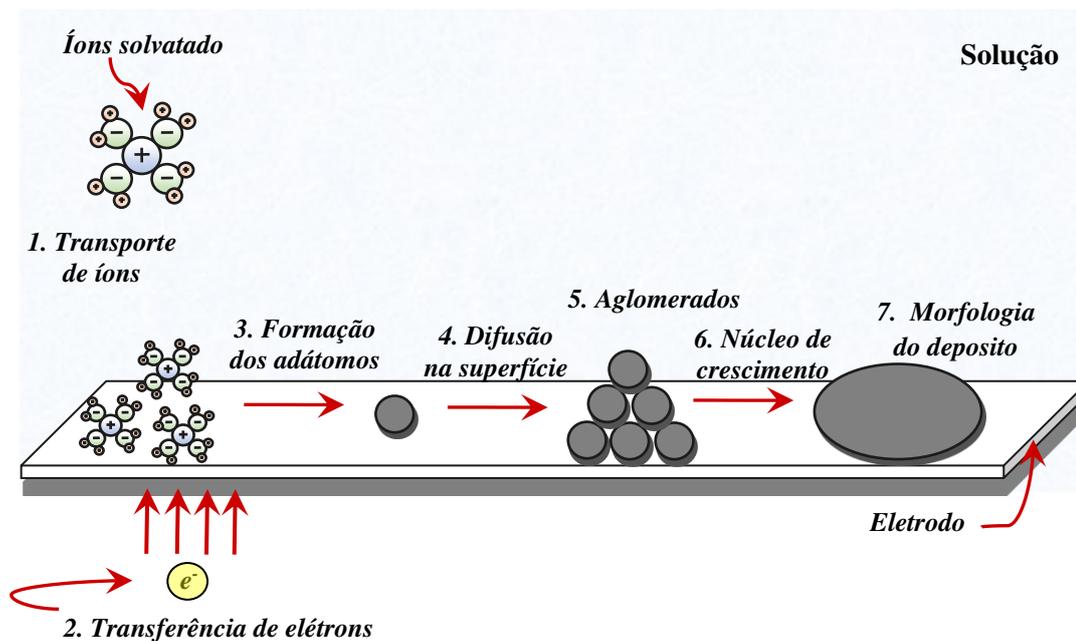


Figura 12 - Esquema do processo de eletrodeposição (Adaptado de: (Stenger, 2008)).

O processo inicia-se quando íons solvatados na solução chegam até a superfície do eletrodo e recebem o elétron gerado pelo efeito da corrente elétrica. Nesse momento ocorre a formação dos adátomos, ou seja, de elementos com características de átomo que se encontram adsorvidos na superfície, mas que ainda não foram incorporados ao material do eletrodo sólido. A difusão dos adátomos pela superfície vai culminar num aglomerado, ou, núcleo de crescimento que servirão de sítios para ancoragem dos próximos adátomos e a conseqüente formação da camada sólida, fenômeno é visualizado na Figura 12 (Stenger, 2008).

### 3.4 Componente Biológico dos Biossensores

#### 3.4.1 Bioreceptor

No desenvolvimento dos biossensores a escolha do componente biológico é a primeira etapa a ser realizada, pois esse transforma as informações de domínio bioquímico, gerando sinais físicos ou químicos com sensibilidade definida. Sendo o seu principal propósito permitir ao sensor um elevado grau de sensibilidade para poder determinar espécies de interesse analítico (Galli, 2009). Existem vários componentes biológicos com potencial a serem utilizados em sistemas de biossensores, tais como:

enzimas, anticorpos, receptores, ácidos nucleicos, células, bactérias (Calil & Roberto, 2011; Galli, 2009; Soares, 2011).

As enzimas são em sua maioria proteínas com elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas presentes em todos os seres vivos. Constituídas por longas cadeias poliméricas formadas por aminoácidos, apresentando uma estrutura tridimensional complexa com um centro ativo, local onde se processam as reações com determinados substratos (Andrade, 2006; J. C. de C. Santos, 2012).

Os anticorpos ou imunoglobulinas são moléculas complexas, constituídas por centenas de aminoácidos (unidades de construção das proteínas), também denominada glicoproteínas. Sintetizados e excretados por células plasmáticas, estão presentes no plasma, tecido e secreções, onde atacam proteínas estranhas ao corpo, chamadas de antígenos, realizando assim a defesa do organismo. Os anticorpos apresentam duas cadeias idênticas ligadas por dissulfeto (Janegitz, 2012; Parreira, 2010).

O uso dos anticorpos como elemento de reconhecimento biológico nos biossensores deve-se à alta sensibilidade e especificidade das interações do antígeno com o anticorpo (Calil & Roberto, 2011)

Os receptores são proteínas ou glicoproteínas presentes na membrana plasmática, na membrana das organelas ou no citosol celular, que se caracterizam especificamente por se unirem a substâncias químicas, chamadas de ligantes. Podendo ser o receptor: nuclear, esteroide ou transmembrana (Wood & Gierach, 2011).

Os ácidos nucleicos são macromoléculas formadas por nucleotídeos. Estes apresentam alta afinidade e especificidade a determinadas moléculas. São utilizadas em biossensores para detecção de diversos ligantes, desde pequenos íons ou moléculas até proteínas e células (Calil & Roberto, 2011; J. J. de B. Silva, 2004)

### **3.4.2 Enzima Urease**

A urease é uma enzima dependente de níquel, amplamente distribuído na natureza, cuja função catalítica é a hidrólise de ureia produzindo duas moléculas de amônia e uma de ácido carbônico (Figura 13). São sintetizadas por numerosos organismos, incluindo plantas, bactérias, algas, invertebrados e fungos, e também

podem ocorrer em solos como uma enzima do solo (Krajewska, 2009; Laprotox, 2011b).

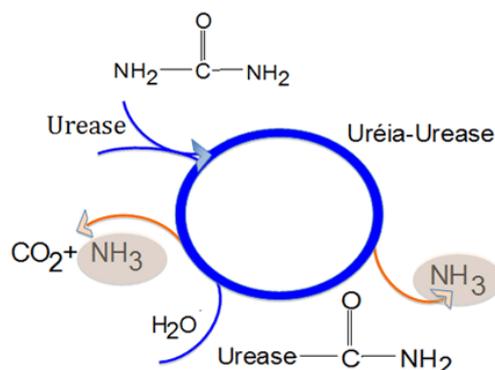


Figura 13 - Reação de hidrólise da ureia catalisada pela urease (Laprotox, 2011a).

Independentemente de sua origem e de sua organização estrutural, as ureases são proteínas homólogas compartilhando de 50 a 60% de identidade de sequência, sugerindo divergência a partir de uma enzima ancestral comum (Laprotox, 2011b).

A enzima urease (Figura 14), determinada por cristalografia de raios X, contém dois íons de níquel ligados por uma lisina carbamilada e um íon de hidróxido. Cada níquel coordena dois resíduos de histidina e uma molécula de água. A esfera de coordenação de um centro de níquel, Ni (2), é completado por um aspartato terminalmente resultando em um ambiente pseudo-octaédrico; enquanto que outro íon de níquel, Ni (1), possui uma geometria piramidal quadrada distorcida (Benini, Rypniewski, Wilson, Ciurli, & Mangani, 2001; Lee et al., 2008).

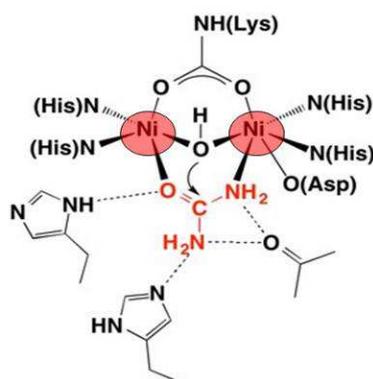


Figura 14 - Representação do esquema de sítios ativos da urease (Andrea Graydon, Alexander Berchansky, Michal Harel, 2015).

As enzimas são componentes de extrema importância para a fabricação de biossensores como elementos de reconhecimento biológico pela alta sensibilidade e seletividade que as reações enzimáticas apresentam (Nelson & Cox, 2002).

### 3.4.3 Imobilização do Componente Biológico

A imobilização de biomoléculas no transdutor, na sua forma estável e com a manutenção de suas propriedades físico-químicas de reconhecimento é uma das etapas na construção de um biossensor (Oliveira, 2011). A imobilização de enzimas em suportes sólidos é uma ferramenta importante para a estabilização da enzima, permite a reutilização e reduz a inativação por influência da temperatura e solventes, o que pode ser atrativo para o setor industrial (Mendes et al., 2011).

Baseado na imobilização enzimática foi possível resolver diversas limitações tais como: a perda de enzima (por vezes dispendiosa), manutenção da estabilidade da enzima, aumento do tempo de meia vida do biossensor e adicionalmente a redução do tempo de resposta (Amine, Mohammadi, Bourais, & Palleschi, 2006).

Os principais métodos utilizados na imobilização enzimática são: (a) oclusão em gel; (b) encapsulamento; (c) adsorção física; (d) ligação covalente e (e) ligação covalente cruzada (Dalla-Vecchia, Nascimento, & Soldi, 2004). A Figura 15 ilustra os métodos de imobilização enzimática.

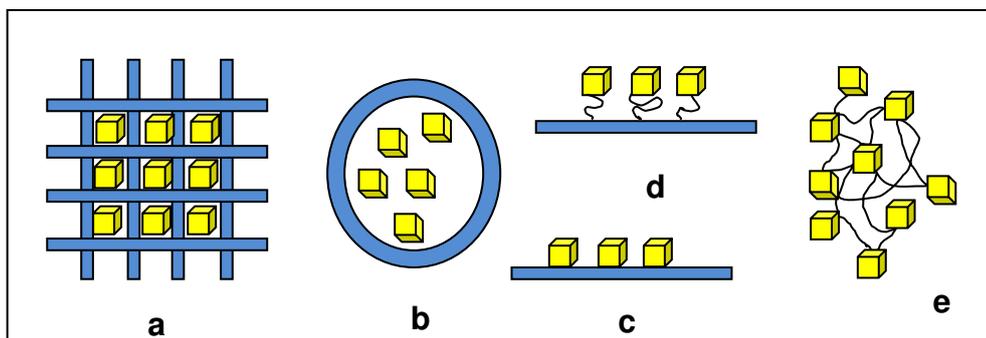


Figura 15 - Métodos de imobilização enzimática (Dalla-Vecchia et al., 2004).

A adsorção física neste caso o componente biológico é fixado em uma matriz de interesse por meio de interações físicas, sendo o mais simples método de imobilização (Caridade, 2008; Janegitz, 2012).

A oclusão em gel é um método de imobilização baseado no confinamento do componente biológico dentro de espaços intersticiais de um gel, que permite a difusão do substrato e do produto produzidos pelas reações químicas (Janegitz, 2012; Marques & Yamanaka, 2008).

O encapsulamento baseia-se no aprisionamento do componente biológico em uma membrana localizada na superfície do eletrodo, apresentando uma determinada porosidade que permita a difusão do substrato e dos produtos produzidos durante as reações. Comumente membranas de nylon, quitosana, acetato de celulose entre outras, são utilizadas (Janegitz, 2012; Moreira et al., 2010).

A ligação covalente é um processo de imobilização que ocorre por meio de ligações entre determinados grupos funcionais do componente biológico e a superfície do material suporte presente no transdutor (Janegitz, 2012; Mendes et al., 2011).

A ligação covalente cruzada é o método de imobilização que se baseia na formação de uma rede tridimensional de ligações covalentes, formada entre o agente de reticulação e o componente biológico (Janegitz, 2012; Oliveria & Vieira, 2006).

O desempenho do biossensor depende de dois fatores (i) a quantidade de enzima imobilizada, está relacionada com a área de superfície/volume da matriz, e (ii) a porosidade da matriz que proporciona a rápida difusão da solução para a enzima imobilizada (Mozaffari, Rahmanian, Abedi, & Amoli, 2014).

A imobilização pode ser aplicada a qualquer biocomposto, porém podem ocorrer problemas relacionados à lixiviação dos elementos biológicos de reconhecimento para a solução devido aos diferentes tamanhos dos poros dos polímeros ou membranas, além de impedimentos estéricos para o substrato interagir com a biomolécula quando os poros das matrizes são menores que as moléculas (Lojou & Bianco, 2006; Marques & Yamanaka, 2008).

### **3.5 Polímeros Naturais**

Os polímeros naturais são derivados de plantas e animais. Essa classe de polímeros compreende: borracha, algodão, lã, couro; seda; proteínas, enzimas, amido e a celulose (Júnior, 2008). O uso dos polímeros como matriz no desenvolvimento dos biossensores tem crescido significativamente devido as suas propriedades físico-químicas, biológicas, sua disponibilidade, diversidade, facilidade de síntese,

possibilidade de incorporação de diferentes espécies dopantes e a imobilização de biomoléculas. Entre as funções dos polímeros em biossensores estão o seu uso como intermediários nos processos de interação receptor/analito e na transdução do sinal para melhorar o tempo de resposta, a sensibilidade e o limite de detecção (Oliveira, Consolin-Filho, et al., 2013).

As matrizes poliméricas mais utilizadas no desenvolvimento de biossensores enzimáticos são: gelatinas, poliacrilamida, colágeno, triacetato de celulose e alginato. Novas matrizes poliméricas veem sendo pesquisadas, dentre essas a quitosana e o acetato de celulose tem se destacado, devido suas propriedades físico-químicas, biológicas e disponibilidade (Lojou & Bianco, 2006; Marques & Yamanaka, 2008; Mendes et al., 2011).

### 3.5.1 Quitosana

A quitosana é um poliaminosacarídeo natural, sucedendo de maneira muito dispersa na natureza em alguns microrganismos. Sua fórmula química é:  $(C_6H_{11}O_4N)_n$ ; e tem sua massa molar na faixa de  $1,0 \cdot 10^5 - 1,2 \cdot 10^6$  Daltons, sua estrutura química está apresentada na Figura 16.

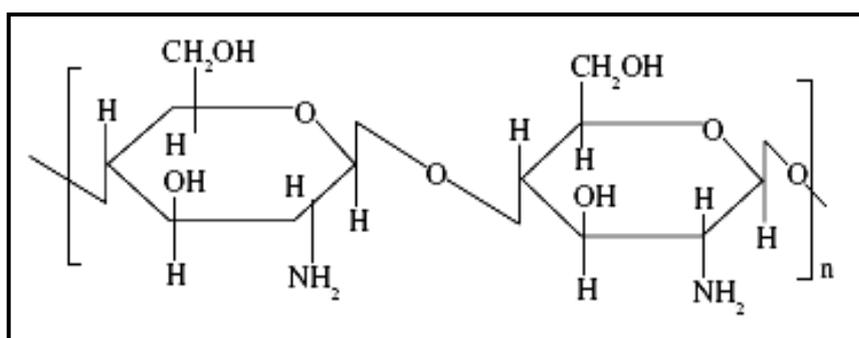


Figura 16 - Estrutura química da quitosana (S. Rubens & Pavone, 2008).

A quitosana normalmente é insolúvel em água, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções de ácidos orgânicos fracos (acético, fórmico, cítrico) e em alguns ácidos inorgânicos diluídos (clorídrico, nítrico, perclórico ou fosfórico), resultando em soluções viscosas capazes de formar membranas. A solubilidade da quitosana estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes

grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias e também maior a sua solvatação em água. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos ( $-NH_2$ ) é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações (Albuquerque, Souza, Stamford, & Stamford, 2009; Almeida, 2009; Dallan, 2005; S. Rubens & Pavone, 2008).

A estrutura da quitosana é muito similar à de sua precursora quitina, a diferença está na presença de um grupo amino ( $NH_2$ ) na posição 2 do anel glicopiranosídeo no caso na quitosana, enquanto que na quitina tem-se a presença do grupo acetamido ( $NHCOCH_3$ ) (Lima, Ribeiro, & Airoidi, 2006).

O biopolímero de quitosana possui grande percentual de grupos amino ( $NH_2$ ) disponível que favorece a boa eficiência como suporte para imobilização de enzima (Krajewska, 2004; Oliveria & Vieira, 2006).

A quitosana tem sido utilizada para imobilização em biocatalisadores, empregados na biotransformação de proteínas, modificação de óleos e gorduras e materiais lignocelulósicos, remoção de contaminantes em águas residuárias, síntese de compostos de alto valor agregado empregados nas indústrias farmacêutica e alimentícia e geração de energia, purificação de enzimas, preparação de sofisticados biossensores para medições *in situ* em águas residuárias e quantificação de metabólitos produzidos pelo organismo humano no controle de enfermidades. A imobilização de enzimas em quitosana é bastante promissora na preparação de biocatalisadores ativos e de grande interesse industrial (Mendes et al., 2011).

### **3.5.2 Acetato de Celulose**

A celulose é um polímero orgânico natural mais comum, classificado como polissacarídeo formado por um só monômero (glicose), considerada uma fonte de matéria prima quase inesgotável e biocompatível (Figura 17). Formado pela ligação repetida de d-glicose de blocos de construção, altamente funcionalizado, homopolímero de cadeia linear rígida é caracterizado pela sua hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, ampla capacidade de modificação química, sua formação e morfologias de fibras versáteis semicristalinas (Klemm, Heublein, Fink, & Bohn, 2005).

A celulose tem sido utilizada para imobilização de enzimas quiméricas sendo totalmente funcional (Gonçalves, 2011).

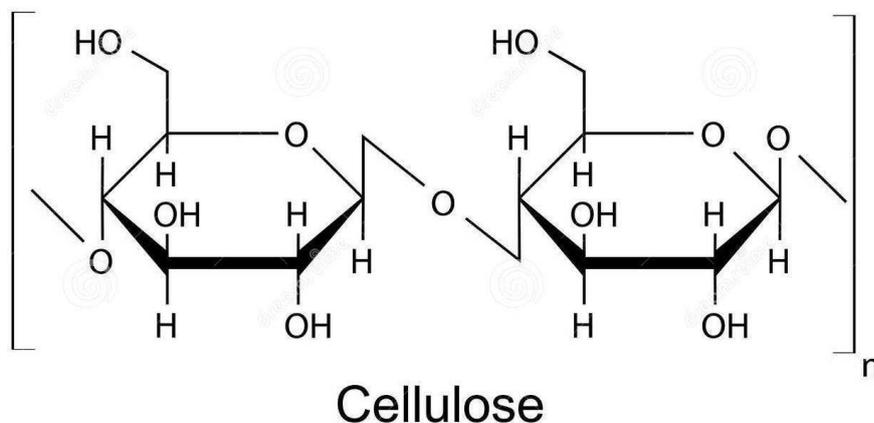


Figura 17 - Estrutura molecular da celulose (Stock Royalty, 2016).

O acetato de celulose é um éster produzido pela substituição dos grupos hidroxilas das unidades de glicose por grupos acetilas (Kelley, Company, Division, & Tn, 1989). A Figura 18 ilustra a estrutura molecular do acetato de celulose. É um dos derivados da celulose de grande importância comercial, devido a sua larga aplicação em fibras, plásticos, filmes fotográficos, filtros para cigarros, dentre outros (Edgar et al., 2001; Steinmeier, 2004).

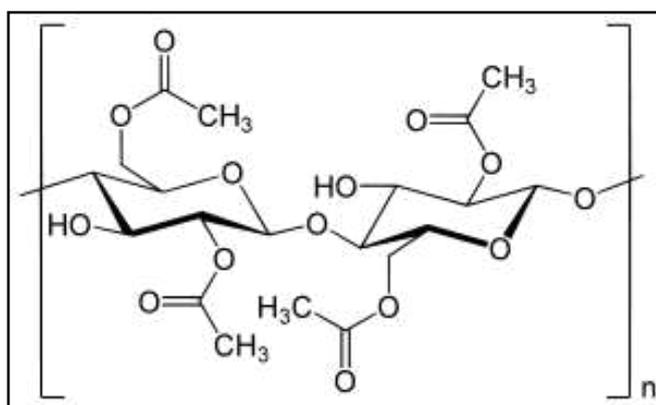


Figura 18 - Estrutura molecular do acetato de celulose (Stock Royalty, 2016).

Dentre as aplicações para o acetato de celulose está a produção de membranas que podem ser utilizadas em processos de separação como, por exemplo, osmose inversa, hemodiálise e liberação controlada de fármacos (Khulbe, Hamad, Feng, Matsuuma, & Khayet, 2004).

Imobilização de urease em celulose oferece vantagens do baixo custo, facilidade de imobilização, manuseio, longa vida de prateleira e não existe o perigo de contaminação microbiana da enzima (Reddy, Srivastava, Dey, & Kayastha, 2004).

### 3.6 Analito - Ureia

A ureia ou carbamida é um composto orgânico formado por duas moléculas do grupo funcional amino (-NH<sub>2</sub>) ligado por um grupo funcional carbonilo (C = O), a Figura 19 ilustra a estrutura química da ureia.

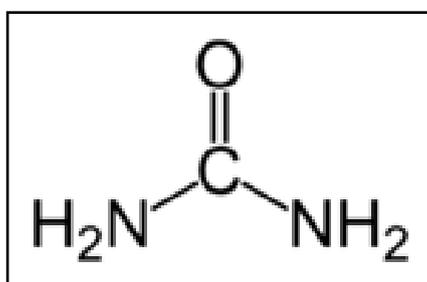


Figura 19 - Estrutura química da ureia (Wikipédia, 2014)

A ureia é um importante produto natural que constitui a etapa final do metabolismo das substâncias nitrogenadas no organismo de mamíferos sendo excretada principalmente pelos rins (Jha, Topkar, & D'Souza, 2008). Cerca de 80% do nitrogênio excretado pelo organismo está sob a forma de ureia

Nas áreas como análise clínica, indústria alimentícia, cosméticos e avaliação ambiental a determinação de ureia é de grande importância. Na área clínica, a ureia é quantificada em testes patológicos de sangue e urina; na indústria alimentícia, analisa-se ureia em leite, já que por se tratar de um constituinte não natural, sua presença pode significar adulteração do mesmo (Singh et al., 2008).

A ureia detém uma função importante no metabolismo dos compostos contendo azoto na urina dos mamíferos. A função metabólica renal é determinada pela quantidade de ureia no sangue e na urina, ocasionando sérios riscos à saúde (György et al., 2010). Dessa forma, a concentração de ureia no sangue e na urina atua como um indicador de doenças renais no ser humano, tornando a análise muito frequente nos laboratórios clínicos. A quantificação da ureia utiliza métodos

convencionais, como, por exemplo, o uso do indofenol, onde a amostra é hidrolisada pela enzima urease produzindo bicarbonato e íons amônio. Íons que na presença de salicilato, hipoclorito e nitroprussiato produzem a cor azul do indofenol, o qual possui o máximo de absorção em torno de 600nm e é proporcional a concentração de ureia (Curilazo et al., 2007).

A construção de biossensores para detecção de ureia é de extrema importância para saúde humana, pois a ureia é um bioproduto monitorado no sangue como indicador de função renal e um elevado nível causa insuficiência renal (Lakard, Herlem, Lakard, Antoniou, & Fahys, 2004; Sahney, Puri, & Anand, 2005; Wang, Chou, Sun, Hsiung, & Hsiung, 2003).

### **3.7 Estado da Arte**

Estudos mostram a utilização dos polímeros de origem natural como a quitosana e acetato de celulose para imobilizadores de enzimas nos biossensores, bem como patentes de biossensores para ureia.

Glass (1999) confeccionou um biossensor de ureia para monitoramento de hemodiálise, o dispositivo consiste em um sensor eletroquímico capaz de detectar e quantificar ureia em fluidos resultantes de procedimentos de hemodiálise. O sensor é baseado na medição da variação de pH produzidos num ambiente aquoso pelos produtos da hidrólise catalisada por enzima de ureia. Numa aplicação típica, os sensores podem ser utilizados em centros de tratamento, em conjunto com um sistema eletrônico apropriado, de modo a determinar o ponto final de hemodiálise. O sensor pode também ser utilizado para permitir estes em casa para determinar se a diálise é necessária. O teste em casa é semelhante, em princípio, a dispositivos utilizados para teste de glicose no sangue por diabéticos, e exigiria uma amostra da gota do sangue.

Crismore e colaboradores (2001) desenvolveram um biossensor eletroquímico em tiras com quatro novos recursos para análise de fluídos. Primeiro, é um recuo ao longo de uma borda da tira teste para facilitar a identificação do local de aplicação. Segundo, uma janela transparente para identificação da quantidade de amostra ideal para análise. Terceiro é a inclusão de um entalhe localizado no local de aplicação da amostra. Quarto recurso é a inclusão do óxido de polietileno para

aumentar a resistência à perfuração mecânica. Essas tiras de teste têm sido utilizadas por diabéticos e profissionais de saúde para monitorar seus níveis de glicose no sangue.

Hsiung e colaboradores (2005) desenvolveram um biossensor de ureia eletroquímico e o método de fabricação, a invenção refere-se mais particularmente a uma tecnologia para a formação de um biossensor ureia pela utilização de uma película sensível ao pH com um óxido de estanho utilizando um transdutor de efeito de campo sensível a íons (ISFET) e cooperando com a utilização da enzima urease.

Paek e colaboradores (2007) desenvolveram tiras de membranas para biossensores em sistemas de teste point-of-care. A presente invenção refere-se a um biossensor para testes de point-of-care (POCT), cuja sensibilidade de detecção foi melhorada através da inclusão das tiras de membrana em sistema de ensaio cromatográfico, no processo de fluxo cruzado sucessivo para a reação imunológica e enzimática. As tiras de membranas não só permitem ensaios rápidos e simples, como também satisfazem as necessidades clínicas para determinação altamente sensível de analitos em amostras aplicando o point of care.

Hsiung e colaboradores (2009) desenvolveram um biossensor de ureia de estado sólido, formado por um substrato contendo várias camadas, sendo uma eletricamente condutora, uma para medição de pH e outra de medição de íons de amônio. Este biossensor apresentou uma precisão de medição superior a outras técnicas.

Hsiung e colaboradores (2010) desenvolveram biossensores potenciométricos para detecção de ureia e creatinina e o método de formação Thereof. O dispositivo é formado por um substrato contendo dois eletrodos sensores, um eletrodo de referência e um eletrodo de referência interno ao substrato, e uma estrutura de embalagem que separa os eletrodos adjacentes. Os eletrodos sensores podem conter a enzima urease ou creatinina amidohidrolase.

Krajewska (2004) mostrou em seu trabalho de revisão as aplicações da quitina e quitosana para imobilização de enzima. Observou em 158 papers e 63 enzimas imobilizadas para várias aplicações que vão desde o vinho, o açúcar e indústria pesqueira, através da remoção de compostos orgânicos de águas residuais, para

biossensores sofisticados “*in situ*”, medições de poluentes ambientais e de controle metabólito em órgãos artificiais (Krajewska, 2004).

Oliveira (2006) utilizou membranas de quitosana para imobilização da peroxidase extraída de vegetal por diferentes métodos para construção de biossensores. A quitosana apresentou boa eficiência como suporte de imobilização da peroxidase, permitindo facilmente a construção dos biossensores, alta estabilidade, simplicidade, precisão e baixo custo.

Narang e colaboradores (2011) desenvolveram um biossensor amperométrico baseado na imobilização da polifenol oxidase em quitosana revestida com membrana de nylon para determinação de polifenóis em bebidas alcoólicas, chá e amostras de água. O biossensor apresentou tempo de resposta baixo e alta estabilidade de armazenamento.

Mulyasuryani e colaboradores (2010) utilizaram quitosana para imobilização de urease para o desenvolvimento de um biossensor potenciométrico. A pesquisa avaliou o efeito do pH e espessura das membranas na performance dos biossensores. Os resultados mostram que a melhor performance era para o pH de 7,3 e espessura de 0,2 mm.

Hurk e Evoy (2015) em trabalho de revisão sobre avaliação de biossensores baseados em membrana para detecção de patógenos, onde mostra a utilização de membrana de acetato de celulose e diferentes biossensores e para diferentes detecções de patógenos.

Anamika e colaboradores (2016) desenvolveram biossensores potenciométricos de colesterol por reticulação de colesterol oxidase e nanotubos de carbono modificados com membranas de acetato de celulose, que apresentou excelente sensibilidade na faixa de  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  molar e um limite de detecção de  $10^{-8}$  molar.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, localizada na Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande/UFCG.

### 4.2 Reagentes e Materiais

- Fitas de aço inoxidável AISI 301;
- Acetado de Celulose – Mn ~ 30000– **Sigma Aldrich**;
- Quitosana médio peso molecular – Alto peso molecular GD > 90% **CERTBIO**;
- Acetona P. A. – PM = 58,08 g/mol – (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO – **Isofar**;
- Tartarato hidratado de Potássio e Antimônio (III) – C<sub>8</sub>H<sub>4</sub>K<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Sb<sub>2</sub>. XH<sub>2</sub>O – PM = 613.83 g/mol – **Sigma Aldrich**;
- Hidróxido de Sódio – P. A. – PM = 40,00g/mol – **Neon**;
- Enzima Urease (**Sigma Aldrich**);
- Ureia – PM = 60,06g/mol – CH<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O – **Sigma Aldrich**;
- Unidade de aquisição, comutação e registro de dados – 34970A – **keysight Technologies**;
- PBS - Tampão fosfato-salino – **Sigma Aldrich**;
- Vidrarias de laboratório: Béquer, balão, vidro de relógio, bastão;
- Balança digital de precisão – 0,0001g;

### 4.3 Métodos

#### 4.3.1 Preparação do eletrodo referência

Fitas de aço inox foram cortadas com dimensões de 5mm de largura por 50mm de comprimento. Em seguida, uma região de aproximadamente 20mm de comprimento foi mergulhada em uma solução de tartarato hidratado de potássio e antimônio (III) e aplicado por meio de uma fonte, correntes de 0.1, 0.3 e 0.5 A

(amperes) nas fitas de aço inox, por um período de 5 minutos, para eletrodeposição do antimônio, Figura 20. (Adaptado de: Tymeeki, Rozum, & Koncki, 2006).

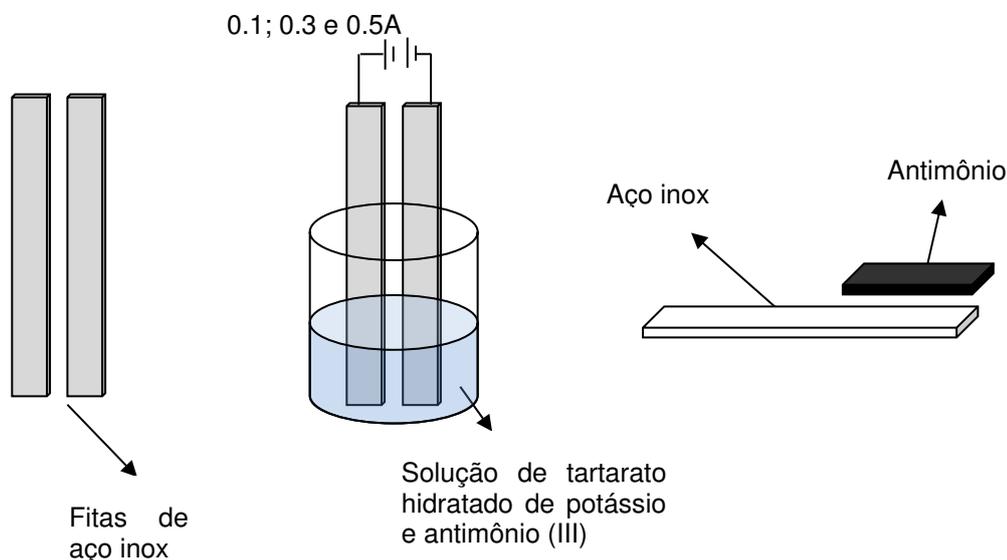


Figura 20 - Eletrodeposição do óxido de antimônio sobre o aço inox (Fonte: Própria).

Um grupo de fitas de aço inox revestidas com antimônio nas diferentes condições de eletrodeposição foram submetidas a um tratamento térmico à 550°C por 1 hora para modificação da superfície. Obtendo assim fitas nas diferentes condições de eletrodeposição com e sem tratamento térmico.

Posteriormente, as fitas de aço inox revestidas com antimônio nas diferentes condições de produção foram cobertas com camadas de polímero naturais (acetato de celulose e acetato de quitosana) pelo método de mergulho.

- Método de Mergulho

Para cobrimento dos eletrodos pelo método de mergulho, as fitas de aço inox revestidas com antimônio foram mergulhadas por um período de 30 segundos em uma solução de acetato de celulose em acetona 1% (W/V), retiradas e deixadas até completa evaporação da solução (Figura 21), para formação do número de camadas (1, 3, e 5) de acetato de celulose sobre o eletrodo, esse procedimento foi repetido por (1, 3 e 5) vezes. (Adaptado de: Tymeeki, Rozum, and Koncki 2006).

Para formação da membrana polimérica de acetato de quitosana sobre o eletrodo foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente (método de

mergulho), modificando a solução para de quitosana 1% (W/V). A solução de quitosana foi preparada dissolvendo-se 1g de quitosana em 100ml de uma solução de ácido acético a 1% sob agitação por 20h, metodologia empregada no laboratório CERTBIO.

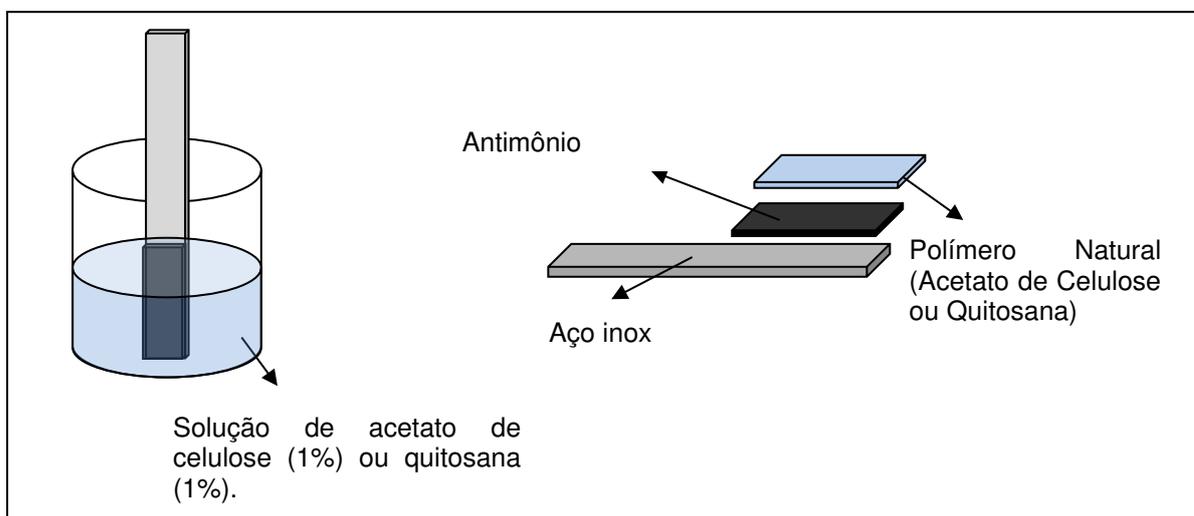


Figura 21 - Recobrimento do eletrodo pelo método de mergulho (Fonte: Própria).

### 4.3.2 Preparação do eletrodo sensor

Para formação dos eletrodos sensores foram realizados os procedimentos descritos para o eletrodo referência, método de mergulho com uma única modificação: as soluções de acetado de celulose e de acetato de quitosana contêm uma concentração de enzima urease 10 mg/mL com 60 U/mg). (Adaptado de: Tymeeki, Rozum, and Koncki 2006).

## 4.4 Caracterização da eletrodeposição do Antimônio

### 4.4.1 Microscopia Óptica (MO)

A caracterização por MO foi realizada em um Microscópio Óptico HIROX, com magnificação máxima de 3500X, onde o mesmo pode operar por transmitância ou refletância, acoplado a uma estação de Captura e Análise *de Imagens com Software*.

Foram obtidas micrografias com magnificações de 350X e 1050X das fitas de aço inox com e sem tratamento térmico após eletrodeposição com 0.1, 0.3 e 0.5 amperes para observar a morfologia da superfície dos eletrodos.

#### **4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A caracterização por MEV foi realizada em um Microscópio Eletrônico de Varredura Hitachi, modelo TM-1000, com magnificação máxima de 10000x, profundidade de foco de 1 mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 à 270Pa).

Foram obtidas micrografias eletrônicas com aumento de 3000X e 5000X das fitas de aço inox com e sem tratamento térmico após eletrodeposição com 0.1, 0.3 e 0.5 amperes para observar a morfologia da superfície dos eletrodos após eletrodeposição e a estrutura morfológica das partículas de antimônio.

#### **4.4.3 Difração de raios X (DRX)**

A caracterização por DRX foi realizada em um Difrátômetro de Raios X cujo o objetivo foi determinar as fases cristalinas presentes e tamanho de cristalitos. As análises de difração de raios X foram conduzidas sob temperatura ambiente em um aparelho XRD-7000 Shimadzu, utilizando radiação  $K\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV e corrente 30mA, examinados com ângulo de incidência fixo em 5 graus em um intervalo de  $2\theta$  entre 25,0 e 70,0 graus a uma velocidade de  $2\theta/\text{min}$ .

Informações mais detalhadas das medidas de raios X foram obtidas por meio do método de Rietveld (RIETVELD, 1969) utilizando o programa General System Analyzer Structure (GSAS-II). Para obter as informações cristalográficas foram utilizadas as fichas cristalográficas nº 9859-ICSD retirada do banco de dados Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), nº 9536-AMCSD, nº 0015-AMCSD e a nº 10496-AMCSD retirada do bando de dados American Mineralogist Crystal Structure Database.

Os difratogramas dos eletrodos nas diferentes condições de eletrodeposição sem e com tratamento térmico foram analisados pelo método de Rietveld, onde é possível observar o ajuste entre os difratogramas observado (medida obtida do

Difratômetro) (linha verde), padrão de DRX calculado por Refinamento Rietveld (x, linha preta) e a diferença entre ambos (linha vermelha) usando os programas GSAS II.

#### **4.5 Caracterização morfológica das membranas poliméricas**

##### **4.5.1 Microscopia Óptica (MO)**

Foram obtidas micrografias com magnificações de 1050X e 2800X das membranas poliméricas de acetato de celulose e de acetato de quitosana com e sem a enzima urease para observar a morfologia das membranas (Adaptado de: Prayoga, Mulyasuryani, and Prasetyawan 2014).

##### **4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foram obtidas micrografias eletrônicas dos eletrodos com revestimento das membranas poliméricas de acetato de celulose e de acetato de quitosana com e sem a enzima urease com aumento de 1000X e 3000X para observar a morfologia das membranas após recobrimento dos eletrodos (Adaptado de: Prayoga, Mulyasuryani, and Prasetyawan 2014).

#### **4.6 Caracterização das Propriedades dos Biossensores**

##### **4.6.1 Sensibilidade**

A sensibilidade é definida como a alteração na magnitude do sinal de “saída” do biossensor como resposta à alteração da concentração de uma espécie química específica. A determinação da sensibilidade do biossensor de ureia foi medida por uma unidade de aquisição, comutação e registro de dados, modelo 34970A da *keysight Technologies*, avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, numa faixa de concentração de 2; 4; 6; 8, 10 e 20 (mM) em solução tampão de PBS e no PBS puro (Adaptado de: Alqasaimeh, Heng, and Ahmad 2007; Tymeeki, Rozum, and Koncki 2006).

A sensibilidade de um biossensor pode ser definida pela equação 1, onde observa-se que a sensibilidade é uma função linear em relação a concentração da espécie química “[Ureia]” e a variação do potencial elétrico “ $\Delta mV$ ”.

Equação 1- Sensibilidade do Biossensor.

$$\text{Sens.} = \Delta mV / [\text{Ureia}]$$

#### **4.6.2 Faixa de Linearidade**

Um biossensor perfeitamente linear apresentará a sua sensibilidade constante desde a concentração nula de substrato até à máxima concentração de substrato que possa ser fisicamente dissolvida no meio de medida. Para a determinação da linearidade do biossensor de ureia foi medida uma unidade de aquisição de dados modelo 34970A, avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia, numa faixa de concentração de 2; 4; 6; 8, 10 e 20 mM em solução de PBS e PBS puro (Adaptado de: Alqasimeh, Heng, and Ahmad 2007; Rodrigues 2014).

#### **4.6.3 Período de estabilidade**

O período de estabilidade indica o tempo necessário para que a resposta “diferença de potencial” do biossensor se estabilize, ou seja, apresente um valor estável. Para determinação do período de estabilidade foi avaliado o tempo necessário para estabilidade das medidas de diferença de potencial nas concentrações de 2; 4; 6; 8, 10 e 20 mM em solução tampão de PBS e no PBS puro (Adaptado de: Alqasimeh, Heng, and Ahmad 2007; Rodrigues 2014).

#### **4.6.4 Seletividade**

Um biossensor ideal deverá responder unicamente a alterações na concentração do analito alvo não sendo influenciado pela presença de outras espécies químicas em solução. A determinação da seletividade do biossensor de ureia foi medida por uma unidade de aquisição de dados modelo 34970A, avaliando a diferença de potencial (ddp) obtida em resposta à concentração de ureia fixa em

presença da adição de outra espécie química na solução (sais e creatinina) (Adaptado de: Alqasaimeh, Heng, and Ahmad 2007; Rodrigues 2014).

#### **4.6.5 Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade indica a capacidade de biossensores com mesmas condições de preparação, parâmetro e de análises apresentarem respostas similares. Para determinação da reprodutibilidade dos biossensores foram feitas medidas em quatro biossensores com mesma condição de preparação, parâmetros e de análises e analisados seus desvios. Os biossensores com melhores biorespostas foram selecionados para essa caracterização (Adaptado de: Alqasaimeh, Heng, and Ahmad 2007).

#### **4.6.6 Repetibilidade**

A repetibilidade avalia as condições de o biossensor apresentar respostas similares para medidas com um mesmo biossensor. Para determinação da repetibilidade dos biossensores foram feitas medidas por meio de uma unidade de aquisição de dados modelo 34970A, *realizando* medidas com um mesmo biossensores nas soluções com diferentes concentrações de ureia e analisados seus desvios. Os biossensores com melhores biorespostas foram selecionados para essa caracterização (Adaptado de: Alqasaimeh, Heng, and Ahmad 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da eletrodeposição do Antimônio

Os eletrodos com eletrodeposição de antimônio preparados nas condições de 0.1, 0.3 e 0.5 amperes com e sem tratamento térmico foram caracterizados por microscopia ótica, microscopia eletrônica de varredura e difração de raios X para avaliação da camada de antimônio formada sobre o aço inox. A Tabela 1 mostra a nomenclatura adotada as descrições para as diferentes as amostras utilizadas no estudo.

Tabela 1 - Condições de preparação dos eletrodos.

<b>Condição de eletrodeposição</b>	<b>Sem tratamento térmico</b>	<b>Com tratamento térmico</b>
<b>0.1A</b>	<b><i>Sb-0.1A-ST</i></b>	<b><i>Sb-0.1A-CT</i></b>
<b>0.3A</b>	<b><i>Sb-0.3A-ST</i></b>	<b><i>Sb-0.3A-CT</i></b>
<b>0.5A</b>	<b><i>Sb-0.5A-ST</i></b>	<b><i>Sb-0.5A-CT</i></b>
<b>Aço inox sem eletrodeposição</b>	<b><i>ACO-ST</i></b>	<b><i>ACO-CT</i></b>

#### 5.1.1 Microscopia Óptica (MO)

As imagens de micrografia obtidas por microscopia ótica mostram a morfologia superficial das amostras nas diferentes condições de preparação conforme apresentado na Tabela 1.

Pode-se observar na Figura 22 as imagens de microscopias óticas das fitas de aço inox com e sem tratamento térmico com aumento de 350X e 1050X, onde se verifica na superfície do aço inox ranhuras direcionais em toda área analisada com presença de pequenos defeitos de impurezas, após o tratamento térmico a superfície mantém o perfil morfológico com pequenas alterações que são insignificantes.

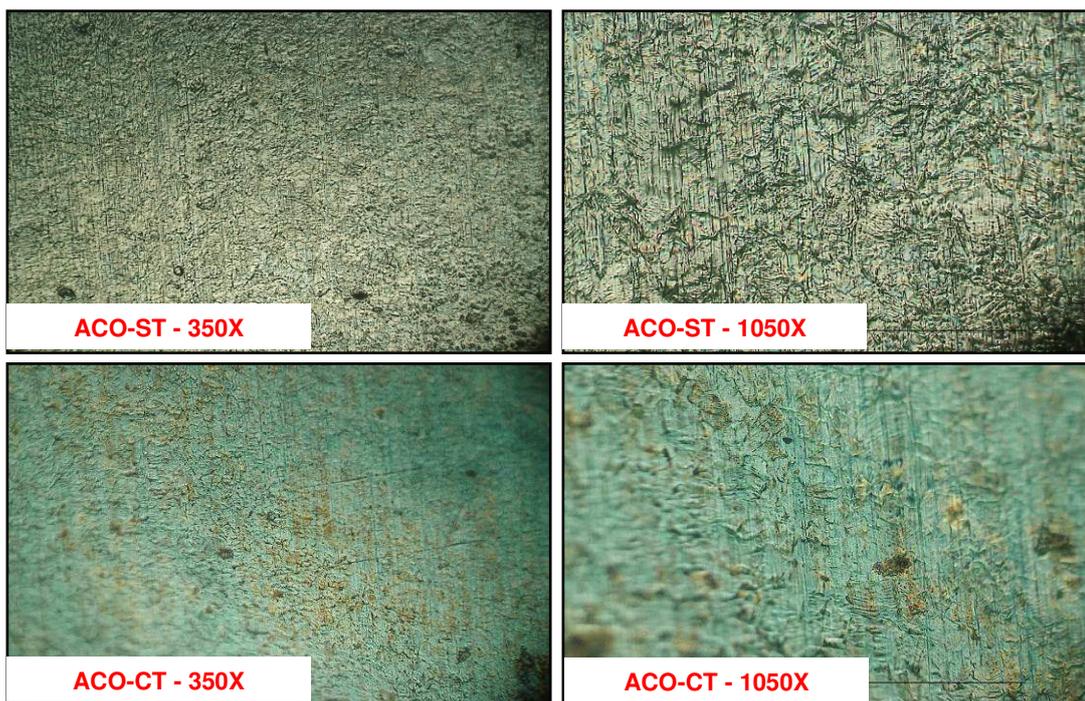


Figura 22 – Microscopia ótica das fitas de aço inox sem e com tratamento térmico respectivamente (Fonte: Própria).

Na Figura 23, são observadas as imagens dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico com aumentos de 350X e 1050X, onde é observada nas imagens uma superfície rugosa e uniforme nas com presença de pequenos pontos embranquecidos que pode ser defeitos pontuais ou a oxidação do antimônio nas amostras sem tratamento térmico, esse perfil morfológico da superfície foi formado pelo processo de eletrodeposição que devido a corrente selecionada para tal processo induz ao crescimento dos núcleos depositados de antimônio.

No entanto, após o tratamento térmico, ocorre uma modificação do perfil morfológico da superfície com uma alteração da coloração, tornando a superfície mais clara e o aparecimento de algumas trincas, este efeito ocorre provavelmente devido pela expansão dos núcleos de antimônio formado devido ao aquecimento a 550°C, dois fatos importantes indicam esta possível expansão, primeiro por não se conseguir um foco sobre toda superfície que ocorre pela diferença de altura apresentada entre os grãos formados e o segundo pela alteração da estrutura cristalina que é observado na difração de raios X.

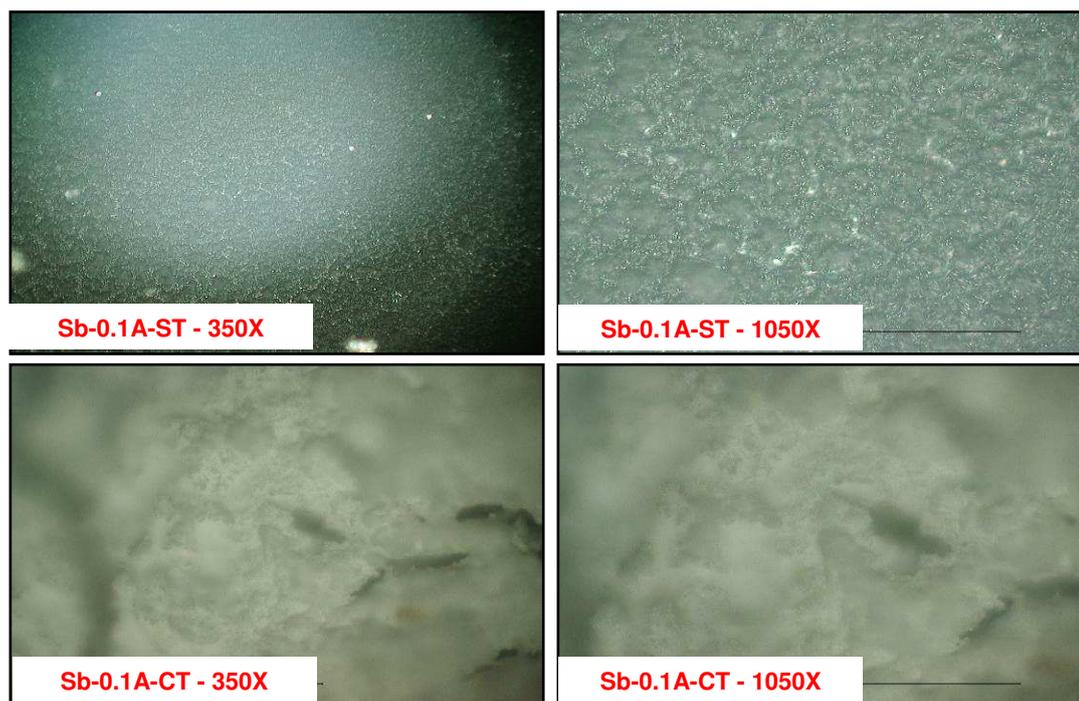


Figura 23 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

A Figura 24 mostra as micrografias dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico com aumentos de 350X e 1050X, onde verifica-se a formação de uma superfície menos rugosa e uniforme sobre toda região avaliada, esta mudança ocorre devido a corrente utilizada no processo de eletrodeposição que levou a formação de uma maior quantidade de núcleos e por consequência uma diminuição do tamanho dos núcleos depositados de antimônio, também é visualizado regiões com uma coloração mais clara “embranquecidas e embaçada” e pontos claros que pode ter sido ocasionado pela oxidação do antimônio ou defeitos.

Após o tratamento térmico ocorre uma modificação do perfil morfológico da superfície com uma alteração da coloração, tornando a superfície mais clara e o aparecimento de poros distribuídos em toda superfície. Observa-se nesta morfologia que a expansão dos aglomerados formados são mais suáveis, visto que é possível focalizar toda superfície sem perda de foco, o que indica que a variação da altura entre os aglomerados formados pelo efeito da temperatura é pequena.

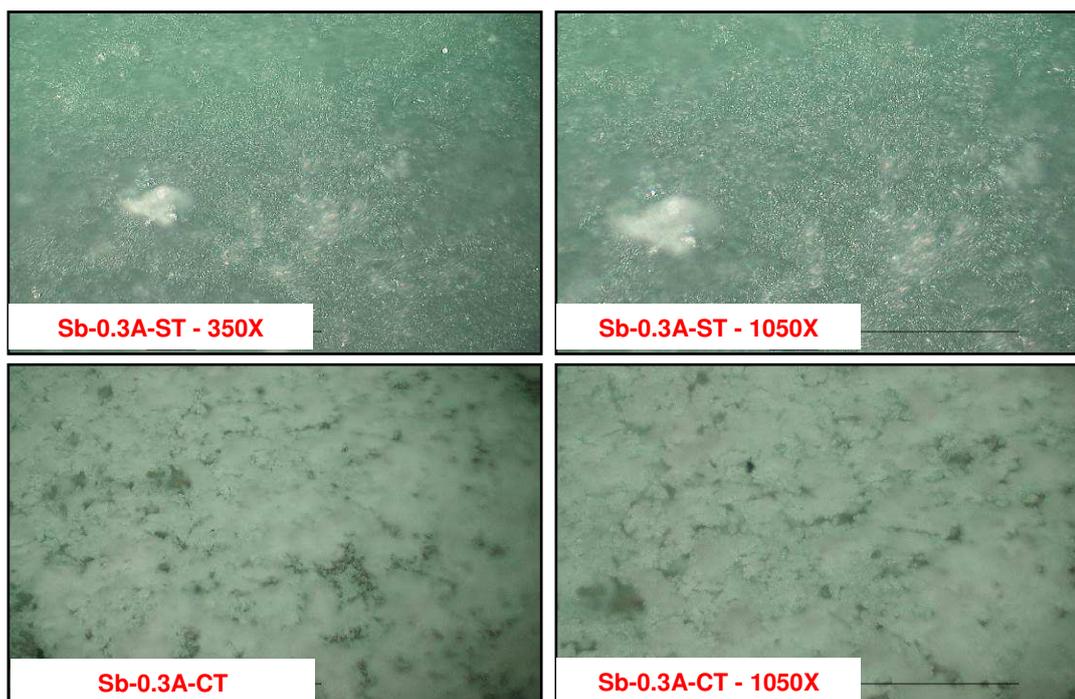


Figura 24 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

As micrografias dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico com aumentos de 350X e 1050X, são apresentadas na Figura 25, onde observa-se uma superfície pouco rugosa e uniforme com a aparição de diversos pontos embranquecidos são formados por defeitos de inclusão ou formação de óxido de antimônio, esta alteração da morfologia superficial pode ter sido provocada pela elevação da corrente utilizada na eletrodeposição que promove a diminuição dos aglomerados formados.

Após o tratamento térmico, visualiza-se a mudança da coloração da superfície tornando-se mais clara e o aparecimento de poucos defeitos volumétricos “poros” dispersos na superfície, estas alterações são provocadas pela alteração da corrente utilizada na eletrodeposição e pelo efeito da temperatura empregada no tratamento térmico.

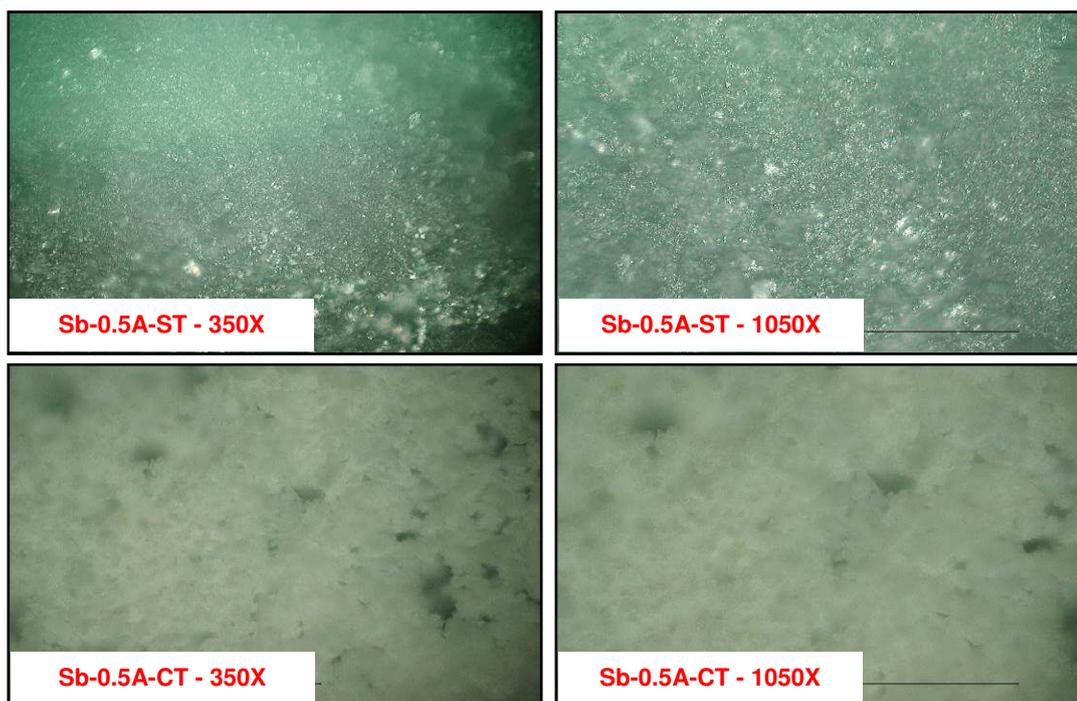


Figura 25 – Microscopia ótica dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

Dois pontos importantes são observados a partir das análises da morfologia superficial a partir da microscopia ótica do processo de eletrodeposição de antimônio nas fitas de aço inoxidável. Primeiramente o aumento da corrente elétrica utilizada para eletrodeposição do antimônio provoca um aumento de íons que são atraídos pelo catodo, gerando assim, uma maior deposição de antimônio na superfície do aço, que favorece a diminuição do tamanho dos aglomerados formados na superfície e pode ter induzido a formação de uma superfície menos rugosa.

Segundo ponto observado pelas imagens de MO é que o tratamento térmico modifica morfologia da superfície em todas condições de eletrodeposição formando uma superfície com uma coloração mais clara e com o aparecimento de defeitos volumétricos de acordo com a condição da eletrodeposição, este fato está relacionado a expansão dos aglomerados de antimônio inicial para uma outra estrutura. Esta observação é evidenciada pela caracterização de difração de raios X - DRX discutida adiante, onde é constatado a modificação da estrutura cristalina do antimônio metálico para formação de óxido de antimônio.

Também pela caracterização morfológica por microscopia eletrônica de varredura – MEV onde se visualiza com maior nitidez as mudanças associadas a esta oxidação e alteração da estrutura cristalina.

### 5.1.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura nos mostram a morfologia superficial das amostras nas diferentes condições de preparação conforme apresentado na Tabela 1.

A Figura 26 mostra as micrografias eletrônicas de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico com aumentos de 3000X e 8000X, onde é observada nas imagens das amostras sem tratamento térmico uma superfície rugosa formada por aglomerados de antimônio e trincas. Este aspecto morfológico forma-se provavelmente devido a corrente utilizada no processo de eletrodeposição que possibilita um maior tempo de acomodação dos íons solvatados favorecendo ao crescimento dos aglomerados e possivelmente a formação de defeitos.

Após o tratamento térmico é observado uma mudança da morfologia superficial com o desaparecimento dos defeitos de trincas, forma e tamanhos dos aglomerados, tornando a superfície rugosa mais uniforme.

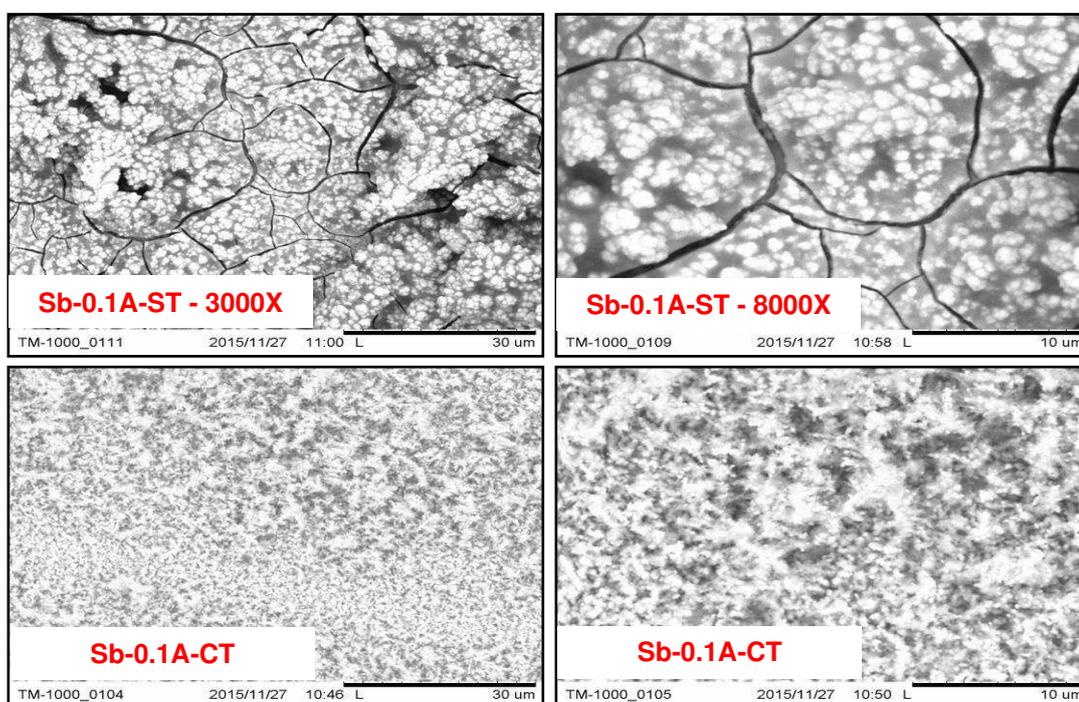


Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.1A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

Na Figura 27, verificam-se as micrografias eletrônicas de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico com aumentos de 3000X e 8000X, onde é observada nas imagens uma superfície rugosa com presença de poros e o crescimento de grãos que exibem a formação de aglomerados de forma colunar, ou seja, essas estruturas têm forma mais comprida e delgada nas amostras sem tratamento térmico.

A forma do crescimento dos grãos pode estar associada ao aumento da corrente elétrica utilizada para eletrodeposição do antimônio que aumenta o número de núcleos de deposição e diminui o tempo de acomodação dos íons solvatados, fazendo com que os íons cresçam por cima dos íons já existentes.

Após o tratamento térmico, ocorre uma alteração da forma como os aglomerados de antimônio se organizam criando uma forma granular, ou seja, em grãos esféricos, esta mudança pode ser associada à expansão dos aglomerados como mencionado no MO, que ocorre pelo efeito da oxidação que promove a alteração da estrutura cristalina será abordada mais adiante no DRX, no entanto, ainda é visível o perfil morfológico rugoso com presença de poros.

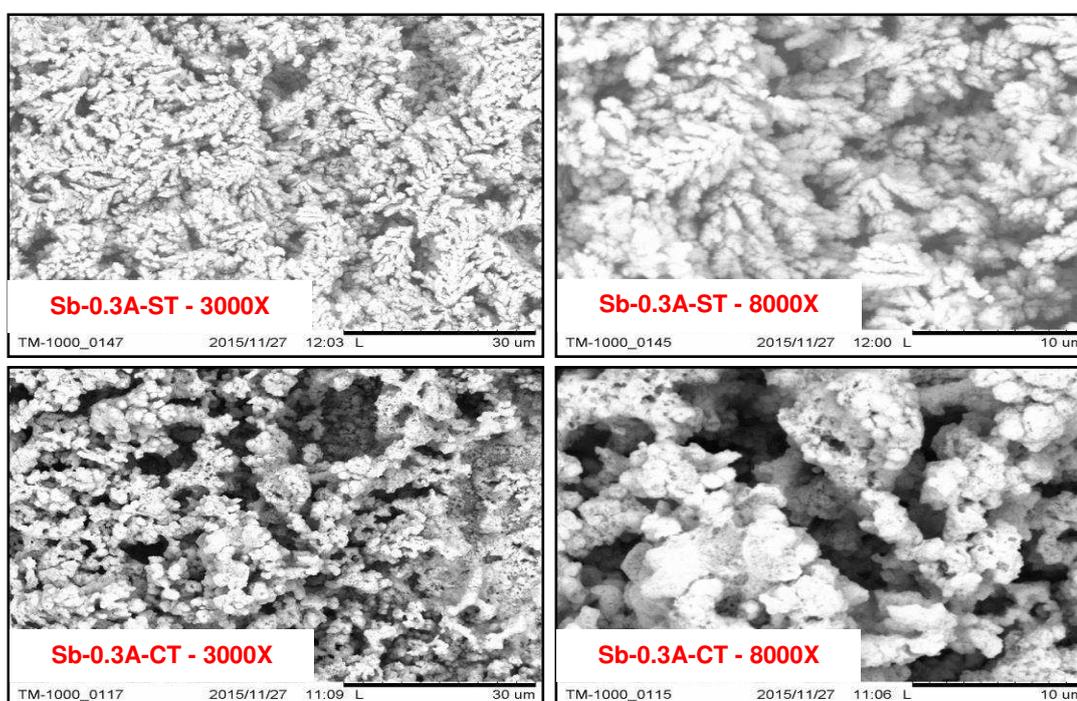


Figura 27 - Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.3A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

A Figura 28 mostra as micrografias eletrônicas de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico com aumentos de 3000X e 8000X, onde é observada nas imagens sem tratamento térmico uma superfície rugosa com poros e o crescimento de estruturas que exibem a formação de aglomerados de forma colunar.

Assim como nas amostras com eletrodeposição a 0.3 amperes, o crescimento dos grãos nesta superfície pode estar relacionado ao aumento da corrente elétrica utilizada para eletrodeposição do antimônio, que neste caso é de 0.5 amperes. Após o tratamento térmico, há uma diminuição no tamanho dos poros e os aglomerados apresentam o crescimento em forma de grãos esféricos.

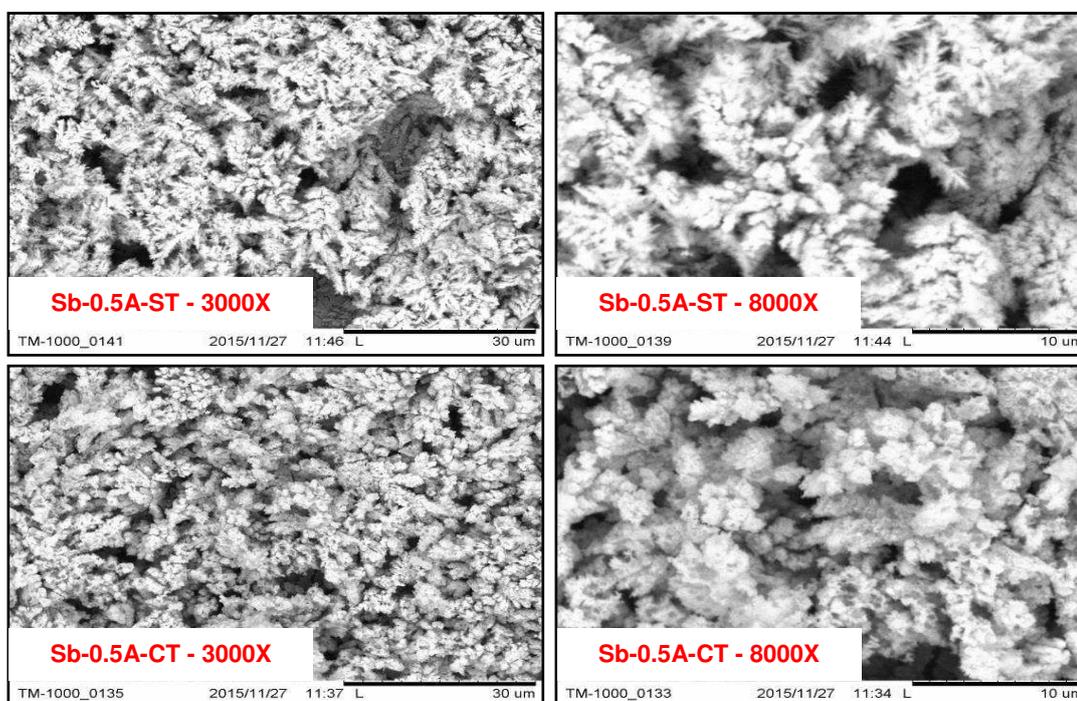


Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos na condição de eletrodeposição de 0.5A sem e com tratamento térmico (Fonte: Própria).

O aumento da corrente elétrica utilizada para eletrodeposição do antimônio provoca um aumento de íons que são atraídos pelo cátodo, gerando, assim uma maior deposição de antimônio na superfície do aço, favorecendo a formação de superfícies distintas. O tratamento térmico modificou a morfologia da superfície em todas as condições de eletrodeposição com crescimento de aglomerados em forma esférica e com presença de poros. As variações da morfologia apresentadas, com e sem o tratamento térmico, condizem com os resultados apresentados pela microscopia ótica

e também são condizentes com os resultados analisados adiante na difração de raios X das amostras.

### 5.1.3 Difração de raios X (DRX)

Os eletrodos preparados nas diferentes condições de eletrodeposição, sem e com tratamento térmico, conforme apresentado na Tabela 1, foram caracterizados por difração de raios X com a finalidade de observar a deposição de antimônio na superfície do aço inox, as fases cristalinas formadas pela eletrodeposição, os parâmetros de rede e tamanho dos cristalinos.

Os difratogramas das fitas de aço inox com eletrodeposição de antimônio nas condições 0,1A; 0,3A e 0,5A sem o tratamento térmico apresentaram picos típicos do antimônio, com única fase cristalina (romboédrica – grupo espacial R-3m) a mesma estrutura apresentada por Barrett e colaboradores (1973).

A Figura 29 mostra o padrão de difração de raios x do antimônio e sua respectiva estrutura cristalina: antimônio (Sb – romboédrica - grupo espacial R-3m).

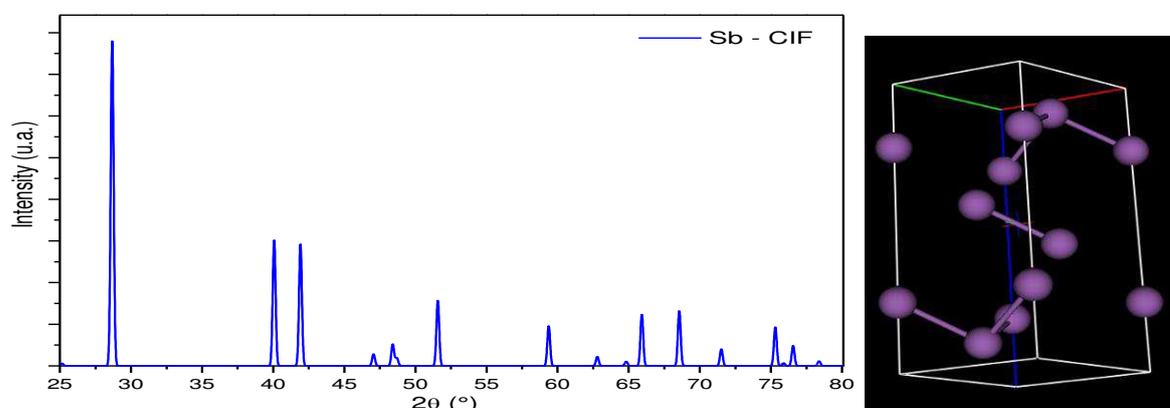


Figura 29 - Padrão de difração de raios X do antimônio e dos óxidos de antimônio (Fonte: Própria).

Já os difratogramas das fitas de aço inox com eletrodeposição de antimônio nas condições de 0.1A, 0.3A e 0.5A, com o tratamento térmico apresentaram picos relacionado as fases do óxido de antimônio:  $Sb_2O_5$  (cúbica - grupo espacial Fd-3m) e  $Sb_2O_3$  (ortorrômbico – grupo espacial Pc-cn e cúbica – grupo espacial Fd-3m). O refinamento Rietveld confirmou a formação de três estruturas cristalinas: o pentóxido de antimônio, trióxido de antimônio (senarmonite, syn) e o trióxido de antimônio

(valentinite, syn), o que condiz com a estrutura apresentada por Hanawalt e colaboradores (1938), Dehlinger (1927) e Svensson (1973), respectivamente.

As Figura 31 e 31 mostram os difratogramas de raios X com o resultado do refinamento Rietveld das amostras dos eletrodos com eletrodeposição de antimônio com e sem tratamento térmico. Na

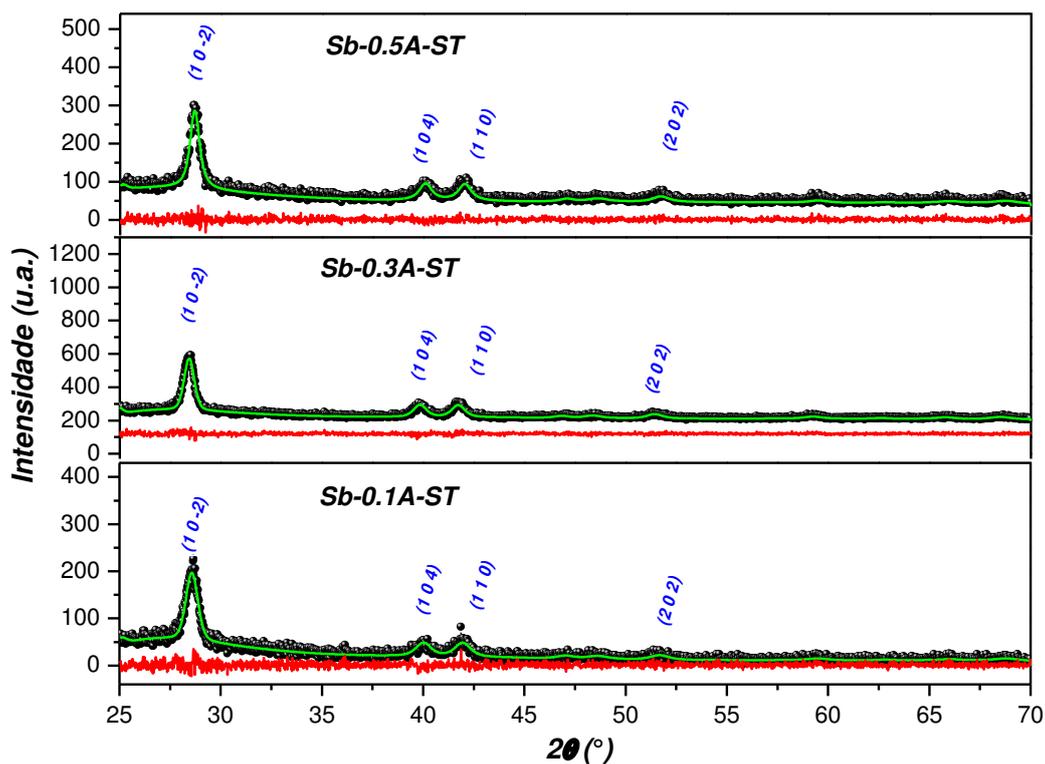


Figura 30 visualiza-se o perfil de difração para as amostras sem tratamento térmico nas diferentes condições de eletrodeposição, onde é identificado que a condição de eletrodeposição altera minimamente a posição, largura e intensidade dos picos, o que mostra tratar-se do antimônio metálico.

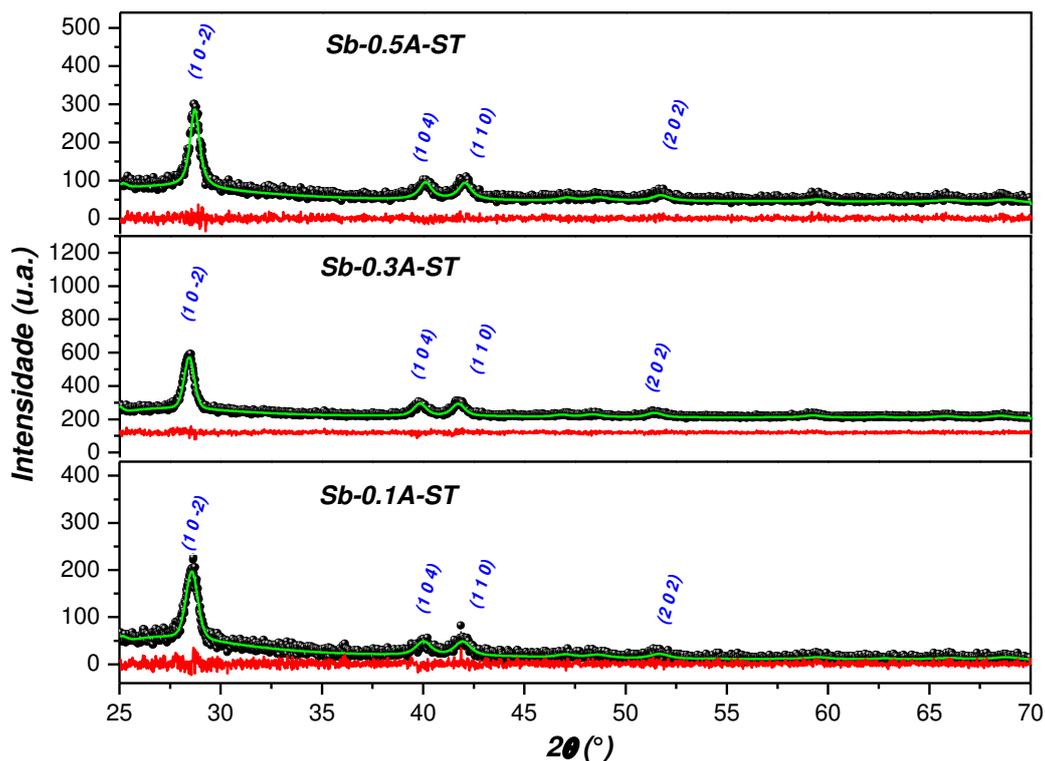


Figura 30 - Análise pelo método de Rietveld dos difratogramas de raios X dos eletrodos nas diferentes condições de eletrodeposição sem tratamento térmico (Fonte: Própria).

Na Figura 31 visualiza-se o perfil de difração para as amostras com tratamento térmico nas diferentes condições de eletrodeposição, neste caso observa-se uma completa modificação do perfil de difração das amostras. Nas amostras com eletrodeposição de 0.1 e 0.3 amperes o perfil de difração é semelhante com pequenas alterações da posição, largura, intensidade dos picos, já na amostra com eletrodeposição de 0.5 ocorre a formação de um outro perfil de difração devido a formação de uma outra fase cristalina.

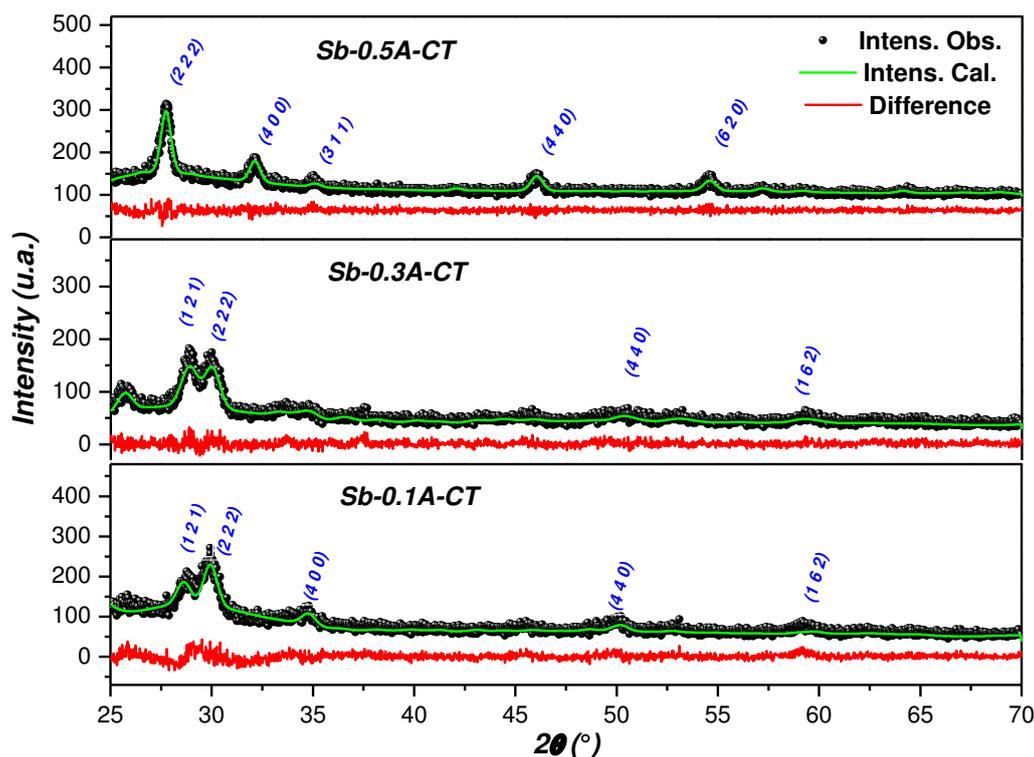


Figura 31 - Análise pelo método de Rietveld dos difratogramas de raios X dos eletrodos nas diferentes condições de eletrodeposição com tratamento térmico (Fonte: Própria).

A partir dos resultados nas diferentes amostras, foi possível determinar os parâmetros de rede, quantificação das fases cristalinas presentes e estimar o tamanho médio de cristalito por Scherrer. A Tabela 2 mostra os parâmetros cristalográficos para cada amostra analisada, onde verifica-se que os tamanhos dos cristalitos diminuem com o aumento da corrente elétrica utilizada no processo de eletrodeposição nas amostras sem tratamento térmico. Isto ocorre pois com o aumento da corrente elétrica os íons solvatados são atraídos com maior velocidade sobre a superfície metálica do aço inox formando vários núcleos que tendem a se neutralizar evitando o seu crescimento que condiz com o estudo apresentado por Stenger (2008) sobre rugosidade superficial de camadas eletrodepositadas.

As amostras com tratamento térmico nas condições de 0.1A e 0.3A apresentam duas fases cristalinas, onde os tamanhos médios de cristalitos da fase  $Sb_2O_5$  tendem a aumentar e a fase  $Sb_2O_3$  a diminuir com o aumento da corrente elétrica. Esse fato deve-se ao tipo de estrutura cristalina apresentada pelas fases, pois a estrutura cúbica apresenta um maior empacotamento atômico o que, com o aumento da corrente

elétrica, tende a aumentar o tempo para formação dos núcleos favorecendo a crescimento dos cristalitos. Na estrutura ortorrômbica que possui um menor fator de empacotamento atômico, verifica-se uma diminuição do tamanho dos cristalitos com o aumento da corrente como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros Cristalográficos das amostras nas diferentes condições de eletrodeposição com e sem tratamento térmico.

<b>Amostra</b>	<b>Fórmula Química / Nome Mineral</b>	<b>Estrutura Cristalina e Grupo Espacial</b>	<b>Concentração de fase cristalina (%)</b>	<b>Parâmetros: a, b e c; <math>\alpha</math>, <math>\beta</math> e <math>\gamma</math>.</b>	<b>Tamanho de Cristalito – Equatorial isotrópica (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>SbST-0.1A</b>	Sb Antimônio	Romboédrica R – 3m	100,00	a = 4.289; b = 4.289; c = 11.258 $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	0,03982
<b>SbST-0.3A</b>	Sb Antimônio	Romboédrica R – 3m	100,00	a = b = 4.301; c = 11.272 $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	0,03122
<b>SbST-0.5A</b>	Sb Antimônio	Romboédrica R – 3m	100,00	a = b = 4.300; c = 11.291 $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	0,02315
<b>SbCT-0.1A</b>	Sb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Pentóxido de Antimônio	Cúbica F d 3 m	47,201	a = b = c = 10.285; $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 90^\circ$	0,01771
	Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Valentinite syn	Ortorrômbica P c c n	52,799	a = 4.821; b = 12.147; c = 5.331; $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 90^\circ;$	0,03333
<b>SbCT-0.3A</b>	Sb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Pentóxido de Antimônio	Cúbica F d 3 m	60,108	a = b = c = 10.209 $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 90^\circ;$	0,02150
	Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Valentinite syn	Ortorrômbica P c c n	39,892	a = 4.895; b = 12.380; c = 5.401; $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 90^\circ;$	0,02409
<b>SbCT-0.5A</b>	Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Senarmontite syn	Cúbica F d 3 m	100,00	a = b = c = 11.123; $\alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 90^\circ;$	0,06373

Ainda na Tabela 2, são apresentados os parâmetros cristalográficos da amostra com tratamento térmico na condição de 0,5A, onde observa-se que os tamanhos dos

cristalitos aumentaram em relação às amostras anteriores, isto devido a formação de uma única fase de óxido de antimônio com sistema cristalino cúbico, o que favoreceu seu crescimento.

Os valores do fator de confiança do refinamento das amostras nas diferentes condições de eletrodeposição sem e com tratamento térmico são apresentados na Tabela 3, onde é possível observar que os valores  $R_{wp}$  são todos inferiores a 24%. Vale ressaltar que as condições não favoreciam a uma intensidade boa e mesmo assim um bom fator de confiança foi alcançado, que para situação de análise demonstra uma boa confiabilidade dos resultados.

Tabela 3 – Os dados do fator de confiança do refinamento das amostras nas diferentes condições de eletrodeposição sem e com tratamento térmico.

<b><i>Amostra</i></b>	<b><i>R<sub>wp</sub></i></b>
<b><i>SbST-0.1A</i></b>	<b>20,93%</b>
<b><i>SbST-0.3A</i></b>	<b>18,29%</b>
<b><i>SbST-0.5A</i></b>	<b>21,51%</b>
<b><i>SbCT-0.1A</i></b>	<b>21,67%</b>
<b><i>SbCT-0.3A</i></b>	<b>23,93%</b>
<b><i>SbCT-0.5A</i></b>	<b>23,76%</b>

De acordo com os resultados obtidos no refinamento, observa-se que as condições de eletrodeposição sem tratamento térmico influenciam no tamanho de cristalitos. Quanto maior a corrente utilizada no processo de eletrodeposição, menor o tamanho dos cristalitos, isso devido ao aumento da velocidade de atração dos íons solvatados na solução conforme ilustra a Figura 32.

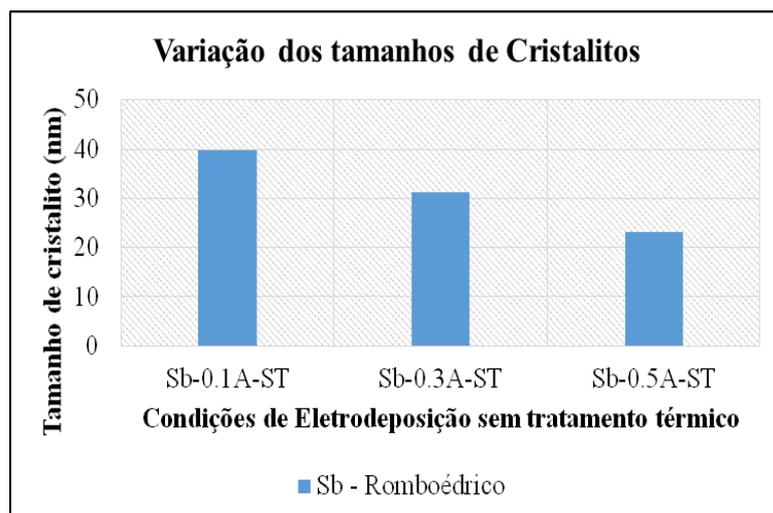


Figura 32 - Tamanho de cristalitos de antimônio formados nas diferentes condições de eletrodeposição sem tratamento térmico (Fonte: Própria).

Nas amostras com diferentes condições de eletrodeposição com tratamento térmico, os resultados obtidos no refinamento mostram que o tamanho dos cristalitos da fase cúbica cresce enquanto a ortorrômbica diminui com a corrente elétrica, isso devido as alterações das estruturas cristalinas com a formação de óxidos e dos parâmetros de rede das estruturas formadas conforme ilustra a Figura 33

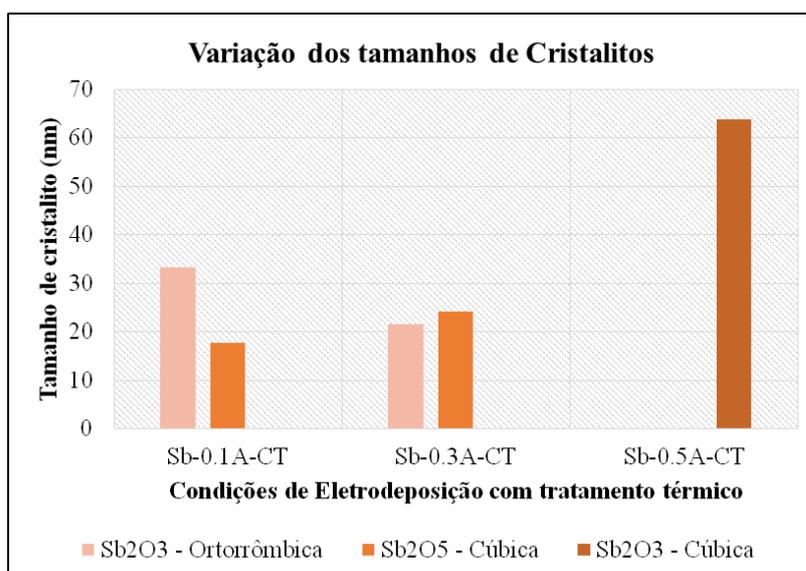


Figura 33 - Tamanho de cristalitos dos óxidos de antimônio formados nas diferentes condições de eletrodeposição com tratamento térmico (Fonte: Própria).

## 5.2 Caracterização físico-química e morfológica das camadas matriz dos eletrodos

As membranas de acetato de quitosana e de acetato de celulose com e sem enzima foram caracterizadas por microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura para avaliação da morfologia superficial das membranas poliméricas com e sem enzima imobilizada, afim de verificar se houve uma boa dispersão e dissolução da enzima. A Tabela 4 mostra a nomenclatura adotada e as descrições para as diferentes as amostras utilizadas no estudo.

Tabela 4 – Membranas de quitosana e acetato de celulose.

<b>Membrana</b>	<b>Sem Enzima urease</b>	<b>Com enzima urease</b>
<b>Quitosana</b>	<b><i>Quit-SE</i></b>	<b><i>Quit-CE</i></b>
<b>Acetato de Celulose</b>	<b><i>Acet-SE</i></b>	<b><i>Acet-CE</i></b>

### 5.2.1 Microscopia Óptica (MO)

Na Figura 34, verificam-se as imagens obtidas por microscopia ótica das membranas de acetato de quitosana com e sem enzima urease com aumento de 1050X e 2800X, onde se verifica nas membranas sem presença de enzima urease uma superfície uniforme mínima presença de defeitos.

Após a adição da enzima urease observa-se uma leve alteração da morfologia superficial tornando a superfície levemente rugosa. Estas alterações provocadas nas membranas de acetato de quitosana são insignificantes e por outro lado indica que a enzima esta totalmente dissolvida e dispersa nas membranas o que é um fator desejado na imobilização de um elemento de reconhecimento biológico para sua utilização de forma eficiente nos biossensores.

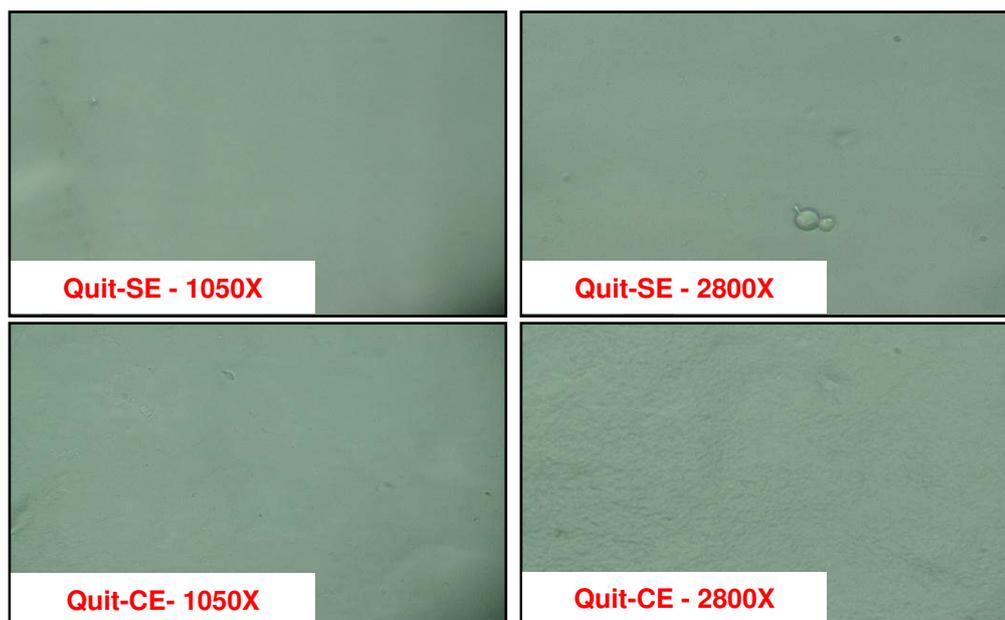


Figura 34 - Microscopia ótica das membranas de quitosana sem e com enzima urease (Fonte: Própria).

Na Figura 35, observam-se as imagens da membrana de acetato de celulose com e sem enzima urease com aumento de 1050X e 2800X, onde verifica-se nas membranas de acetato de celulose uma superfície uniforme levemente rugosa sem a presença de defeitos (trincas, impurezas, poros), após a adição da enzima urease na membrana observa-se que a morfologia superficial se torna mais rugosa. Entretanto não é possível visualizar partículas da enzima na membrana o que indica uma boa dissolução e dispersão da enzima urease nas membranas.

Em ambas membranas poliméricas (acetato de quitosana e acetato de celulose) a adição da enzima urease não provocou qualquer alteração significativa da morfologia superficial.

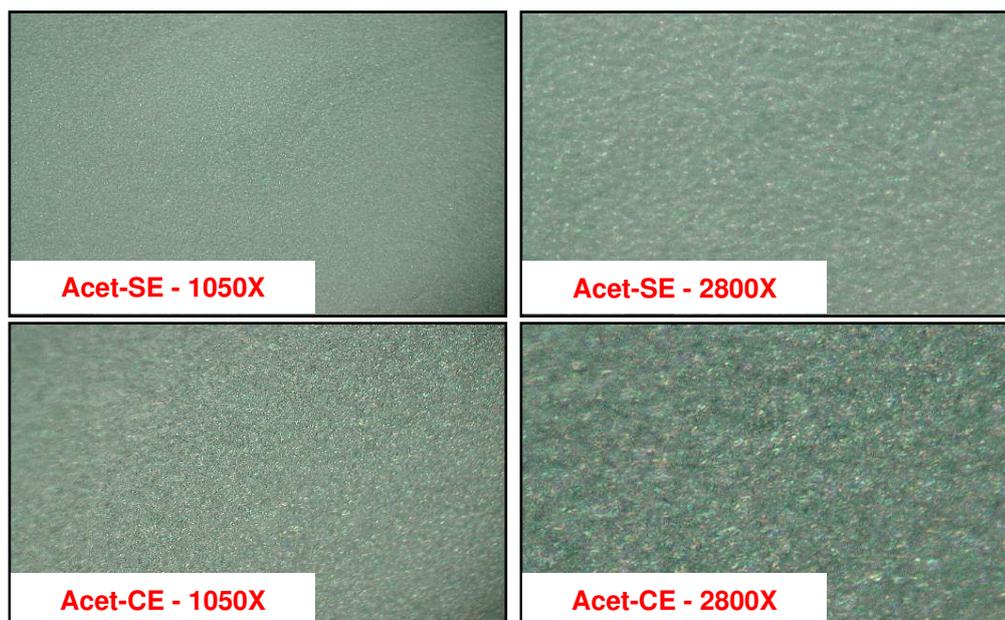


Figura 35 - Microscopia ótica das membranas de acetato de celulose sem e com enzima urease (Fonte: Própria).

### 5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura foram obtidas sobre as membranas de acetato de quitosana e acetato de celulose com e sem imobilização da enzima urease sobre o eletrodo de mesma condição de preparação.

A Figura 36 mostra as micrografias das membranas de quitosana sem e com imobilização da enzima urease sobre o eletrodo com aumentos de 1000X e 3000X, onde é observada, nas imagens das membranas de acetato de quitosana, uma superfície rugosa e uniforme com presença de defeitos volumétricos “fendas ou trincas”, esta morfologia superficial diferentemente do que é observado no MO, mostra que a membrana formada adota a morfologia rugosa da eletrodeposição do antimônio, realizando o recobrimento de poros presentes, o que também indica a membrana forma é pouco espessa.

Nas membranas com a imobilização da enzima urease não se verifica mais a superfície rugosa do antimônio depositado, o que indica a formação de uma membrana mais espessa, entretanto, torna-se mais quebradiça.

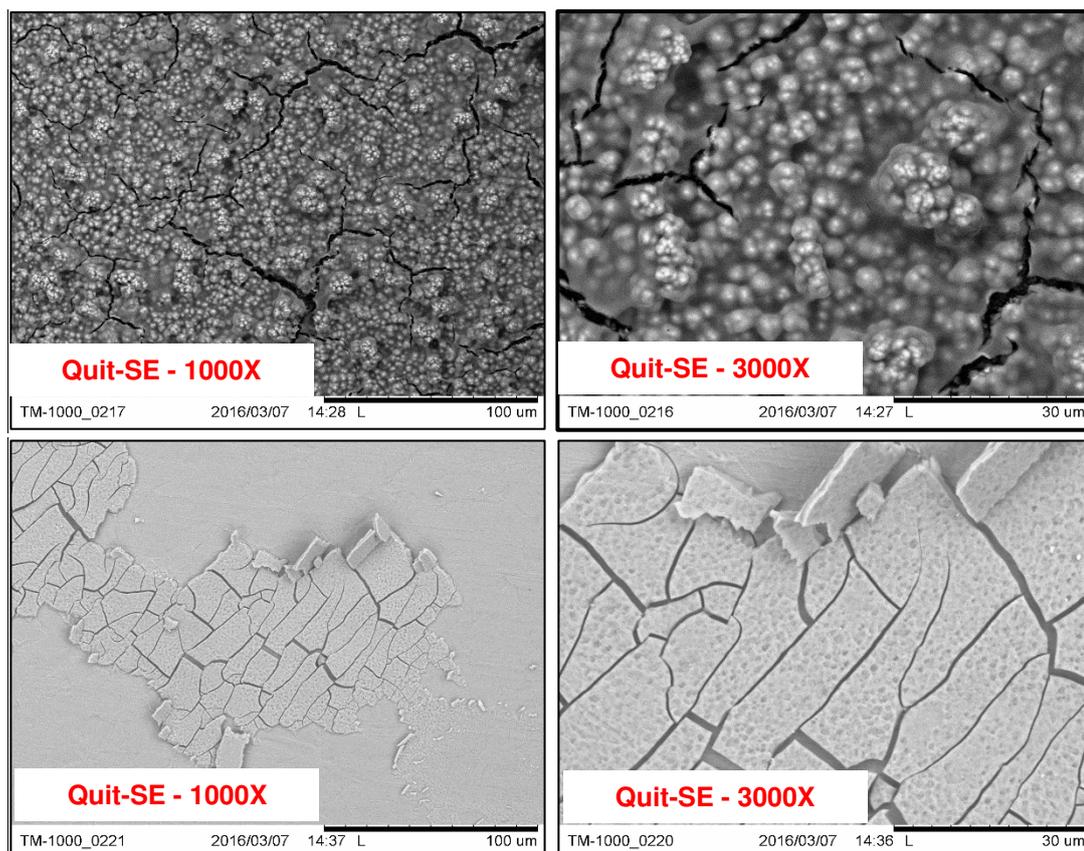


Figura 36 - Membranas de quitosana sem e com imobilização da enzima urease sobre o eletrodo (Fonte: Própria).

A Figura 36 mostra as micrografias das membranas de acetato de celulose sem e com imobilização da enzima urease sobre o eletrodo com aumentos de 3000X e 5000X, onde não se verifica a formação de uma membrana espessa de acetato de celulose sem ou com imobilização de enzima urease sobre a superfície do eletrodo. Esse fato ocorre, possivelmente devido as membranas de acetato de celulose apresentarem uma viscosidade bem menor que a quitosana, formando assim uma membrana mais fina.

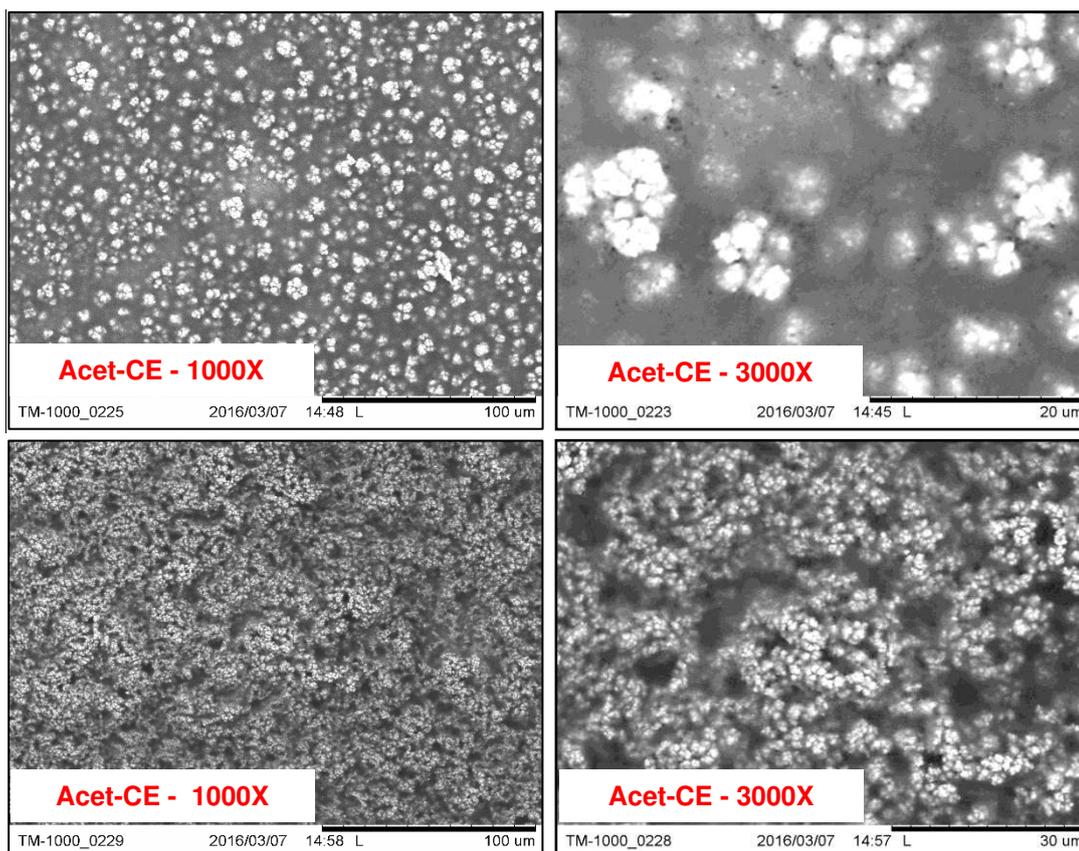


Figura 37 - Membranas de acetato de celulose sem e com imobilização da enzima urease sobe o eletrodo (Fonte: Própria).

Outros fatores relevantes são observados em relação a formação das membranas de acetato de quitosana sobre os eletrodos com deposição de antimônio são observados e que podem influenciar nas propriedades dos biossensores. Primeiramente durante a formação das membranas ocorre uma diminuição do volume e conseqüentemente, provocada pela contração das membranas durante a evaporação do solvente, o que pode leva a formação das trincas nas membranas. Também se verifica que os tipos de grãos formados na eletrodeposição podem favorecer a formação das trincas nas membranas devido as formas mais pontiagudas dos grãos.

Quando observados esses fatores mencionados acima em relação as membranas de acetato de celulose vemos que o efeito do tipo de grãos formados e a evaporação do solvente são menos intensos, o que pode esta relacionado a viscosidade da solução de acetato de celulose que é menor que a de acetato de quitosana e também do tempo de evaporação do solvente.

### 5.3 Caracterizações das Propriedades do Biossensores

Os biossensores produzidos com os eletrodos em fitas de aço inox com eletrodeposição de antimônio nas condições de 0.1, 0.3 e 0.5 amperes com e sem tratamento térmico e revestidos com diferentes camadas de polímeros quitosana ou acetato de celulose foram divididos em quatro grupos, conforme Tabela 5 e avaliados quanto às propriedades de sensibilidade, linearidade e período de estabilidade ou tempo de resposta.

Tabela 5 - Grupos de biossensores avaliados por sensibilidade, faixa de linearidade e período de estabilidade.

<b>Grupo</b>	<b>Descrição</b>
<b>A1</b>	Biossensores sem tratamento térmico com membrana de quitosana.
<b>A2</b>	Biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.
<b>A3</b>	Biossensores com tratamento térmico com membrana de quitosana.
<b>A4</b>	Biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.

#### 4.3.1 Sensibilidade

No desenvolvimento dos biossensores a sensibilidade é um dos parâmetros de otimização essencial para sua aplicação, definida como a alteração na magnitude do sinal de “saída” do biossensor como resposta à alteração da concentração de uma espécie química específica.

O gráfico da Figura 38 mostra a variação da resposta em milivolts em função da concentração de ureia em mmol/L para o biossensor “Sb-0.1A-CT” com 1, 3 e 5 camadas de quitosana. Onde verifica-se que o aumento da concentração da ureia provoca alteração na bioresposta, indicando que o biossensor apresenta sensibilidade à concentração de ureia.

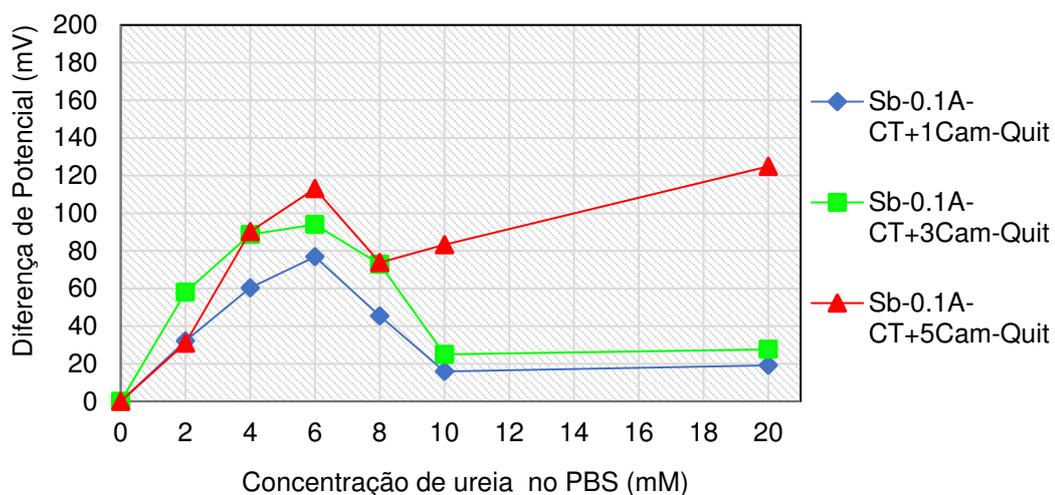


Figura 38 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de quitosana (Fonte: Própria).

Estas alterações de biorespostas são visualizadas nos biossensores com tratamento térmico e sem tratamento térmico em ambos tipos de membrana poliméricas: acetato de quitosana ou de acetato de celulose, como mostra os gráficos das Figura 39, 40 e 41. O anexo I mostra as curvas de sensibilidade para todos os biossensores estudados.

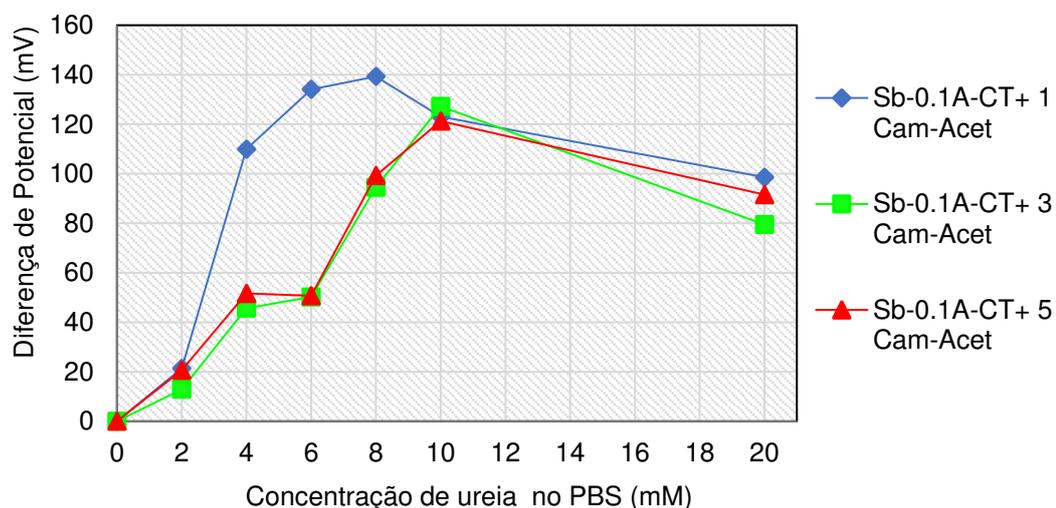


Figura 39 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose (Fonte: Própria).

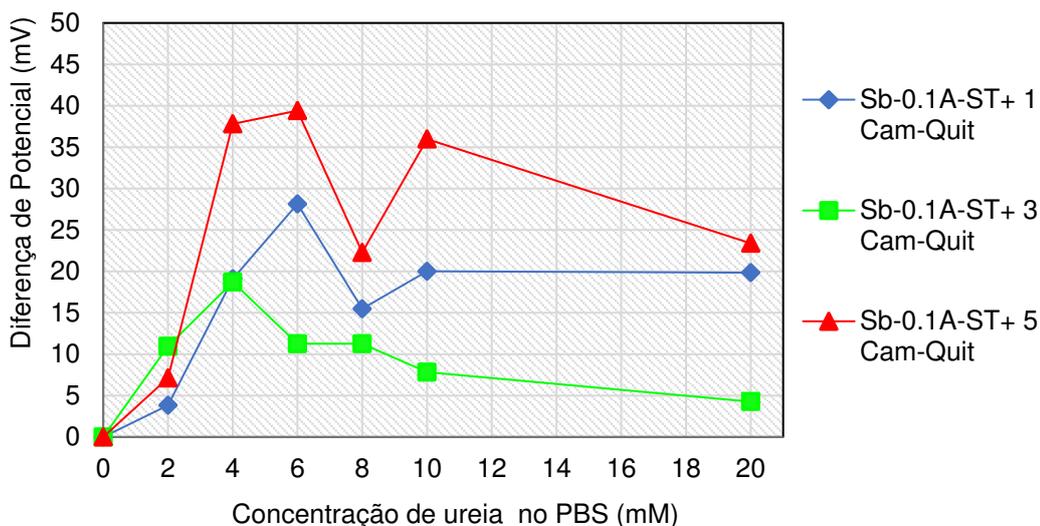


Figura 40 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de quitosana (Fonte: Própria).

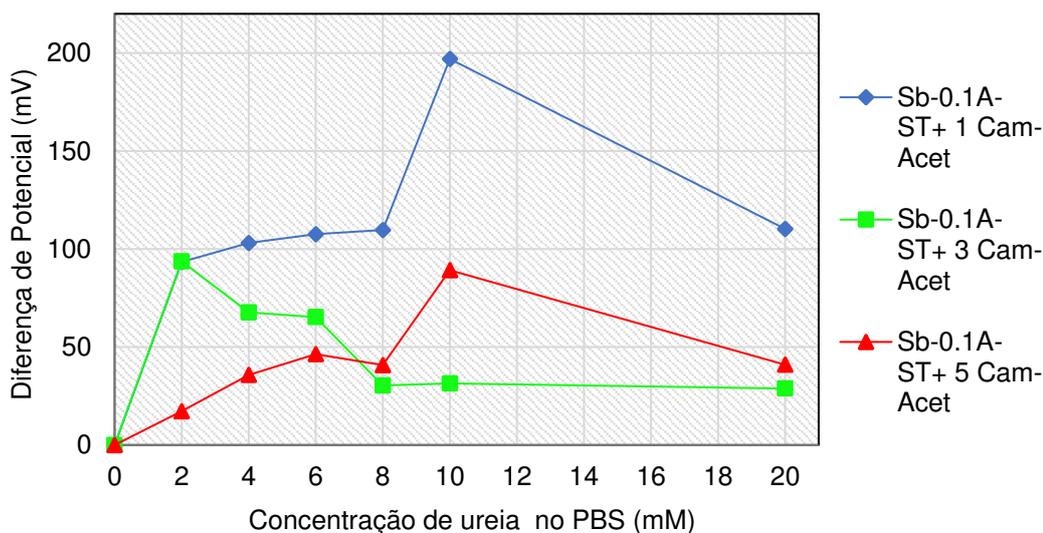


Figura 41 - Curva de sensibilidade do biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico e 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose (Fonte: Própria).

Quanto ao número de camadas poliméricas, observa-se que seu aumento afeta na sensibilidade dos biossensores, pois as camadas poliméricas têm a função de imobilizar a enzima urease que atua na reação catalítica da ureia. A diferença de potencial é gerada entre os eletrodos sensor e a referência, e essa é dependente da concentração de enzima. Desta forma, o aumento do número de camadas do polímero, mesmo que esse aumente a concentração de enzima, pode criar uma barreira de vazios entre as camadas, o que dificulta a interação entre a enzima e a ureia.

Outro fato que pode ter ocorrido foi o lixiviamento da enzima durante a realização das medidas quando eram efetuadas as mudanças dos eletrodos para recipientes com concentração de ureia diferentes.

As membranas poliméricas de acetato de quitosana e acetato de celulose utilizadas na imobilização da enzima urease e aplicada no recobrimento dos eletrodos mostram-se viáveis para utilização como meio de imobilização e recobrimento dos eletrodos, e mantêm a sensibilidade em todas as variações dos biossensores.

Em relação à preparação dos eletrodos, tanto nas condições de eletrodeposição quanto no tratamento térmico, observa-se que os eletrodos afetam nas estabilidades das curvas de sensibilidade, melhorando as propriedades dos biossensores.

Também constatamos que as biorespostas apresentadas pelos biossensores oscilam bastante, sendo influenciadas pelo efeito do número de camadas de membrana poliméricas, pelo tipo de membrana polimérica, pela condição de eletrodeposição e pelo tratamento térmico dos eletrodos, no entanto, as propriedades dos biossensores devem ser avaliadas como um conjunto dessas variações. Pois em um momento o número de camadas da membrana pode melhorar o sinal de bioresposta produzido, mas também pode reduzi-lo, o mesmo princípio é observado para as outras variações estudadas.

#### **4.3.2 Faixa de Linearidade**

Para determinação da faixa de linearidade dos biossensores foram calculadas, nas curvas de bioresposta dos diferentes biossensores, regiões que apresentem boa linearidade e avaliado quais biossensores apresentaram os melhores coeficientes de correlação. O gráfico da Figura 42 mostra a curva de bioresposta com as linhas de linearidade em 3 diferentes regiões da curva, para o biossensor de antimônio "Sb-0.1A-CT + 1 Cam-Quit". Observa-se que a melhor sensibilidade ocorre na faixa de 0 a 6 mmol/L de ureia e nessa faixa o coeficiente de correlação é exatamente 0,976. Segundo Melo (2008), coeficiente de correlação superior a 0,9 indica uma boa linearidade do sistema e, portanto, sua elevada sensibilidade.

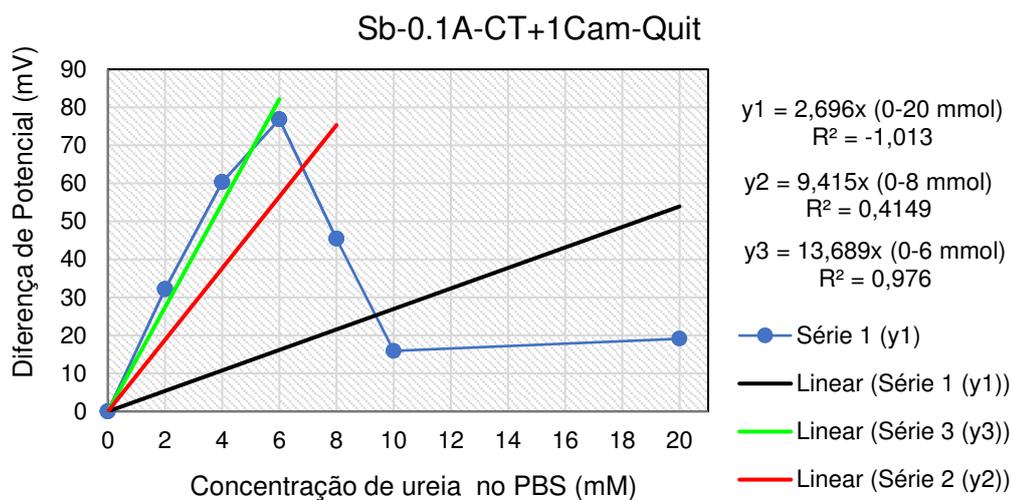


Figura 42 - Curva de bioresposta com as linhas de linearidade do biossensor "Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria).

As faixas de linearidade dos biorespostas foram calculados para cada biossensor determinando a faixa de melhor sensibilidade. O anexo II mostra as curvas de bioresposta com as linhas de linearidade para diferentes biossensores produzidos e as Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram as melhores faixas de linearidade para os biossensores.

#### 4.3.3 Período de Estabilidade

Para avaliação do período de estabilidade ou tempo de resposta dos biossensores, estes foram submetidos a medições de bioresposta em termos de diferença de potencial. Na Figura 43, observa-se a curva do período de estabilidade para um dos biossensores o "Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit", onde verifica-se que a bioresposta manteve-se com pequena variação em todas de concentração de ureia quando atingiu aproximadamente 200s, sendo este o período de estabilidade do biossensor. Evidencia-se também que, para algumas concentrações, o tempo de resposta pode ser menor, como no caso da solução de PBS com 10mmol e 20mmol de ureia que em aproximadamente 100s já se mostram constantes os valores de bioresposta. Este fato pode ser devido, a alta concentração de ureia na solução de PBS. O anexo III mostra as curvas de período de estabilidade para todas as variações

dos biossensores em estudo e as Tabelas 6, 7, 8 e 9 mostram os valores dos períodos e faixa de estabilidade para os diferentes biossensores.

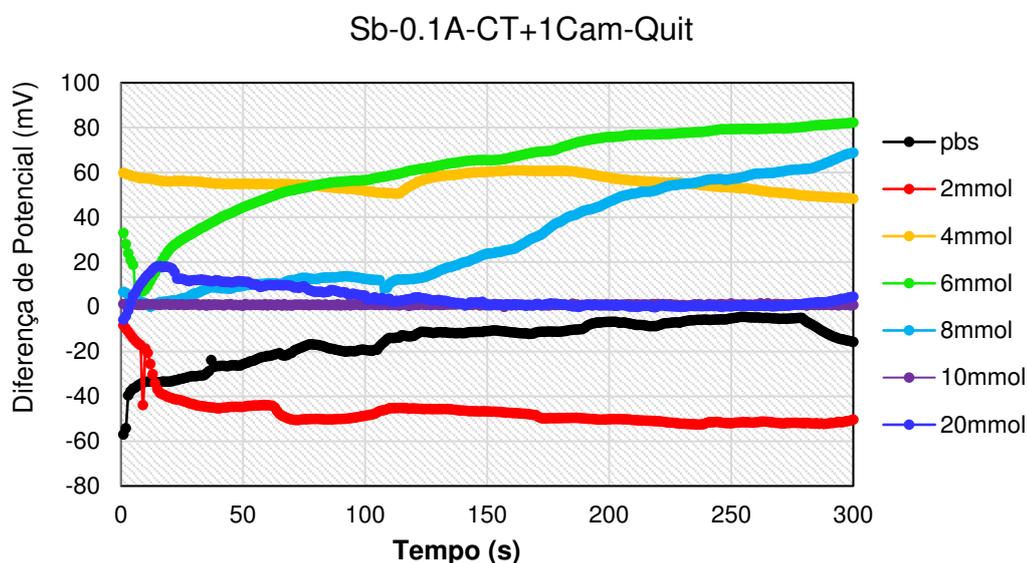


Figura 43 - Curva de período de estabilidade para o biossensor Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit (Fonte: Própria).

Análise comparativa das propriedades dos biossensores foram estudadas para avaliar quais obtiveram melhores resultados. Na Tabela 6, observam-se os resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana, onde constatamos que o número de camadas da membrana polimérica para um biossensor preparado com mesmas condições de eletrodeposição seja a 0.1, 0.3 e 0.5 amperes, alterou o tempo de repostas e a faixa de linearidade dos biossensores, contudo, não é uma variação grande relevância. Outra alteração que podemos evidenciar é a pequeno aumento do potencial na região linear e da sensibilidade que é melhorado pelo aumento do número de camadas poliméricas, com exceção do biossensor “Sb-0.3A-ST+3Cam-Quit” que pode esta associado a defeitos da formação da membrana.

Com relação as condições de eletrodeposição do antimônio para formação dos eletrodos dos biossensores em biossensores com mesmo número de camadas

poliméricas, verificamos uma melhoria das propriedades similar a apresenta pelo aumento da corrente utilizada para eletrodeposição do antimônio.

Avaliando-se o número de camadas poliméricas e a condição de eletrodeposição o biossensor “Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit” obteve o melhor conjunto de propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana, com tempo de resposta ocorrendo em 100s e se mantendo estável até o fim da análise, com uma faixa de linearidade de 0 a 6 mmol/L de ureia em PBS e sensibilidade de 13,56 mV.

Tabela 6 - Resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana.

Biossensor	Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	Varição de Potencial na região Linear (mV)	Faixa de Linearidade e sensibilidade (mmol/L)	Equação Linear e Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
<b>Sb-0.1A-ST+1Cam-Quit</b>	50	28	0 - 6	Y = 4,52X 0,94
<b>Sb-0.1A-ST+3Cam-Quit</b>	150	18	0 - 4	Y = 4,84X 0,99
<b>Sb-0.1A-ST+5Cam-Quit</b>	100	39	0 - 6	Y = 7,18X 0,88
<b>Sb-0.3A-ST+1Cam-Quit</b>	50	41	0 - 6	Y = 7,94X 0,74
<b>Sb-0.3A-ST+3Cam-Quit</b>	150	8	0 - 8	Y = 0,98X 0,98
<b>Sb-0.3A-ST+5Cam-Quit</b>	100	43	0 - 4	Y = 12,20X 0,88
<b>Sb-0.5A-ST+1Cam-Quit</b>	150	46	0 - 4	Y = 10,27X 0,88
<b>Sb-0.5A-ST+3Cam-Quit</b>	100	46	0 - 6	Y = 8,06X 0,88
<b>Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit</b>	150	80	0 - 6	Y = 13,56X 0,98

Os resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de celulose são apresentados na Tabela 7, onde constatamos que o número de camadas da membrana polimérica para um biossensor preparado com mesmas condições de eletrodeposição apresentou respostas diferentes, ou seja, para 0.1 ampere ocorre uma diminuição do tempo de repostas, a faixa de linearidade dos biossensores, variação do potencial na região linear e da sensibilidade pelo aumento do número de camadas poliméricas, para 0.3 amperes estes valores não se

apresentam lineares com o aumento do número de camada, já para 0.5 amperes ocorre uma diminuição desses valores com o aumento do número de camadas poliméricas.

Com relação as condições de eletrodeposição do antimônio para formação dos eletrodos dos biossensores em biossensores com mesmo número de camadas poliméricas, verificamos uma diminuição das propriedades tempo de repostas, a faixa de linearidade dos biossensores, variação do potencial na região linear e da sensibilidade com o aumento da corrente elétrica utilizada na eletrodeposição do antimônio. Esta alteração é visualizada para biossensores com 1 e 3 camadas, já para 5 camadas estes valores não são lineares com o aumento da corrente elétrica.

Para os biossensores com membrana de acetato de celulose, avaliando-se o número de camadas poliméricas e a condição de eletrodeposição o biossensor “Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet” obteve o melhor conjunto de propriedades: com tempo de resposta ocorre em 200s e se mantém estáveis até o fim da análise, faixa de linearidade de 0 a 10 mmol/L de ureia em PBS e sensibilidade de 14,10 mV.

Tabela 7 - Resultados das propriedades dos biossensores sem tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.

Biossensor	Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	Varição de Potencial na região Linear (mV)	Faixa de Linearidade e sensibilidade (mmol/L)	Equação Linear e Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
Sb-0.1A-ST+1Cam-Acet	175	200	0 - 10	Y = 18,60X 0,71
Sb-0.1A-ST+3Cam-Acet	150	120	0 - 6	Y = 33,42X 0,89
Sb-0.1A-ST+5Cam-Acet	50	50	0 - 6	Y = 8,14X 0,99
Sb-0.3A-ST+1Cam-Acet	100	110	0 - 10	Y = 12,18X 0,89
Sb-0.3A-ST+3Cam-Acet	100	40	0 - 6	Y = 5,86X 0,97
Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet	150	140	0 - 10	Y = 14,10X 0,91
Sb-0.5A-ST+1Cam-Acet	100	30	0 - 4	Y = 7,97X 0,84
Sb-0.5A-ST+3Cam-Acet	150	26	0 - 6	Y = 4,21X 0,93
Sb-0.5A-ST+5Cam-Acet	100	55	0 - 6	Y = 7,91X 0,92

Nos resultados apresentados nas tabelas 6 e 7 os biossensores foram preparados sem o tratamento térmico, ou seja, segundo os resultados de difração de raios X temos o antimônio metálico eletrodepositado na fita de aço inox, onde verificamos que para as membranas poliméricas de acetato de quitosana ocorre uma melhoria das propriedades tanto com o aumento do número de camadas da membrana como pelo modificação do crescimento do grãos eletrodepositado na fita de aumento da corrente elétrica utilizada na eletrodeposição. Já para as membranas poliméricas de acetato de celulose ocorre o inverso, pois há uma redução das respostas do biossensor com o aumento do número de camadas poliméricas e pela modificação dos grãos formados com o aumento da corrente elétrica para eletrodeposição.

No entanto observa-se ao analisar todos os biossensores apresentados nas tabelas 6 e 7, que os biossensores produzidos com membranas de acetato de celulose possuem uma melhor faixa de linearidade, maior variação de potencial e sensibilidade, este fato pode esta relacionado com a espessura formada da membrana que no caso do acetato de celulose é menos espessa, o que pode favorecer a um maior contato da solução de ureia com a urease produzindo uma maior quantidade de reações catalíticas da ureia com a urease gerando assim um maior potencial elétrico.

Os resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana, Tabela 8, primeiramente em relação ao número de camadas da membrana polimérica de acetato de quitosana para um biossensor preparado com mesmas condições de eletrodeposição podemos observa que os valores do período de estabilidade e faixa de linearidade sofrem uma pequena variação, e os valores de variação de potencial na região de linearidade e sensibilidade são melhorados com o aumento do número de camadas poliméricas para as condições de eletrodeposição de 0.1 e 0.3 amperes. Para os biossensores produzidos com eletrodeposição de 0.5 amperes verificamos uma diminuição das respostas de período de estabilidade e sensibilidade, uma melhoria do valor da faixa de linearidade e os valores de variação de potencial na faixa linear sofre pouca alteração com o aumento do número de camadas poliméricas.

Avaliando as propriedades desses biossensores com relação a condição de eletrodeposição do antimônio nas fitas de aço inoxidável AISI 301 com o mesmo número de camadas de membranas poliméricas verifica-se que um aumento dos

valores de período de estabilidade, variação de potencial na região linear, sensibilidade e a região de linearidade sofre pequenas variações diminuindo e aumentando com a condição 0.1, 0.3 e 0.5 respectivamente para 1 e 3 camadas. Para 5 camadas o período de estabilidade diminui, a faixa de linearidade mante-se estável, a sensibilidade diminui e a variação de potencial aumenta.

Com base nas análises dos resultados dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana, observamos que o biossensor “Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit” obteve o melhor conjunto de propriedades: com tempo de resposta ocorre em 200s e se mantém estável até o fim, faixa de linearidade de 0 a 6 mmol/L de ureia em PBS e sensibilidade de 27,72 mV.

Tabela 8 - Resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de quitosana.

Biossensor	Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	Varição de Potencial na região Linear (mV)	Faixa de Linearidade e sensibilidade (mmol/L)	Equação Linear e Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
Sb-0.1A-CT+1Cam-Quit	200	75	0 – 6	Y = 9,42X 0,98
Sb-0.1A-CT+3Cam-Quit	75	90	0 – 6	Y = 18,48X 0,83
Sb-0.1A-CT+5Cam-Quit	100	120	0 – 6	Y = 19,67X 0,97
Sb-0.3A-CT+1Cam-Quit	75	20	0 – 6	Y = 2,62X 0,78
Sb-0.3A-CT+3Cam-Quit	100	50	0 – 8	Y = 8,22X 0,97
Sb-0.3A-CT+5Cam-Quit	200	77	0 – 4	Y = 21,97X 0,84
<b>Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit</b>	<b>200</b>	<b>160</b>	<b>0 – 6</b>	<b>Y = 27,72X 0,87</b>
Sb-0.5A-CT+3Cam-Quit	100	120	0 – 6	Y = 18,52X 0,94
Sb-0.5A-CT+5Cam-Quit	75	140	0 – 10	Y = 13,79X 0,94

A Tabela 9 mostra os resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de celulose, em relação ao aumento do número de camadas para uma mesma condição de eletrodeposição observa-se: para 0.1 amperes de eletrodeposição que os valores de período de estabilidade, variação de potencial na região linear, faixa de linearidade sofrem alterações

pequenas e a sensibilidade diminui com o número de camadas; para 0.3 amperes o período de estabilidade diminui enquanto a sensibilidade aumenta, para os valores de faixa de linearidade e variação do potencial verifica-se aumentos destes valores e para 0.5 amperes uma diminuição dos valores de variação de potencial e sensibilidade, a faixa de linearidade manteve-se constante e o período de estabilidade aumentou.

Para as propriedades desses biossensores com relação a condição de eletrodeposição do antimônio nas fitas de aço inoxidável AISI 301 com o mesmo número de camadas de membranas poliméricas verifica-se para com que os valores de período de estabilidade e sensibilidade aumentam, e a variação de potencial e faixa de linearidade não sofrem grandes alterações para 1 camada. Para 3 e 5 camadas o período de estabilidade diminui, a variação de potencial, faixa de linearidade e a sensibilidade aumenta. Para os biossensores com membrana de acetato de celulose, avaliando-se o número de camadas poliméricas e a condição de eletrodeposição o biossensor “Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet” obteve o melhor conjunto de propriedades: com tempo de resposta ocorre em 75s e se mantém estáveis até o fim da análise, faixa de linearidade de 0 a 20 mmol/L de ureia em PBS e sensibilidade 14,64 mV.

Tabela 9 - Resultados das propriedades dos biossensores com tratamento térmico com membrana de acetato de celulose.

Biossensor	Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	Varição de Potencial na região Linear (mV)	Faixa de Linearidade e sensibilidade (mmol/L)	Equação Linear e Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
Sb-0.1A-CT+1Cam-Acet	150	140	0 - 8	Y = 20,01X 0,89
Sb-0.1A-CT+3Cam-Acet	100	94	0 - 8	Y = 11,54X 0,95
Sb-0.1A-CT+5Cam-Acet	100	120	0 - 10	Y = 11,63X 0,96
Sb-0.3A-CT+1Cam-Acet	100	38	0 - 4	Y = 8,14X 0,99
Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet	75	280	0 - 20	Y = 14,64X 0,97
Sb-0.3A-CT+5Cam-Acet	75	180	0 - 6	Y = 26,84X 0,90
Sb-0.5A-CT+1Cam-Acet	75	170	0 - 6	Y = 27,03X 0,82
Sb-0.5A-CT+3Cam-Acet	75	115	0 - 6	Y = 22,28X 0,90
Sb-0.5A-CT+5Cam-Acet	200	100	0 - 6	Y = 17,81X 0,90

Nos resultados apresentados nas tabelas 8 e 9 os biossensores foram preparados com o tratamento térmico que segundo os resultados de difração de raios X, há a presença do óxido de antimônio eletrodepositado na fita de aço inox, onde observou-se em ambos casos, que os melhores resultados das propriedades são visualizados nos biossensores que tiveram o processo de eletrodeposição de 0.3 e 0.5 amperes. Neste caso, foram obtidas uma morfologia superficial uniforme e menores tamanhos de cristalitos.

Boris e colaboradores (2011), em pesquisa de biossensor potenciométrico enzimático, obtiveram tempo de resposta de 2 minutos. Gupta e colaboradores mostraram em diversos biossensores com polímeros condutores para ureia, uma faixa de linearidade entre 2 e 11 M.

Os biossensores apresentados nas tabelas 7 e 8 indicam que as membranas de quitosana e de acetato de celulose apresentaram resultados similares para faixa de linearidade e sensibilidade, no entanto as variações de potencial foram mais intensas no biossensor com membrana de acetato de celulose.

Os estudos mostram que a modificação do antimônio metálico para o óxido com o tratamento térmico utilizado nos eletrodos dos biossensores melhoram significativamente as propriedades do biossensor.

Após as caracterizações das propriedades dos biossensores quanto a sensibilidade, faixa de linearidade e período de estabilidade foram selecionados quatro biossensores um de cada grupo que apresentaram as melhores propriedades, segundo a Quadro 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, onde foram definidos valores de prioridades para cada propriedade avaliada e realizado os testes de seletividade, repetibilidade e reprodutibilidade.

Quadro 1 - Valores de prioridades definidos para as propriedades dos biossensores.

Propriedade dos Biossensores	Valor de prioridade
<b>Sensibilidade</b>	Trata-se da propriedade mais importante entre as 3 aqui apresentado, por indicar a bioresposta em relação a concentração do analito, quanto maior o seu valor melhor a resposta em relação ao analito.
<b>Faixa de Linearidade</b>	Segunda propriedade em valor de prioridade pois indica a faixa de trabalho que o biossensor pode trabalhar com confiança.
<b>Período de Estabilidade</b>	Propriedade menos relevante entre as 3 para o estudo pois os valores neste estudo não ultrapassam os 3 minutos para ter uma resposta estável.

A Tabela 10 mostra os quatro biossensores selecionados para realização das caracterizações quanto a seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade.

Tabela 10 - Biossensores selecionados para realização das caracterizações de seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade

Biossensor	Período de estabilidade ou tempo de resposta (s)	Variação de Potencial na região Linear (mV)	Faixa de Linearidade e sensibilidade (mmol/L)	Equação Linear e Coeficiente de Correlação (R <sup>2</sup> )
<b>Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet</b>	75	280	0 – 20	Y = 14,64X 0,97
<b>Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit</b>	200	160	0 – 6	Y = 27,72X 0,87
<b>Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet</b>	200	140	0 – 10	Y = 14,10X 0,91
<b>Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit</b>	150	80	0 -6	Y = 13,56X 0,98

#### 4.3.4 Seletividade

No desenvolvimento dos biossensores a seletividade é um dos parâmetros de otimização essencial para sua aplicação, pois um biossensor seletivo responde unicamente a alterações na concentração do analito alvo não sendo influenciado pela presença de outras espécies químicas em solução.

O gráfico da Figura 44, mostra a variação da resposta em milivolts em função da concentração de ureia em mmol/L para o biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" com e sem a presença da espécie química "creatinina". Verifica-se que a presença da espécie química creatinina não altera significativamente a bioresposta do biossensor a concentração de ureia, indicando que o biossensor é seletivo.

Esta seletividade também é foi confirmada nos biossensores "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit", "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" e "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit", com o mínimo de variação como pode ser observado nos gráficos das Figura 45, 45 e 46.

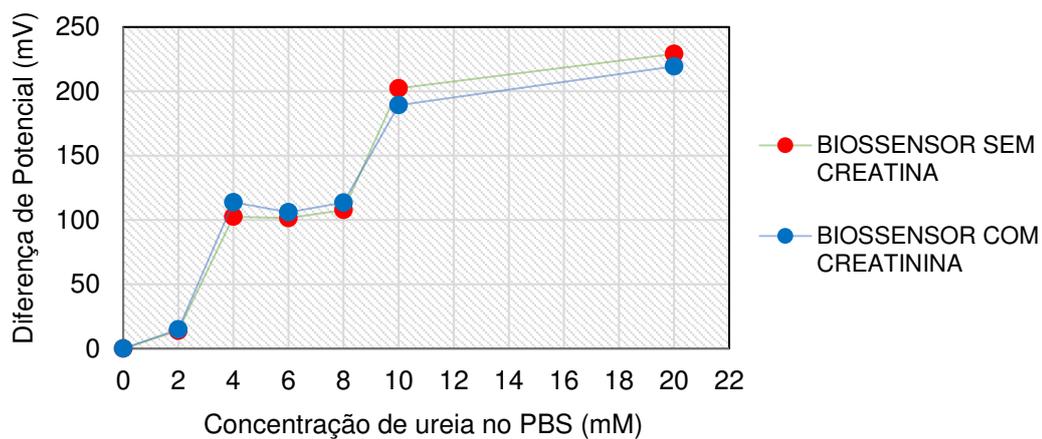


Figura 44 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria).

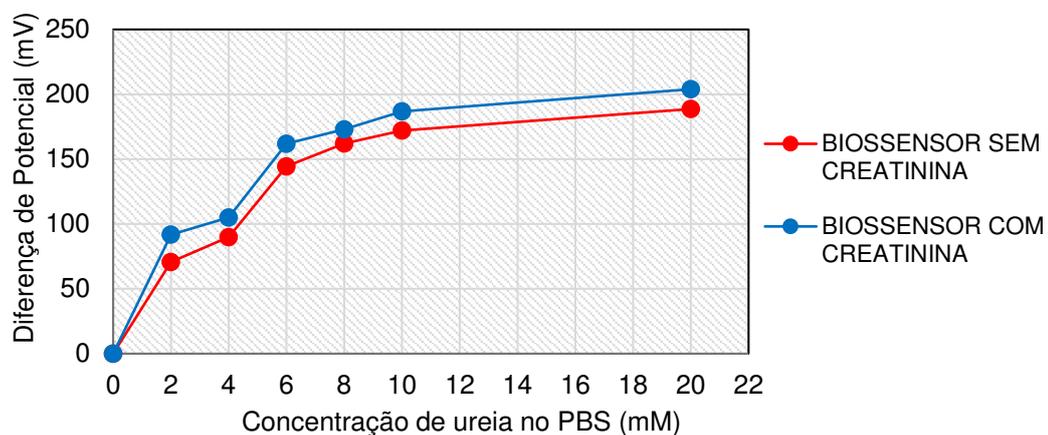


Figura 45 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria).

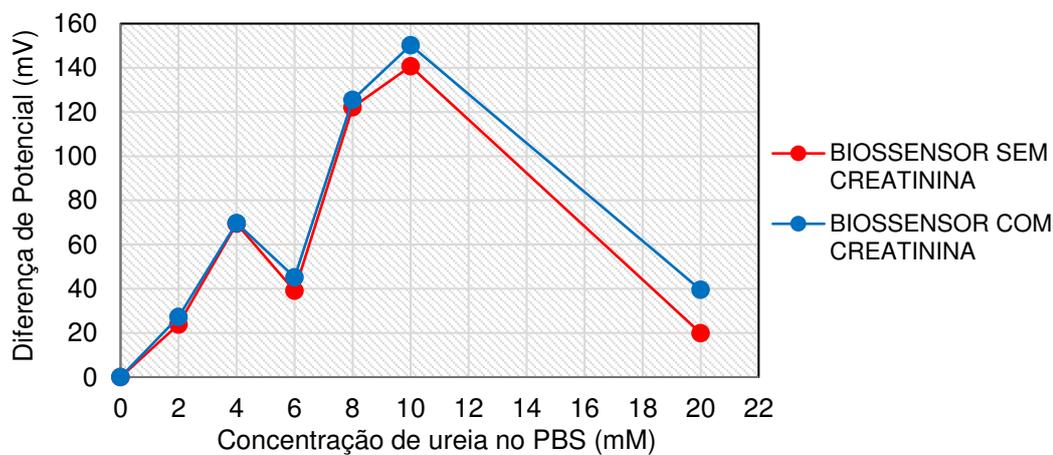


Figura 46 - Curva de seletividade do biossensor "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" (Fonte: Própria).

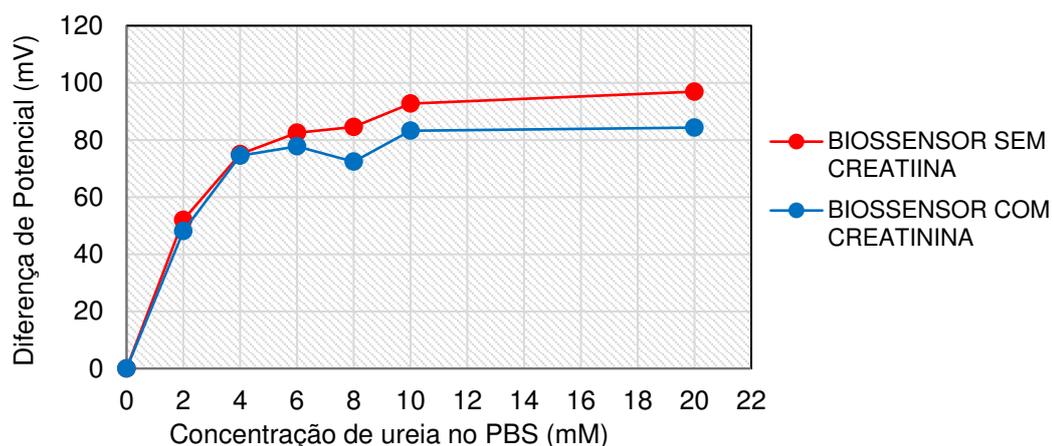


Figura 47 - Curva de seletividade do biossensor " Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit " (Fonte: Própria).

#### 4.3.5 Reprodutibilidade

Os quatro biossensores que apresentaram melhores propriedades quanto a seletividade, faixa de linearidade e período de estabilidade foram avaliados quanto a reprodutibilidade para verificar se os biossensores preparação nas mesmas condições, parâmetro e de análises apresentarem respostas similares.

O gráfico da Figura 48, mostra a variação da resposta em milivolts em função da concentração de ureia em mmol/L para quatro biossensores produzidos e analisados nas mesmas condições do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" definidos como: BIOSSENSOR 01, BIOSSENSOR 02, BIOSSENSOR 03 e BIOSSENSOR 04. As curvas de biorespostas apresentadas para cada um dos biossensores sofrem pequenas alterações entre elas, indicando uma boa reprodutibilidade do biossensor.

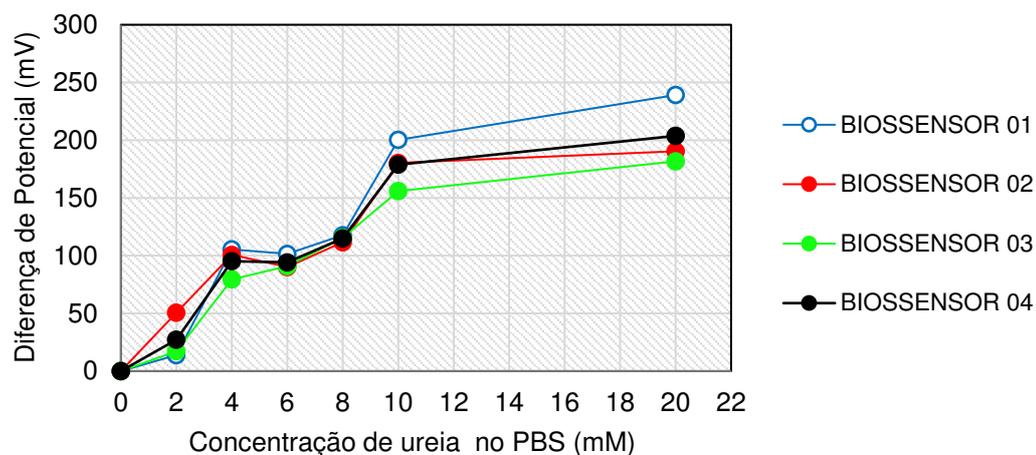


Figura 48 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria).

Esse perfil também foi verificado para os biossensores "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit", "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" e "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit", como pode ser nas curvas de biorespostas nas Figura 49, 49 e 50.

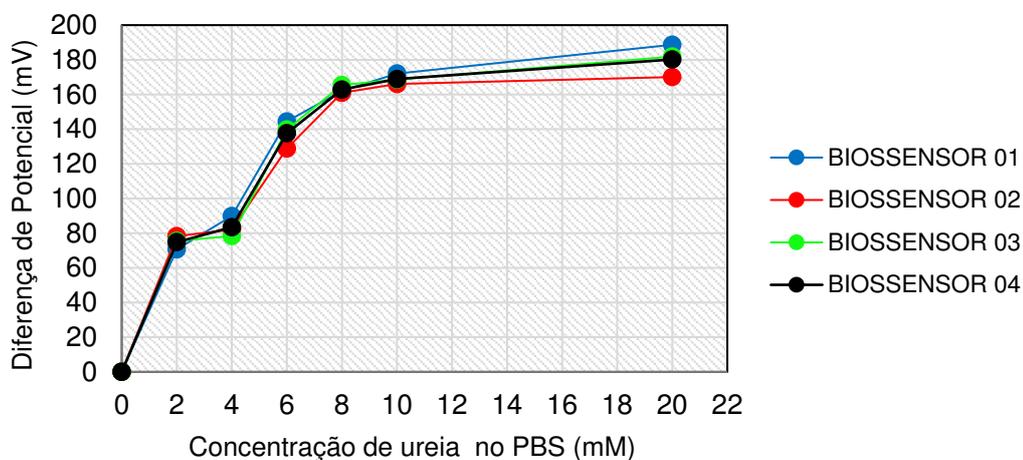


Figura 49 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Acet" (Fonte: Própria).

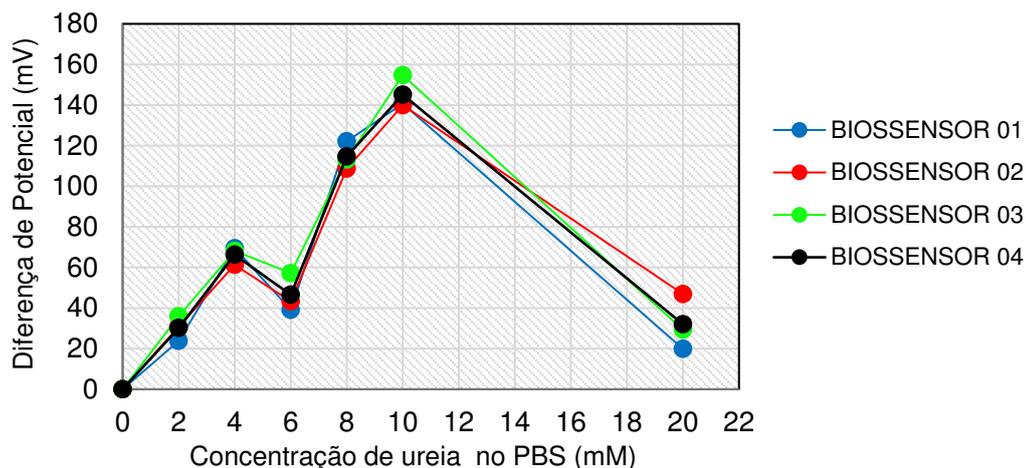


Figura 50 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" (Fonte: Própria).

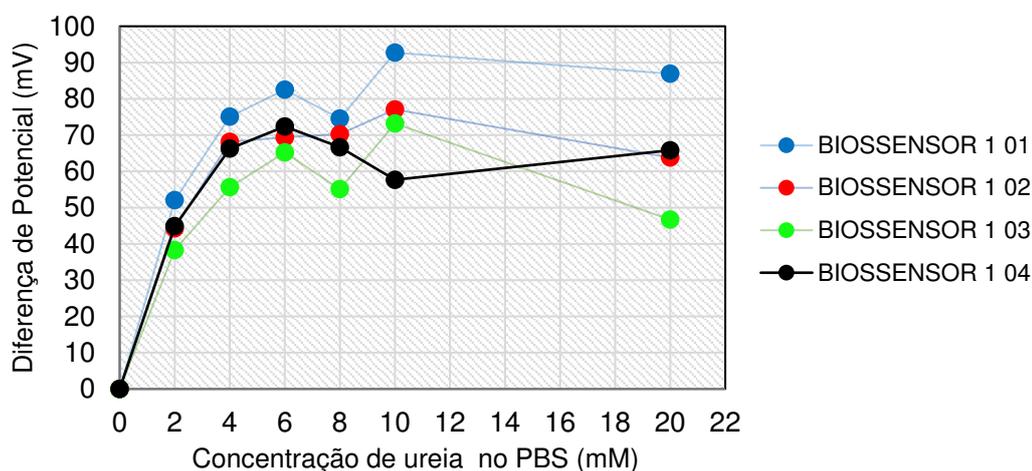


Figura 51 - Curva de bioresposta da reprodutibilidade do biossensor "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit" (Fonte: Própria).

#### 4.3.6 Repetibilidade

Foram avaliados nos quatro biossensores a propriedade de repetibilidade para verificar se o biossensor apresentar respostas similares para medidas com um mesmo biossensor. O gráfico da Figura 52 mostra a variação da resposta em milivolts em função da concentração de ureia em mmol/L para o biossensores "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet", foram realizadas 3 medições em toda faixa de concentração para o biossensor, onde observa-se que as 2 primeiras medições os valores de bioresposta em toda faixa de concentração mostrou-se com pequena variação. Na terceira medição verifica-se que a variação da bioresposta começa a ficar mais intensa.

Esse perfil também foi verificado para os biossensores “Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit”, “Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet” e “Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit”, como pode ser nas curvas de biorespostas nas Figura 53, 53 e 54.

Isso pode ter ocorrido devido ao procedimento utilizado para nas medições, que é por imersão em solução de PBS com as diferentes faixas de concentração (2, 4, 6, 8, 10 e 20mmol) cada vez que se muda a solução para realizar nova medição, isso pode promover o lixiviamento da enzima urease, diminuindo assim o número de vez que pode ser repetido o teste de forma estável.

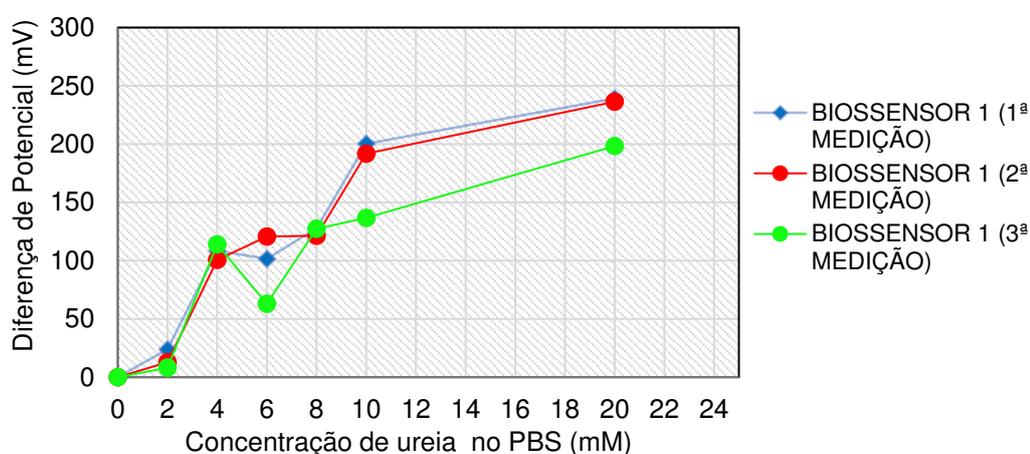


Figura 52 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.3A-CT+3Cam-Acet" (Fonte: Própria).

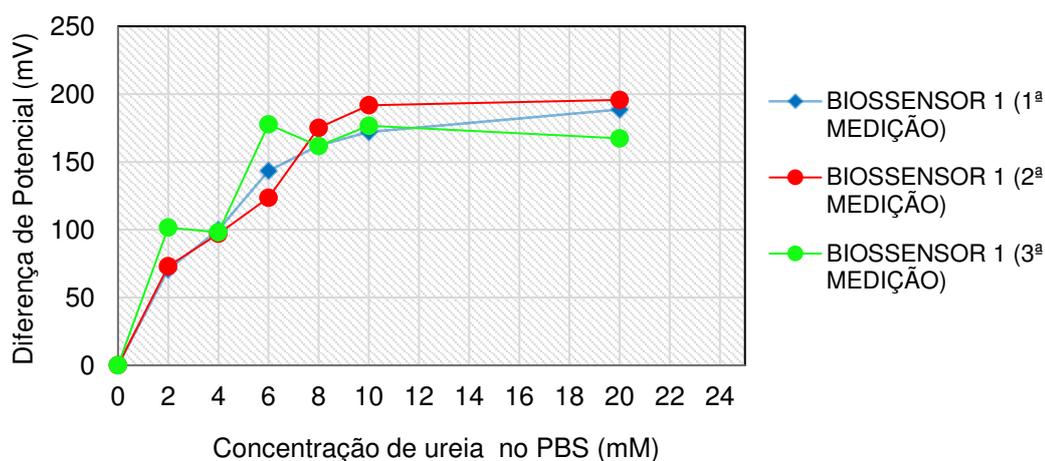


Figura 53 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.5A-CT+1Cam-Quit" (Fonte: Própria).

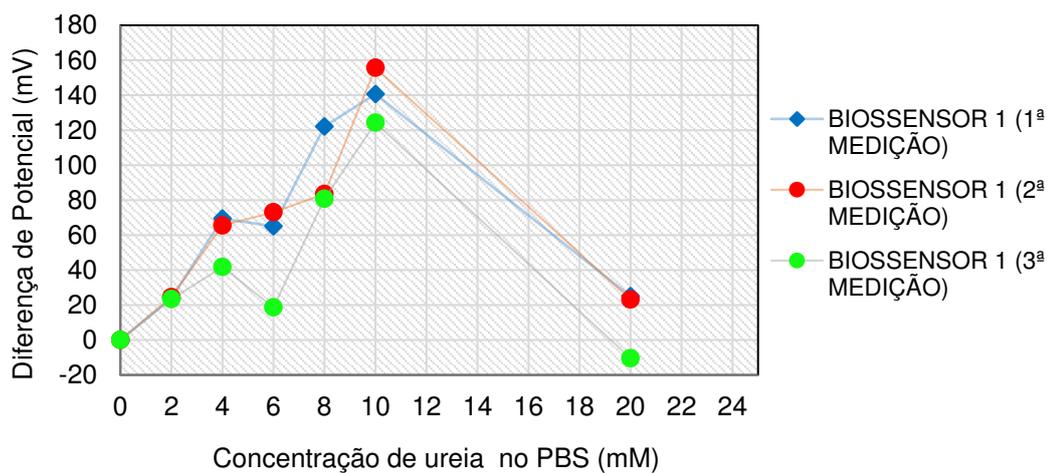


Figura 54 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.3A-ST+5Cam-Acet" (Fonte: Própria).

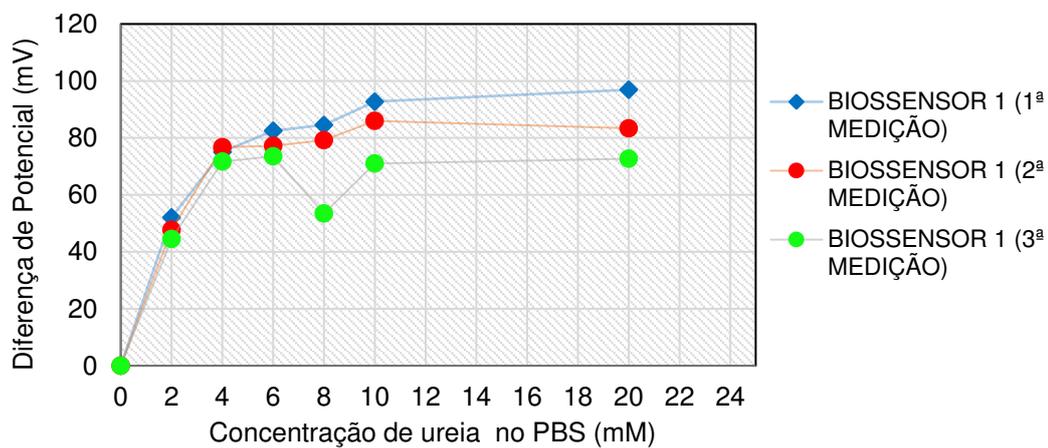


Figura 55 - Curva de bioresposta da repetibilidade do biossensor "Sb-0.5A-ST+5Cam-Quit" (Fonte: Própria).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados de difração de raios X, juntamente com o refinamento pelo método de Rietveld utilizando o programa GSAS II mostrou que fase cristalina formada nos eletrodos em todas as condições eletrodeposição sem tratamento térmico foi o antimônio metálico, não sendo possível verificar a formação da camada oxidada.

As imagens de microscopias óticas das fitas de aço inox com eletrodeposição de antimônio preparadas nas diferentes condições sem tratamento térmico mostraram que o aumento do potencial diminui as falhas de deposição de antimônio na superfície do aço inox, deixando o recobrimento mais uniforme. Nas fitas com diferentes condições de eletrodeposição e com tratamento térmico, visualiza-se uma modificação da morfologia superficial tornando-a mais rugosa.

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura dos eletrodos, sem e com tratamento térmico, observam-se uma superfície rugosa e porosa. No entanto, os crescimentos das estruturas ocorrem de forma distinta: colunar naquelas sem tratamento térmico e granular naquelas com tratamento térmico.

Nos eletrodos, após o tratamento térmico verificou-se a formação de fases do óxido de antimônio:  $Sb_2O_5$  (cúbica - grupo espacial Fd-3m) e  $Sb_2O_3$  (ortorrômbico – grupo espacial Pc-cn e cúbica – grupo espacial Fd-3m) de acordo com a condição de eletrodeposição.

Os tamanhos de cristalitos formados variam de acordo com o processo de eletrodeposição empregado na preparação do eletrodo diminuindo o tamanho com o aumento da corrente elétrica, na maioria dos casos.

As imagens de microscopia ótica das membranas de acetato de quitosana e de acetato de celulose, com e sem enzima urease, não mostram diferenças morfológicas. Em ambos os casos, não é possível verificar a enzima imobilizada o que indica uma boa dissolução das mesmas durante a preparação das membranas.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura das membranas de acetato de quitosana e acetato de celulose, com e sem enzima urease, após evaporação do solvente nos eletrodos, mostram que as membranas de acetato de quitosana criaram um recobrimento mais espesso sobre o eletrodo e esse efeito é mais intenso quando se tem a enzima imobilizada. Nas membranas de acetato de celulose o recobrimento forma uma camada mais fina sobre o eletrodo.

Todos as variações dos biossensores estudados mostram sensibilidade na faixa de concentração de ureia avaliada, apresentando também um período de estabilidade na maioria dos casos inferior a 120 segundos.

Os resultados das propriedades dos biossensores mostram que as membranas de acetato de quitosana e de acetato de celulose apresentaram resultados similares para faixa de linearidade e sensibilidade. No entanto, as variações de potencial foram mais intensas nos biossensores com membrana de acetato de celulose, indicando que ambas se apresentam viáveis para utilização como meio de imobilização. As membranas de acetato de celulose apresentam uma maior estabilidade nas respostas de sensibilidade em todos as variações dos biossensores.

Os estudos mostram que a modificação do antimônio metálico para o óxido com o tratamento térmico utilizado nos eletrodos dos biossensores melhoram significativamente as propriedades do biossensor.

Os biossensores selecionados de cada grupo para caracterização das propriedades de seletividade, reprodutibilidade e repetibilidade, mostraram-se seletivos sofrendo mínima alteração na presença da espécie química creatinina.

As reproduções dos quatro biossensores selecionados para a caracterização de reprodutibilidade, verificou-se um mínima variação de biorespostas, logo é possível reproduzi-los mantendo as suas propriedades de sensibilidade.

Quanto a repetibilidade temos que os quatro biossensores selecionados para essa caracterização começam a sofrer variações de bioresposta a partir da terceira medição, entretanto, devido a metodologia empregada para medições das biorespostas o número de repetibilidade pode ser muito maior.

Por fim conclui-se que o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos enzimáticos com eletrodos produzidos por eletrodeposição de antimônio em fitas de aço inox e utilização de membranas poliméricas de acetato de quitosana e acetato de celulose são viáveis e apresentam boas propriedades dos biossensores.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar a modificação das membranas de quitosana e acetato de celulose por meio da utilização de um plastificante e de um reticulante para melhorar as condições de imobilização e recobrimento dos eletrodos.
- ✓ Avaliar o efeito do formato dos eletrodos buscando a miniaturização e outras formas geométricas, assim como a utilização de eletrodos em serie e ou paralelos para melhor as biorespostas.
- ✓ Realizar teste clínicos com os biossensores com os melhores propriedades e comparar os resultados da análise clínica com os obtidos com os biossensores.
- ✓ Avaliar a utilização de outros suportes para eletrodeposição do antimônio na preparação do eletrodo.
- ✓ Utilizar concentração de enzima urease imobilizadas superior e inferior a utilizada na pesquisa que foi de 10 mg/mL no biossensor com melhores propriedades em membrana de quitosana e de acetato de celulose.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abensur, H. (2011). *Biomarcadores na Nefrologia*. (Roche, Ed.), E-Book. Sociedade Brasileira de Nefrologia.
- Albuquerque, R. B. De, Souza, E. L. De, Stamford, T. L. M., & Stamford, T. C. M. (2009). Perspectiva e potencial aplicação de quitosana com o inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 10(5), 260–274.
- Alhadeff, E. M. (2011). Síntese e caracterização de polianilina para construção de biossensor eletroquímico. In *11º Congresso Brasileiro de Polímeros* (pp. 2560–2565). Campos do Jordão - SP.
- Almeida, T. L. de. (2009). *E Quitosana Compatível Com O Sistema Dermo – Epidérmico*. Universidade de São Paulo.
- Alqasameh, M. S., Heng, L. Y., & Ahmad, M. (2007). A Urea Biosensor from Stacked Sol-Gel Films with Immobilized Nile Blue Chromoionophore and Urease Enzyme. *Sensors*, 7(10), 2251–2262. <https://doi.org/10.3390/s7102251>
- Amarante, A. M., Oliveira, G. S., Bueno, C. C., Cunha, R. a., Ierich, J. C. M., Freitas, L. C. G., ... Leite, F. L. (2014). Modeling the coverage of an AFM tip by enzymes and its application in nanobiosensors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 53, 100–104. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2014.07.009>
- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., & Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1405–1423. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
- Andrade, V. M. (2006). *Confecção De Biossensores Através Da Imobilização De Biocomponentes Por Eletropolimerização De Pirrol*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Andrea Graydon, Alexander Berchansky, Michal Harel, D. C. (2015). Urease. Retrieved July 10, 2015, from <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Urease>
- Ansari, A. a, Alhoshan, M., Alsalhi, M. S., & Aldwayyan, a S. (2010). Nanostructured Metal Oxides Based Enzymatic Electrochemical Biosensors. *Biosensors*, (February), 23–47.
- Araújo, A. X. (2005). *Nucleação e Evolução da Rugosidade em Filmes Eletrodepositados de CuCo*. Univesidade Federal de Santa Catarina.
- Arya, S. K., Datta, M., & Malhotra, B. D. (2008). Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(7), 1083–1100. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.10.018>
- Atta, N. F., Galal, A., & Ali, S. M. (2011). Nanobiosensor for Health Care. *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, (d).
- Barbosa, A. R. D. B. (2008). *Construção de um Biossensor para o Doseamento de Ureia Baseado na Inibição Enzimática da Amidase de Pseudomonas Aeruginosa com Recurso a um Electrodo Selectivo de lões Amónio*. Instituto Politécnico de Lisboa.
- Benini, S., Rypniewski, W., Wilson, K., Ciurli, S., & Mangani, S. (2001). Structure-based rationalization of urease inhibition by phosphate: Novel insights into the

- enzyme mechanism. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 6(8), 778–790. <https://doi.org/10.1007/s007750100254>
- Bernardi, J. C. (2011). *Auto-Organização No Desenvolvimento De Sensores, Biossensores E Modelos De Membrana Para Aplicação Em Nanomedicina*. Universidade de São Paulo.
- Calil, S. S., & Roberto, P. (2011). Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. *6ª Mostra de Produção Científica Da Pós-Graduação Lato Sensu Da PUC Goiás*, 1–20. Retrieved from [http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf)
- Caridade, C. I. M. G. B. (2008). *Eletrodos de Filme de Carbono Caracterização e aplicação em sensores e biossensores electroquimicos*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra.
- Catoni, S. (2011). *Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em libertação controlada de fármacos*. Universidade da Região de Joinville.
- Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A., & Valdes, J. J. (2008). Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1), 1–12.
- Chan, K. M. (2012). Quantitative Chemistry Experimental Technique (I) pH Measurement by Antimony Electrode. *La Chimica Nella Scuola XXXIV*, (August), 75–88.
- Chaubey, A., & Malhotra, B. D. (2002). Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 17(6–7), 441–456. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00313-X](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00313-X)
- Chou, N. H., Chou, J. C., Sun, T. P., & Hsiung, S. K. (2008). Differential type solid-state urea biosensors based on ion-selective electrodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 130(1), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.09.014>
- Crismore, W. F., Surridge, N. A., McMinn, D. R., Bodensteiner, R. J., Diebold, E. R., Delk, R. D., ... Heald, B. A. (2001). Electrochemical Biosensor Test Strip. Unide States. Retrieved from <http://www.google.com/patents/US6270637>
- Curilazo, R., Rodrigues, M., Henrique, L., & Antonia, D. (2007). Eletrodos Modificados com Hidróxido de Níquel para Determinação de Ureia. *Semina: Ciências Exatas E Tecnológicas*, 28(2), 93–98.
- Dallan, P. R. M. (2005). *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da pele*. Universidade Estadual de Campinas.
- Dalla-Vecchia, R., Nascimento, M. D. G., & Soldi, V. (2004). Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, 27(4), 623–630. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400017>
- Davi, C. C. M., Max, E., Henrique, P., & Oliveira, E. De. (2011). Desenvolvimento de Biossensor Eletroquímico de Baixo Custo. In *XXXIX Congresso Brasileiro de Educação em Engenharia*. Blumenau - SC.
- De Souza, D., Machado, S. a S., & Avaca, L. a. (2003). Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, 26(1), 81–89. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>
- Edgar, K. J., Buchanan, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. a., Seiler, B. D.,

- Shelton, M. C., & Tindall, D. (2001). Advances in cellulose ester performance and application. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 26(9), 1605–1688. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00027-2)
- Fatibello-Filho, O; Capelato, M. (1992). Biossensores. *Química Nova*. Retrieved from [http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15\\_n1\\_\(6\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/1992/vol15n1/v15_n1_(6).pdf)
- Feng, J., Siu, V. S., Roelke, A., Mehta, V., Rhiu, S. Y., Palmore, G. T. R., & Pacifici, D. (2012). Nanoscale plasmonic interferometers for multispectral, high-throughput biochemical sensing. *Nano Letters*, 12(2), 602–609. <https://doi.org/10.1021/nl203325s>
- Fernandes, S. C. (2012). *Universidade federal de santa catarina centro de ciências físicas e matemáticas departamento de química programa de pós-graduação em química*. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Furtado, R. F., Dutra, R. O. a. F., Alves, C. R., Pimenta, M. G. R., & Guedes, M. I. F. (2008). Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. In E. A. Tropical (Ed.), *Embrapa* (p. 22). Fortaleza - CE.
- Galli, A. (2009). *Desenvolvimento e Caracterização de um Biossensor Bienzimático Imobilizado Sobre Monocamadas Auto-Organizadas para Determinação de Açúcares em Alimentos*. Universidade de São Paulo.
- Gaspar, C. (2010). Mercado dos Biossensores. Retrieved July 30, 2015, from <https://sites.google.com/site/biossensoresfl/detector-cancro/mercado-dos-biossensores>
- Glass, R. S. (1999). Urea Biosensor for Hemodialysis Monitoring. United State.
- Gonçalves, L. M. (2011). *LARISSA MARTINS GONÇALVES Produção e Caracterização de Proteínas Quiméricas Contendo Fosfatases e Módulo de Ligação à Celulose . LARISSA MARTINS GONÇALVES Produção e Caracterização de Proteínas Quiméricas contendo Fosfatases e Módulo de Ligação à Celulose*. Universidade de São Paulo.
- Gupta, B., Singh, S., Mohan, S., & Prakash, R. (2010). Urea Biosensor based on Conducting Polymer Transducers. *Biosensors*, (February).
- György, E., Sima, F., Mihailescu, I. N., Smausz, T., Hopp, B., Predoi, D., ... Petrescu, S. M. (2010). Biomolecular urease thin films grown by laser techniques for blood diagnostic applications. *Materials Science and Engineering C*, 30(4), 537–541. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2010.02.003>
- Hansen, B. (2011). *Metodologia para Produção de Biossensores Amperométricos Enzimáticos Utilizando Polímeros Condutores: Caso Polianilina*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Hsiung, S. K., Li, C., Chou, J. C., City, D., Sun, T. P., City, J., ... Township, W. (2005). Electrical Urea Biosensors and Its Manufacturing Method. United States.
- Hsiung, S.-K., Chou., J.-C., Sun, T.-P., Chou, N.-H., & Pan, C.-W. (2009). Solid-State Urea Biosensor. United States.
- Hsiung, S.-K., Chou, N., Chou., J.-C., & Sun, T.-P. (2010). Potentiometric Biosensor and the Forming Method Thereof. United States.
- Ilidio, R. da silva. (2011). Biossensores no meio ambiente. Retrieved July 30, 2015, from <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=>

rja&uact=8&ved=0CCoQFjACahUKEwi1-f4wIPHAhWBlpAKHXUFCuE&url=http%3A%2F%2Fronpage.com%2Fturmas%2Faeds1\_2011-2\_1p\_bioprocessos%2FGrupo\_5\_Biosensores%2520no%2520Meio%2520Ambiente.docx&ei

- Janegitz, B. C. (2012). *Desenvolvimento de Biossensores Utilizando Nanotubos de Carbono e Nanopartículas de Ouro*. Universidade Federal de São Carlos.
- Jha, S. K., Topkar, A., & D'Souza, S. F. (2008). Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(6), 1145–1150. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2007.12.006>
- Júnior, W. D. C. (2008). *Ciência e Engenharia de Materiais - Uma Introdução*. (LTC, Ed.) (7th ed.). Rio de Janeiro.
- Kelley, S. S., Company, E. K., Division, E. C., & Tn, U. S. a. (1989). the Effect of Degree of Acetylation on Gas Sorption and Transport Behavior in Cellulose Acetate. *Journal of Membrane Science*, 47, 301–332.
- Khulbe, K. . C., Hamad, F., Feng, C., Matsuuma, T., & Khayet, M. (2004). Study of the surface of the water treated cellulose acetate membrane by atomic force microscopy. *Desalination*, 161(3), 259–262. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(03\)00706-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(03)00706-9)
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P., & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie - International Edition*, 44(22), 3358–3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
- Krajewska, B. (2004). Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.013>
- Krajewska, B. (2009). Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1–3), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>
- Lakard, B., Herlem, G., Lakard, S., Antoniou, A., & Fahys, B. (2004). Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), 1641–1647. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2003.12.035>
- Lakard, B., Magnin, D., Deschaume, O., Vanlancker, G., Glinel, K., Demoustier-Champagne, S., ... Yunus, S. (2011). Urea potentiometric enzymatic biosensor based on charged biopolymers and electrodeposited polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(10), 4139–4145. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.04.009>
- Laprox. (2011a). Laprox. Retrieved June 20, 2015, from <http://www.ufrgs.br/laprox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-aspectos-estruturais/propriedades-cataliticas-das-ureases>
- Laprox. (2011b). Ureasas - Aspectos Estruturais. Retrieved November 10, 2014, from <http://www.ufrgs.br/laprox/o-que-fazemos/linhas-de-pesquisa/ureases-aspectos-estruturais>
- Lee, W.-Z., Tseng, H.-S., Ku, M.-Y., & Kuo, T.-S. (2008). Dinickel complexes of disubstituted benzoate polydentate ligands: mimics for the active site of urease. *Dalton Transactions (Cambridge, England: 2003)*, 2(19), 2538–2541.

<https://doi.org/10.1039/b803094b>

- Lima, I. S., Ribeiro, E. S., & Airoidi, C. (2006). O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. *Química Nova*, 29(3), 501–506. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300018>
- Lisboa, A., & Barin, C. S. (2009). Eletrodeposição de Ligas Metálicas Nobres para Fabricação de Jóias e Jóias Folheadas. *Artigo Original*, 8(1), 27–33.
- Liu, C. C. (2012). Electrochemical based biosensors. *Biosensors*, 2(3), 269–272. <https://doi.org/10.3390/bios2030269>
- Lojou, E., & Bianco, P. (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. *Journal of Electroceramics*, 16(1), 79–91. <https://doi.org/10.1007/s10832-006-2365-9>
- Malhotra, B. D., & Turner, A. P. F. (2003). *Advances in Biosensors: Perspectives in Biosensors*.
- Marques, P. R. B. D. O., & Yamanaka, H. (2008). Biossensores Baseados no Processo de Inibição enzimática. *Química Nova*, 31(7), 1791–1799. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700034>
- Medeiros, M. (2015). Antimônio. Retrieved May 25, 2016, from Stibium Antimony
- Melo, A. F. (2008). *Desenvolvimento preliminar de um Biossensor emzinático pra determinação de taninos hidrolisáveis*. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Mendes, A. A., Oliveira, P. C., Castro, H. F., & Giordano, R. L. C. (2011). Aplicação de Quitosana como Suporte para a Imobilização de Enzimas de Interesse Industrial. *Química Nova*, 34(5), 831–840.
- Moreira, C. S., Lima, A. M. N., Neff, H., Neto, A. G. B., & Loureiro, F. C. C. L. (2010). Biossensores : Tecnologia e Aplicações, 1–18.
- Mozaffari, S. A., Rahmanian, R., Abedi, M., & Amoli, H. S. (2014). Urea impedimetric biosensor based on reactive RF magnetron sputtered zinc oxide nanoporous transducer. *Electrochimica Acta*, 146, 538–547. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.08.105>
- Mulyasuryani, A., Roosdiana, A., & Srihardyastutie, A. (2010). THE POTENTIOMETRIC UREA BIOSENSOR USING CHITOSAN MEMBRANE, 10(2), 162–166.
- Narang, J., Chauhan, N., Singh, A., & Pundir, C. S. (2011). A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(3–4), 276–281. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.016>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). *Princípios de Bioquímica*. (Lehninger, Ed.) (3ª). São Paulo.
- Okafor, C., Grooms, D., Alocilja, E., & Bolin, S. (2008). Fabrication of a novel conductometric biosensor for detecting Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis antibodies. *Sensors*, 8(9), 6015–6025. <https://doi.org/10.3390/s8096015>
- Oliveira, N. M. P. de. (2011). *Biossensor para Detecção do Antígeno Específico da Próstata*. Universidade de Aveiro.
- Oliveira, J. E., Consolin-Filho, N., Paterno, L. G., Mattoso, L. H. C., & Medeiros, E. S.

- (2013). Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. *Revista Eletrônica de Materiais E Processos*, 8.1, 1–11. Retrieved from [www.dema.ufcg.edu.br](http://www.dema.ufcg.edu.br)
- Oliveira, J. E., Paterno, L. G., Mattoso, L. H. C., Medeiros, E. S., Química, I. De, Brasília, U. De, ... Ribeiro, D. (2013). Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. *Revista Eletronica de Materiais E Processos*, 8.1, 1–11.
- Oliveria, I. R. W. Z. de, & Vieira, I. C. (2006). Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, 29(5), 932–939. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000500009>
- Paek, S. H., Cho, J. H., & Kim, S. ka. (2007). Membrane Strip Biosensor System for Point-of-care Testing.
- Pandey, Anamika; Pandey, Padmaker; Pandey, O. P.; Shukla, N. K. (2016). Fabrication of Potentiometric Cholesterol Biosensor by Crosslinking of Cholesterol Oxidase and Carbon Nanotubes Modified Cellulose Acetate Membrane. *Sensor Letters*, 14(1), 102–108. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1166/sl.2016.3593>
- Parreira, D. B. (2010). N a n o b i o s s e n s o r e s.
- Pohanka, M., & Republic, C. (2008). Electrochemical biosensors – principles and applications. *Methods*, 6(2), 57–64. Retrieved from [http://www.zsf.jcu.cz/jab/6\\_2/pohanka.pdf](http://www.zsf.jcu.cz/jab/6_2/pohanka.pdf)
- Porfírio, F. F. de O. (2014). *Aplicação de Biossensores na Análise da Qualidade de Bebidas : Revisão*.
- Prayoga, I., Mulyasuryani, A., & Prasetyawan, S. (2014). Synthesis of Tris(4-Methoxyphenyl)Phenylsilane Using Phenylsilane and 4-Iodo Anisole Catalyzed by Palladium Complex. *Makara Journal of Science*, 18(1), 26–30. <https://doi.org/10.7454/mss.v18i1.3051>
- Reddy, R. C., Srivastava, P. K., Dey, P. M., & Kayastha, A. M. (2004). Immobilization of pigeonpea (*Cajanus cajan*) urease on DEAE-cellulose paper strips for urea estimation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 39(Pt 3), 323–327. <https://doi.org/10.1042/BA20030122>
- Rodrigues, A. (2014). *Deposição, Caracterização e Aplicação de Filmes Nanoestruturados de ZnO: Biossensores de Glicose e Ureia*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Rolim, J. G. (2015). Materiais Condutores. Retrieved July 4, 2015, from [https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAAahUKEwjllLvD\\_Y\\_HAhXIG5AKHSbgDXY&url=http%3A%2F%2Fwww.labspot.ufsc.br%2F~jackie%2Fcap3\\_new.pdf&ei=HfrAVYiSB8i3wASmwLewBw&usg=AFQjCNGljPEPYJb9Pz16nLIGBaVMmaB7kA&s](https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB4QFjAAahUKEwjllLvD_Y_HAhXIG5AKHSbgDXY&url=http%3A%2F%2Fwww.labspot.ufsc.br%2F~jackie%2Fcap3_new.pdf&ei=HfrAVYiSB8i3wASmwLewBw&usg=AFQjCNGljPEPYJb9Pz16nLIGBaVMmaB7kA&s)
- Rubens, P., Barrocas, G., Cláudia, A., Vasconcellos, S. De, Duque, S., Maria, L., ... Moreira, J. C. (2008). Biosensors to monitor the exposition to environmental pollutants. *Cad. Saúde Colet.*, 16(4), 677–700.
- Rubens, S., & Pavone, C. (2008). Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica : revisão de literatura. *Revista Odontologia Da UNESP*, 37(2), 155–161. Retrieved from <http://www.hostcentral.com.br/rou/PDF/v37n2a09.pdf>

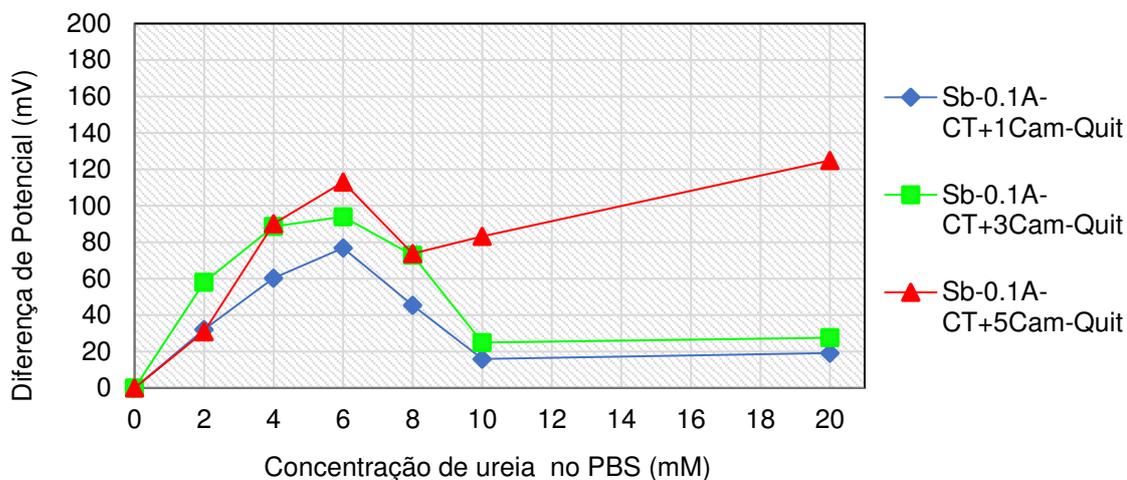
- Sahney, R., Puri, B. K., & Anand, S. (2005). Enzyme coated glass pH-electrode: Its fabrication and applications in the determination of urea in blood samples. *Analytica Chimica Acta*, 542(2), 157–161. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.069>
- Santos, J. C. de C. (2012). Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores.
- Santos, H. W. L. dos. (2008). *Estudo dos Sistemas Mistos -  $x.SbPO_4.(1-x).BiPO_4$  e  $x.Sb_2O_3.(1-x).SbPO_4$* . Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Silva, J. J. de B. (2004). *Desenvolvimento De Biossensores Eletroquímico E Piezelétrico De Dna Para Diagnósticos Clínicos*. Universidade Federal de Pernambuco.
- Silva, L. M. D. C. (2011). Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental, 152.
- Singh, M., Verma, N., Garg, A. K., & Redhu, N. (2008). Urea biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 134(1), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.025>
- Skládal, P., Pohanka, M., Kupská, E., & Šafář, B. (2010). Biosensors for Detection of Francisella Tularensis and Diagnosis of Tularemia, (February).
- Soares, J. C. (2011). *Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol*. Universidade de São Paulo.
- Sousa, L. R. (2006). *Ligas Ti-Al-Nb como biomaterial: elaboração, caracterização, modificação eletroquímica da superfície e estudo da biocompatibilidade utilizando culturas primárias de células da medula óssea humana*. Universidade Estadual Paulista.
- Steinmeier, H. (2004). Chemistry of cellulose acetylation. *Macromolecular Symposia*, 208, 49–60. <https://doi.org/10.1002/masy.200450405>
- Stenger, V. (2008). Rugosidade Superficial de Camadas Eletrodepositadas de Óxido de Cobre, 84.
- Stock Royalty. (2016). Fotografia de Stock Royalty Free Formula Estrutural do Polímero-da celulose. Retrieved October 10, 2016, from <https://thumbs.dreamstime.com/z/frmula-estrutural-do-polmero-da-celulose-40390927.jpg>
- Sujoy, B., & Aparna, A. (2013). Enzymology , Immobilization and Applications of Urease Enzyme. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(6), 51–56.
- Teroerde, F. (2007). *The Ferritic Solution*. Belgium: International Stainless Steel. Retrieved from [http://www.worldstainless.org/publications/brochures\\_and\\_posters](http://www.worldstainless.org/publications/brochures_and_posters)
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. a., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1–2), 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Ticianelli, E. A., & Gonzalez, E. R. (2005). *Eletroquímica: Princípios e Aplicações (2ª)*. edUSP.

- Tymeeki, L., Rozum, B., & Koncki, R. (2006). A Very Simple Biosensing System for Educational Purposes. *Chemical Analytic*, 977, 977–985.
- Uygun, Z., & Sezgintürk, M. (2011). Biosensors for Cancer Biomarkers. In *Biosensors - Emerging Materials and Applications* (pp. 499–544). Intech. Retrieved from [http://cdn.intechopen.com/pdfs/16440/InTech-Biosensors\\_for\\_cancer\\_biomarkers.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/16440/InTech-Biosensors_for_cancer_biomarkers.pdf)
- Van Den Hurk, R., & Evoy, S. (2015). A Review of Membrane-Based Biosensors for Pathogen Detection. *Sensors*, 15, 14045–14078. <https://doi.org/10.3390/s150614045>
- Vieira, S. N. (2011). *Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores eletroquímico na detecção de derivados fenólicos*. Tese De Doutorado. Universidade Federal de Uberlândia.
- Wang, J. Q., Chou, J. C., Sun, T. P., Hsiung, S. K., & Hsiung, G. B. (2003). pH-based potentiometrical flow injection biosensor for urea. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00160-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00160-6)
- Wikipédia. (2014). Ureia. Retrieved September 15, 2014, from <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ureia>
- Wood, D. W., & Gierach, I. (2011). Engineered Nuclear Hormone Receptor-Biosensors for Environmental Monitoring and Early Drug Discovery. *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, 501–526.
- Xia, L., Wei, Z., & Wan, M. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.029>

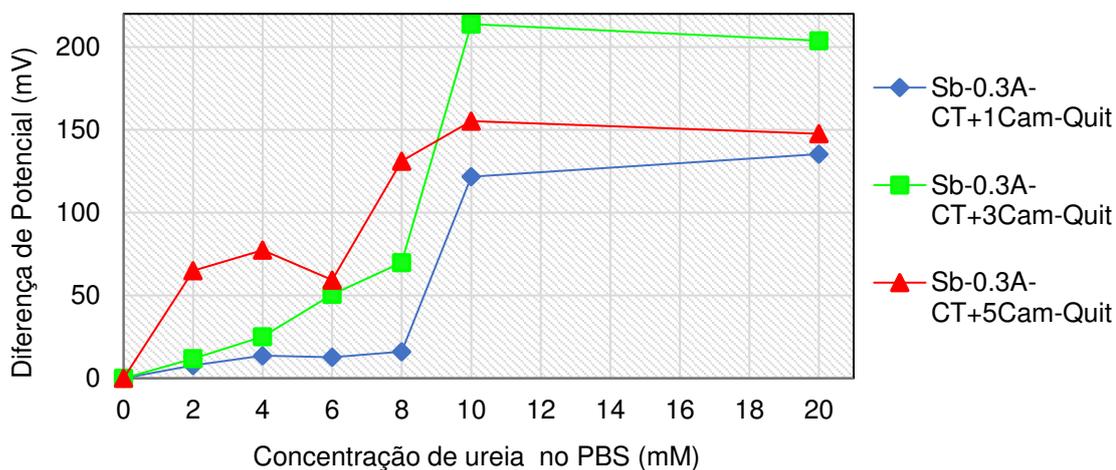
## **Anexo I**

### ***Sensibilidade dos Biossensores***

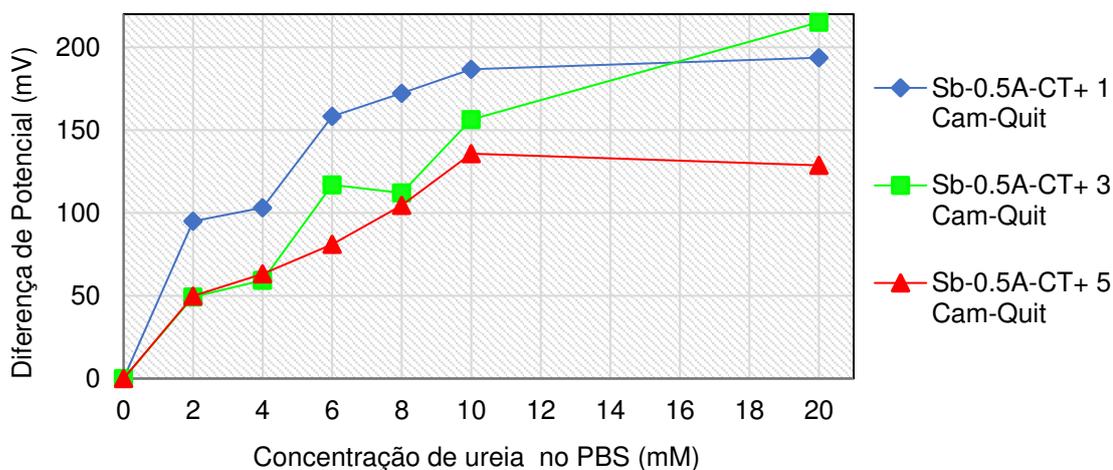
1. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



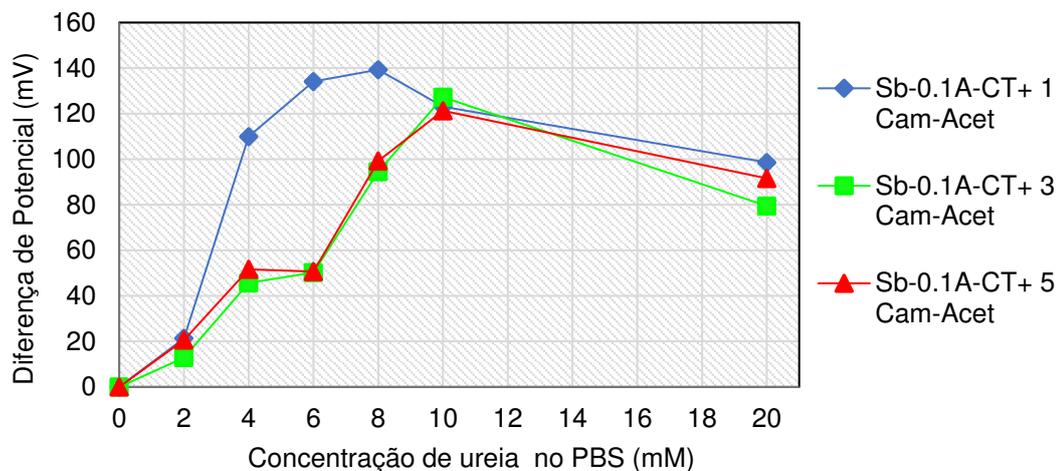
2. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



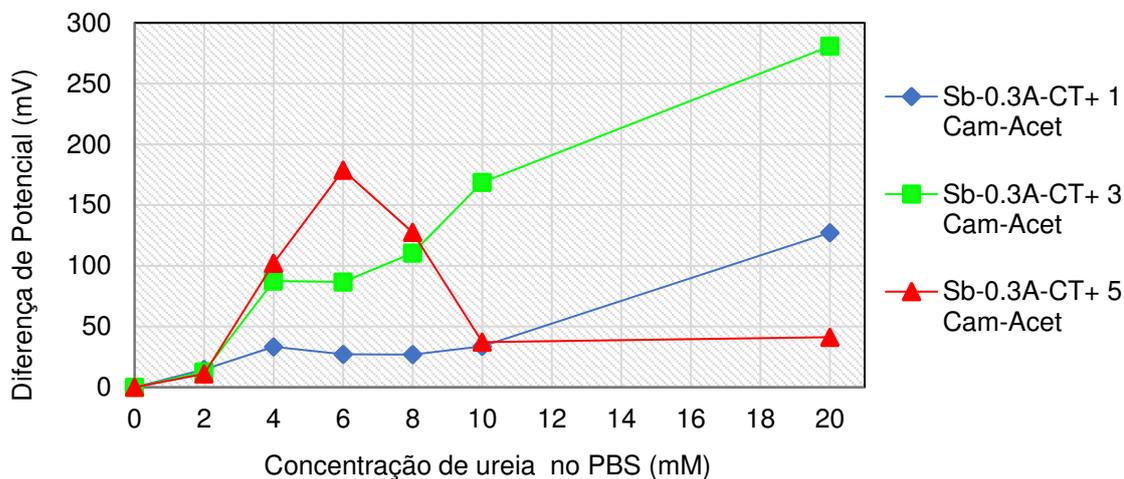
3. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



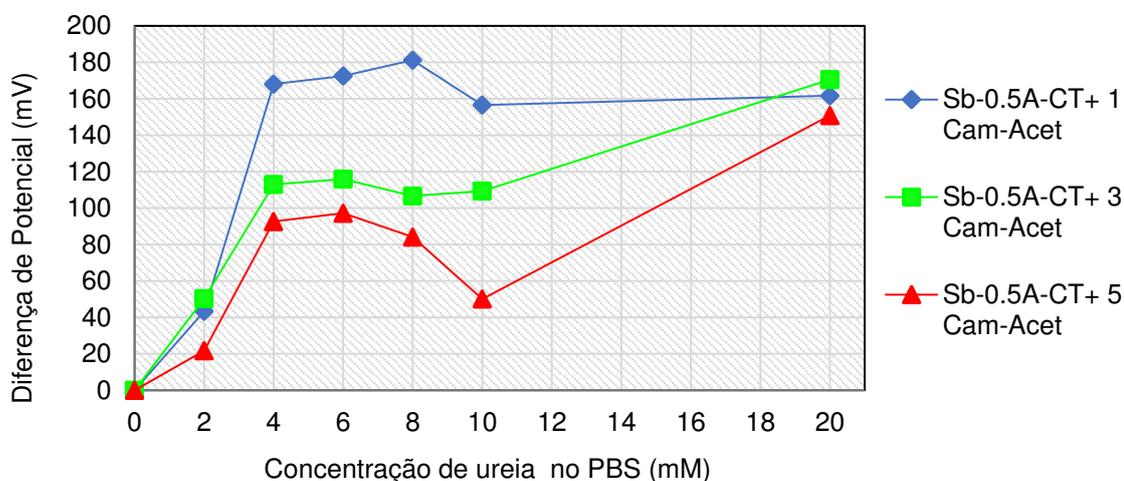
4. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



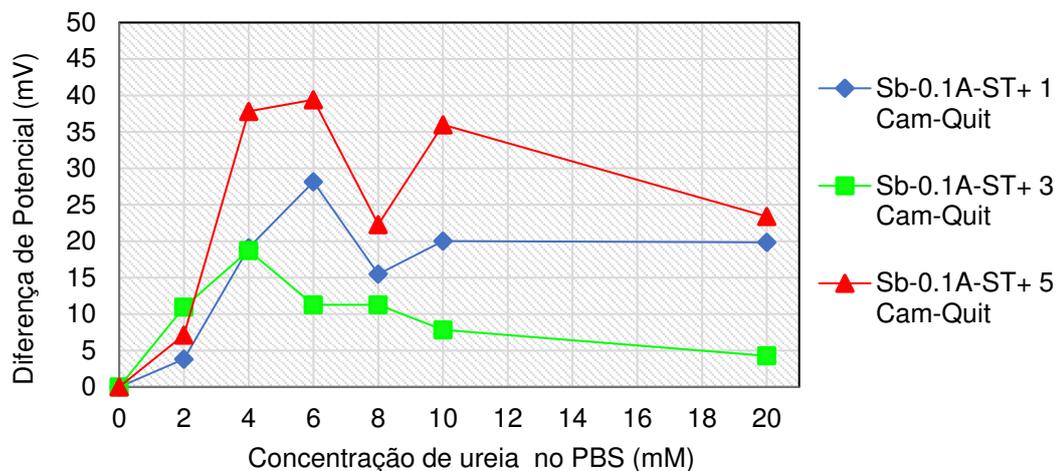
5. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



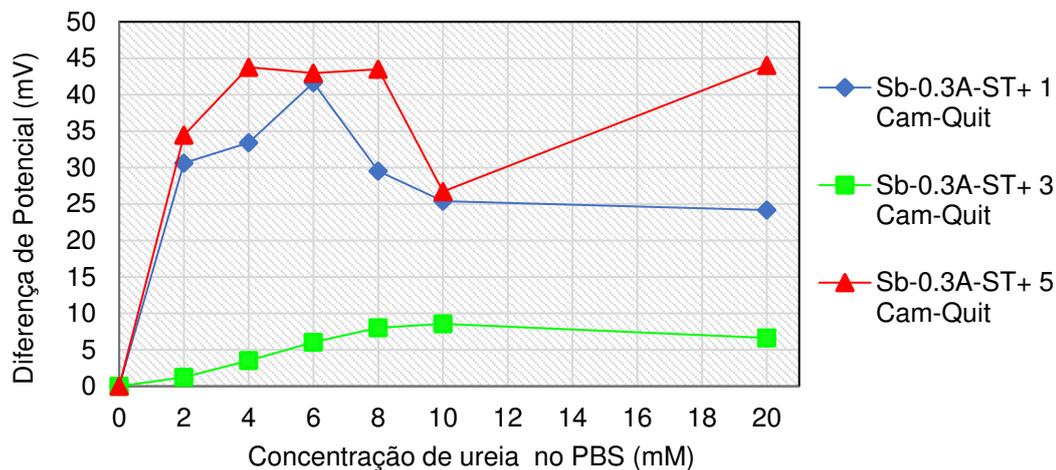
6. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



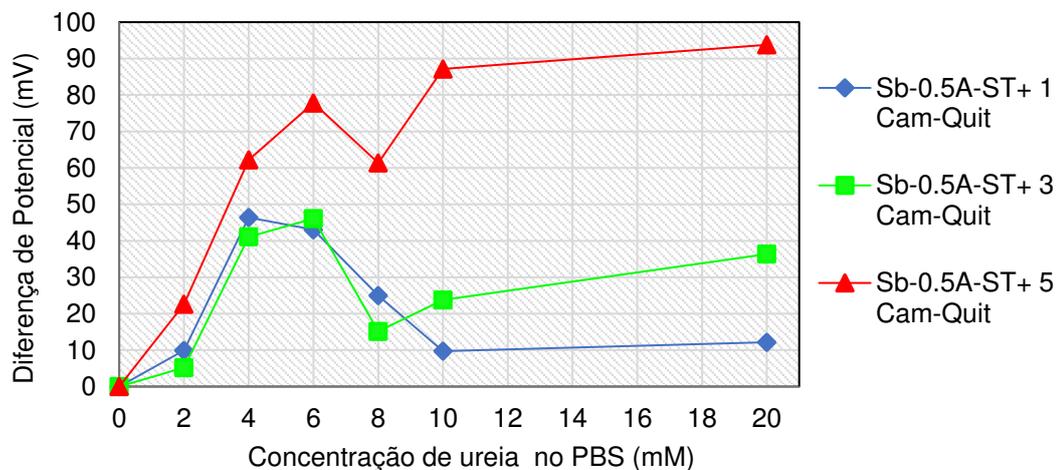
7. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



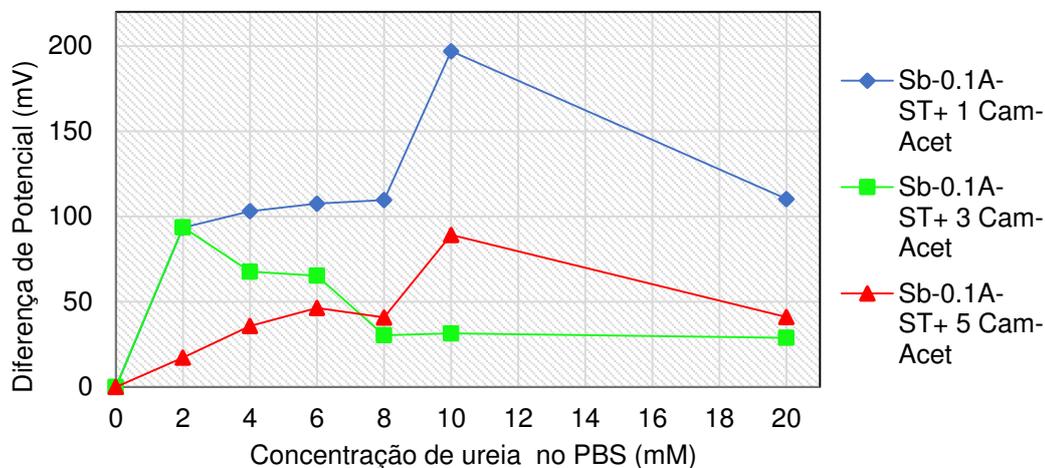
8. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



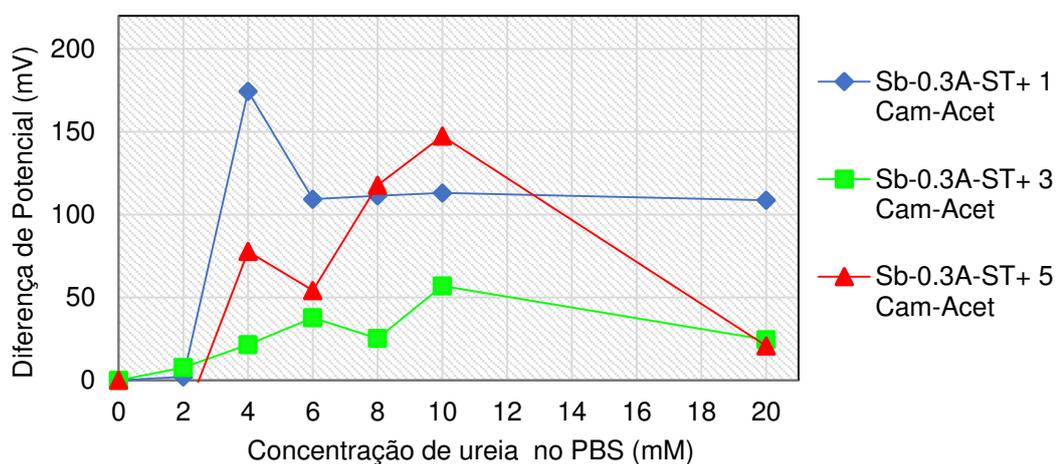
9. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



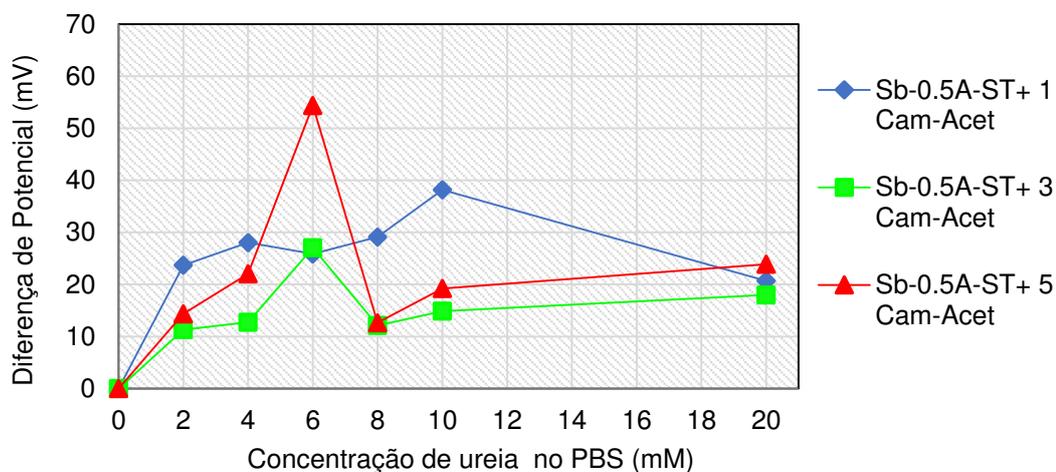
10. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



11. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



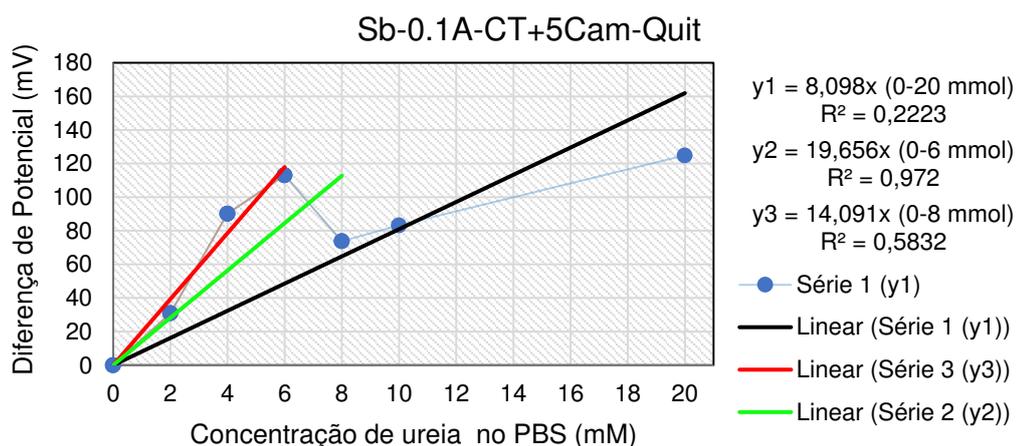
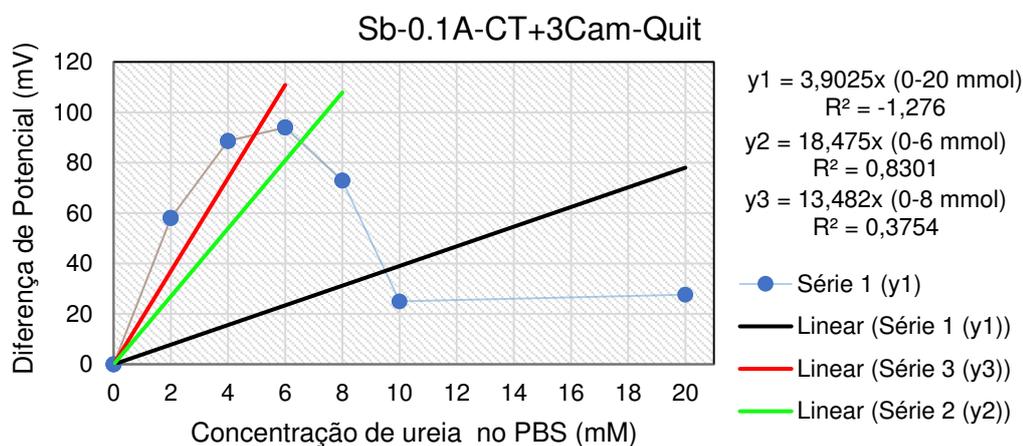
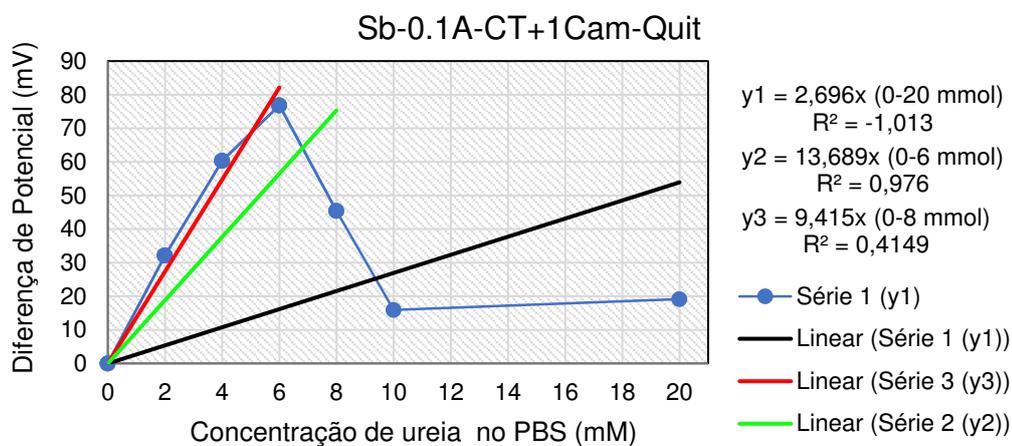
12. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



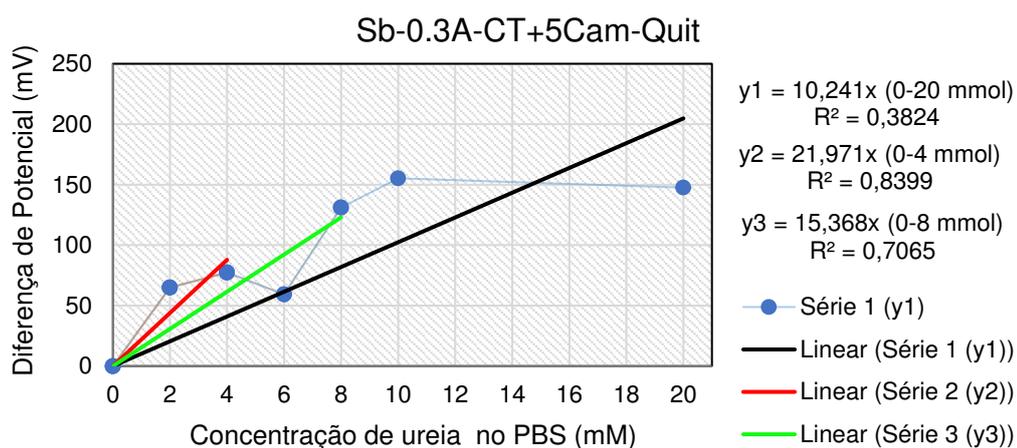
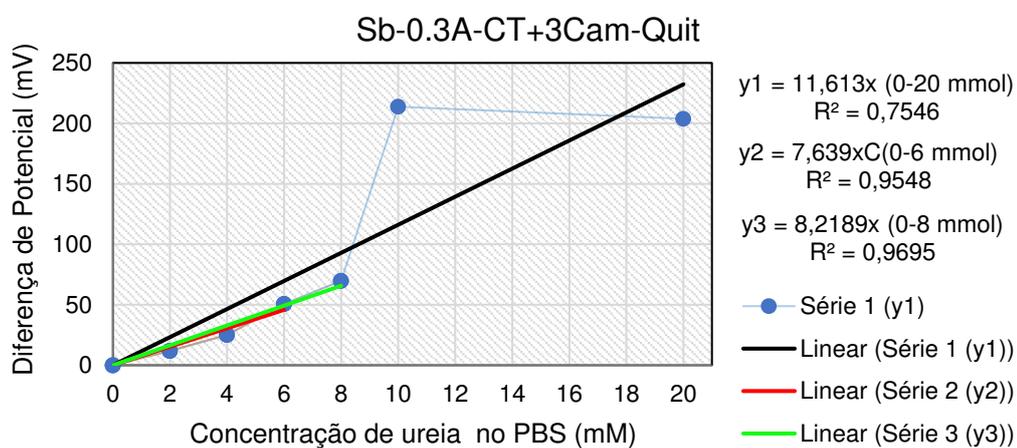
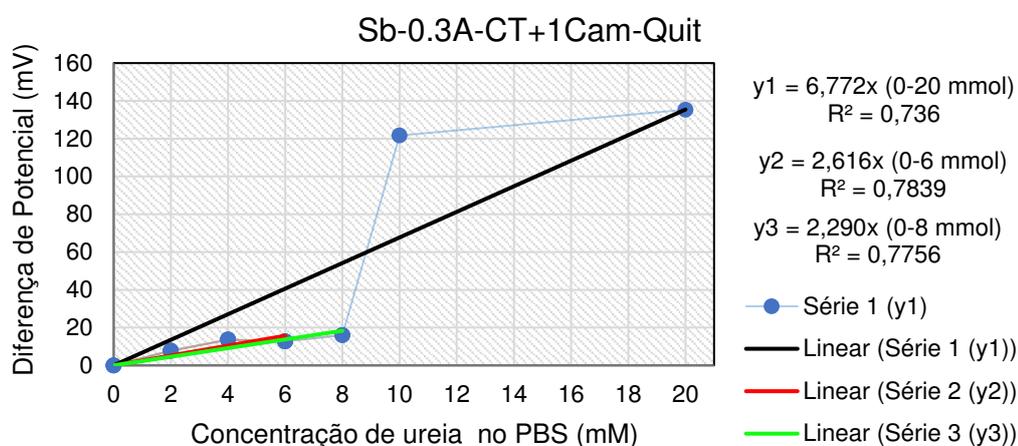
## **Anexo II**

### ***Linearidade dos Biossensores***

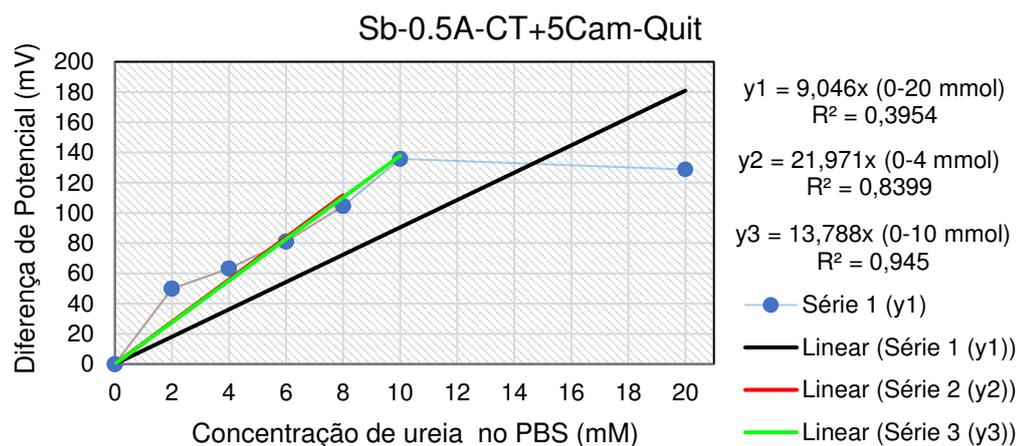
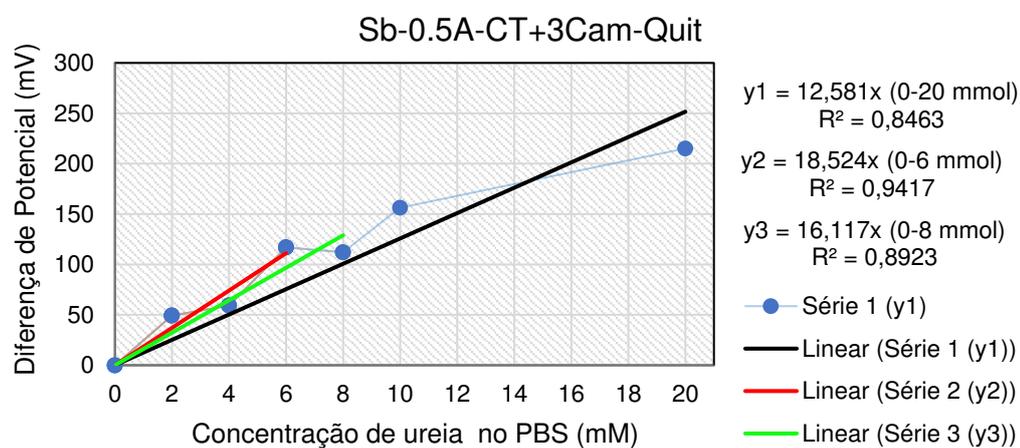
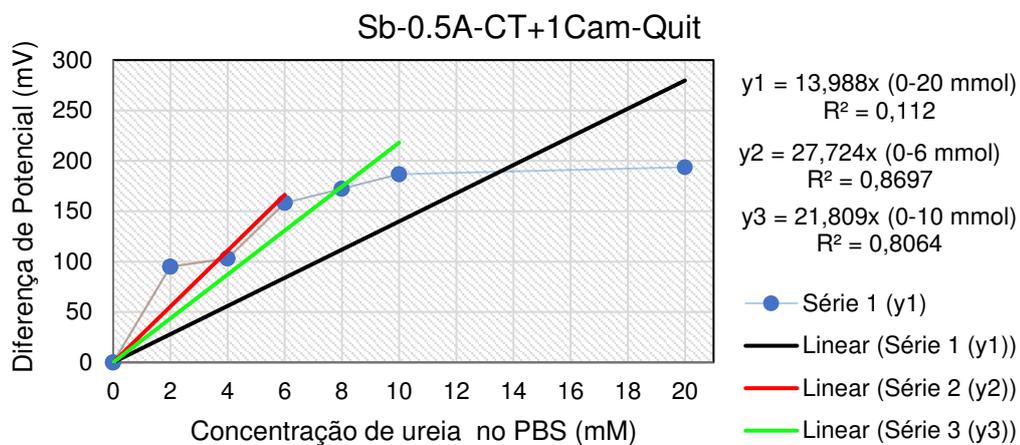
1. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



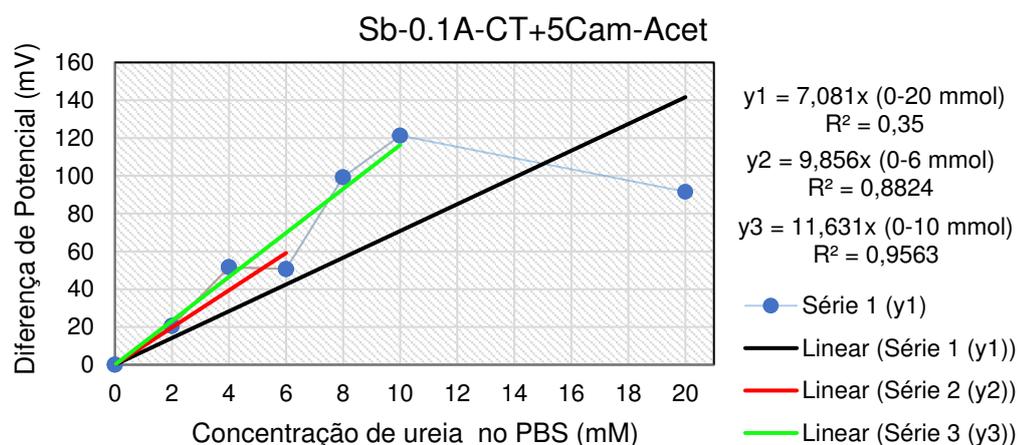
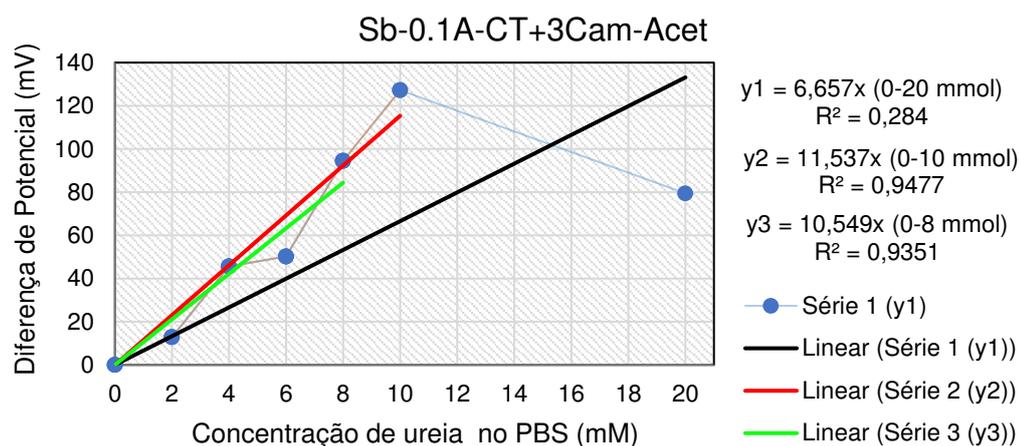
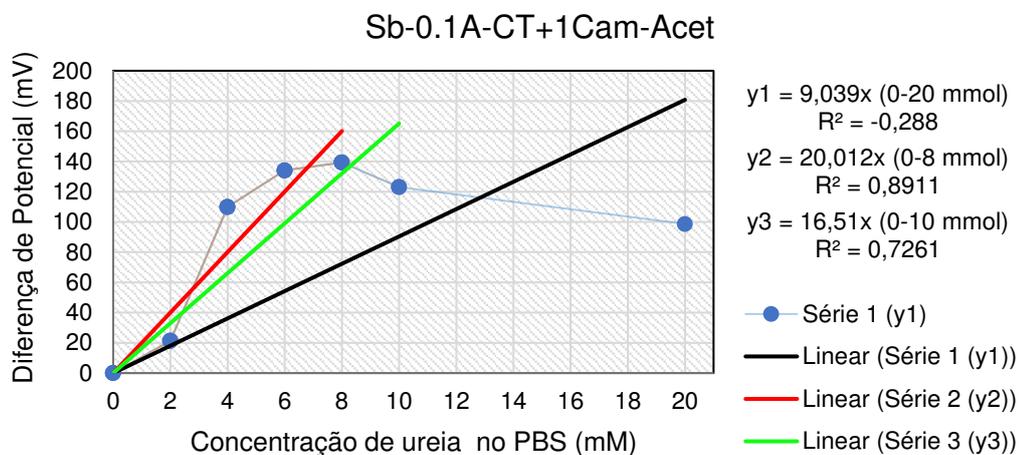
2. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



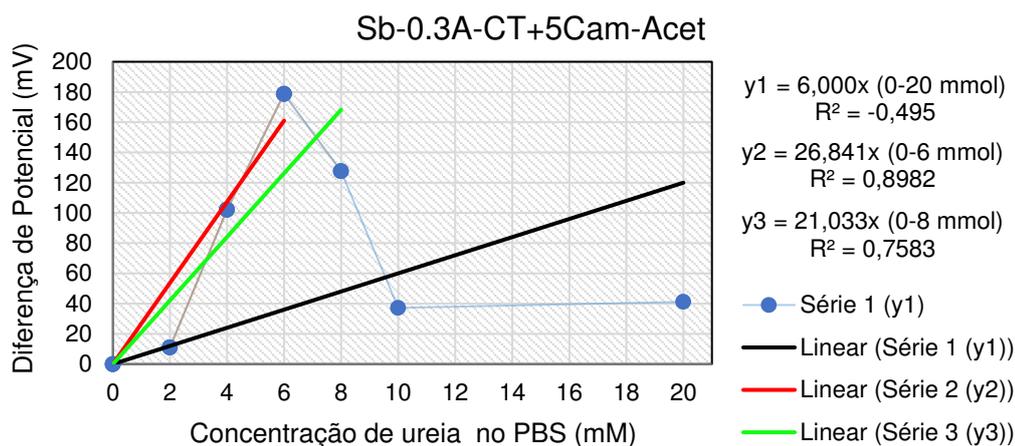
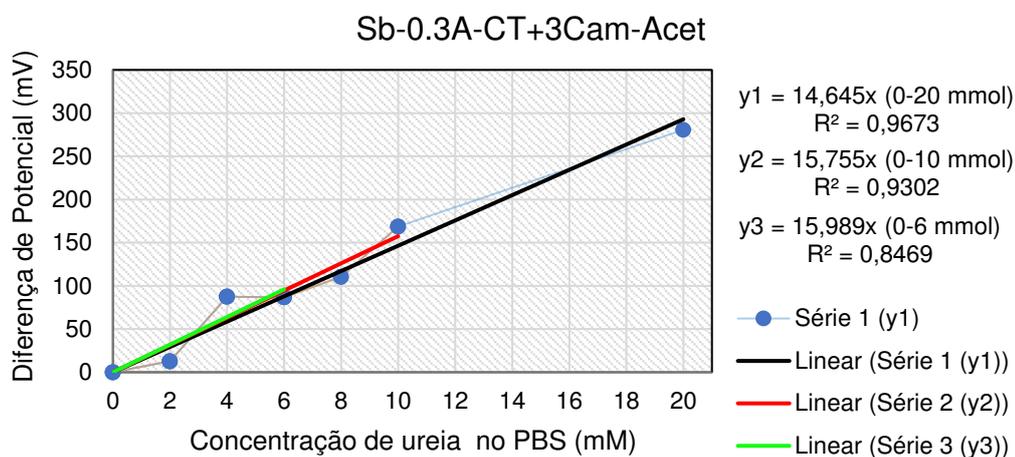
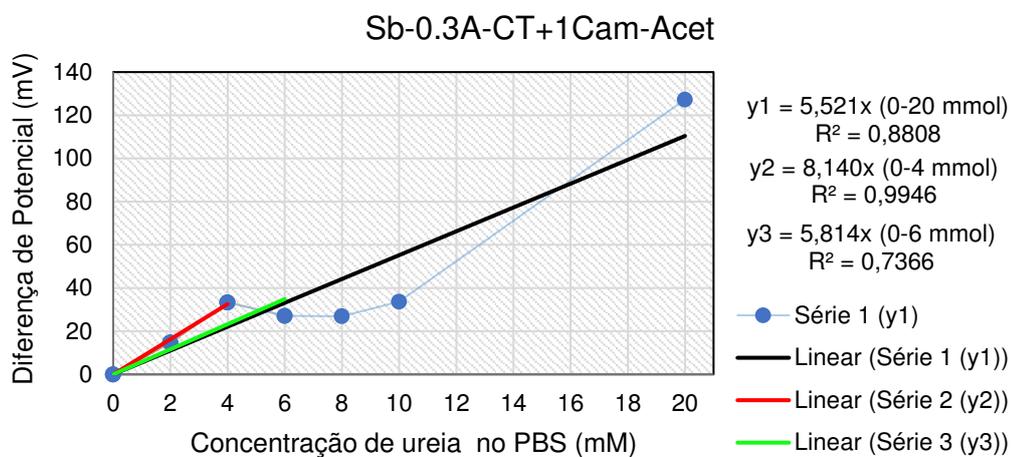
3. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



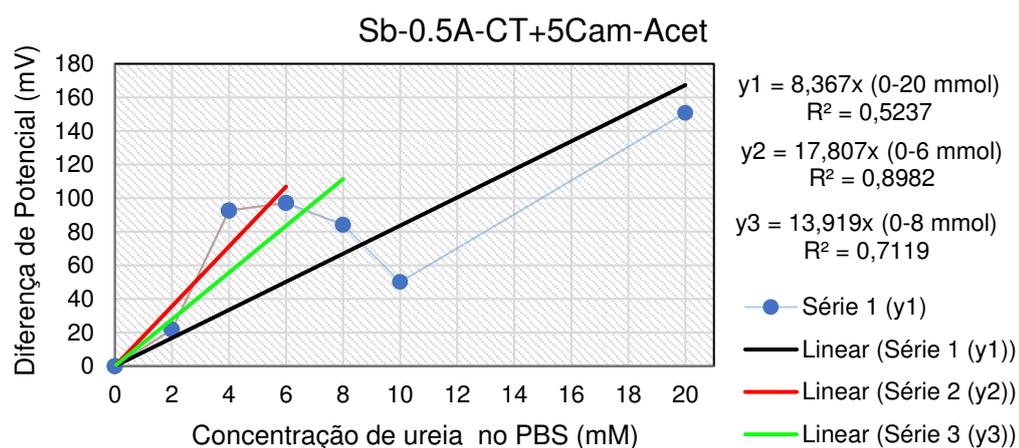
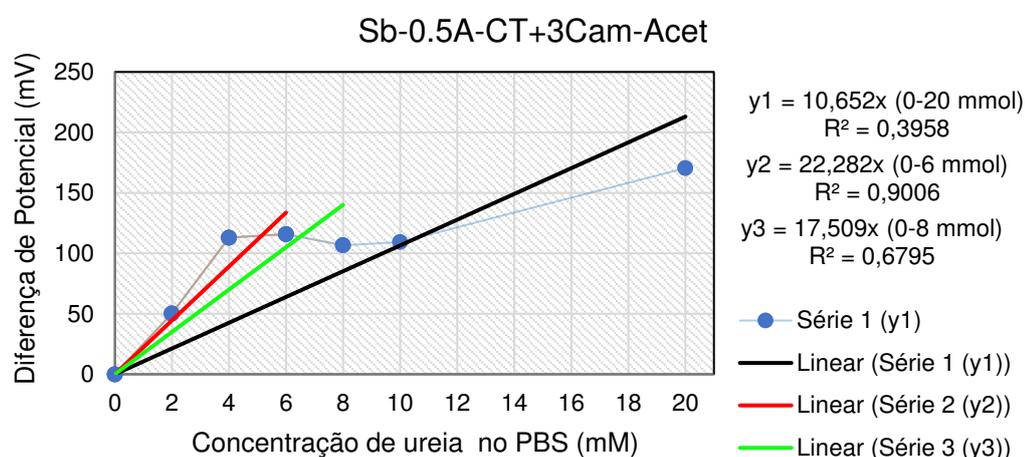
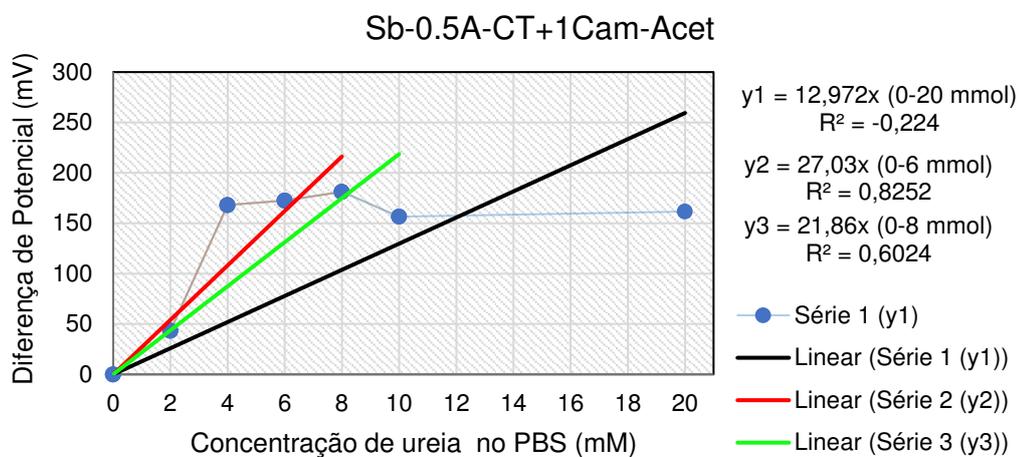
4. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



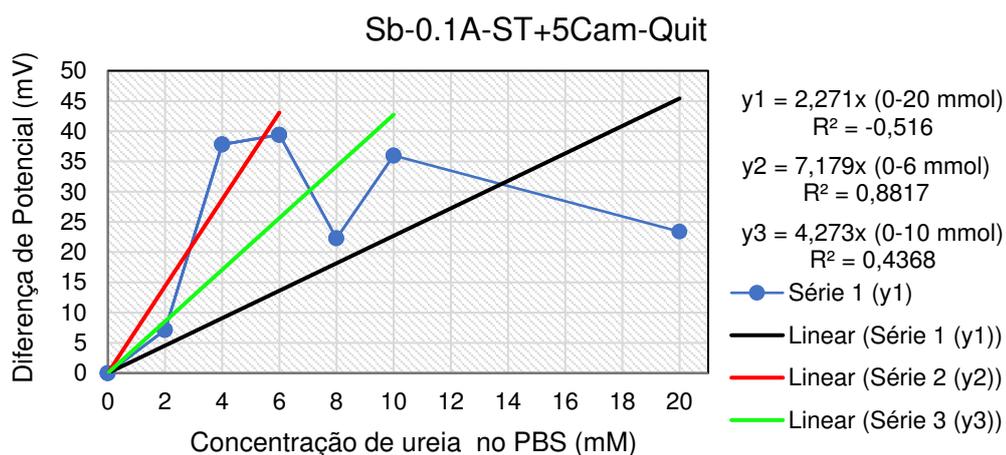
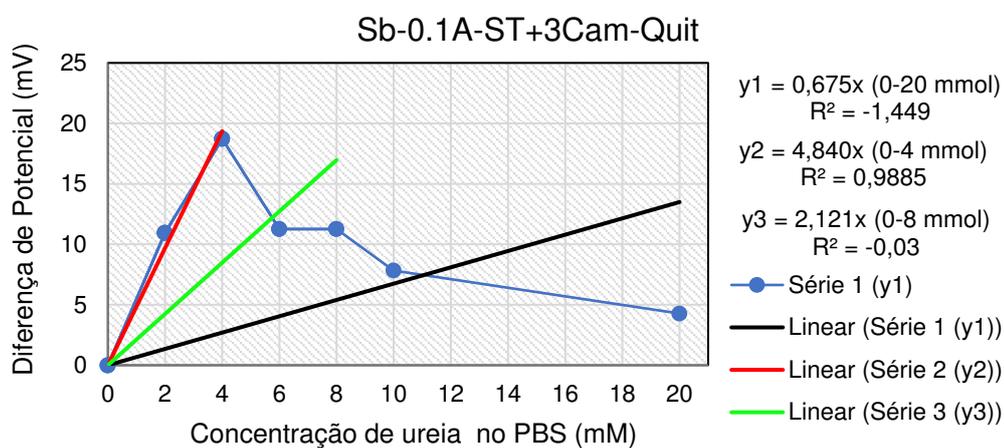
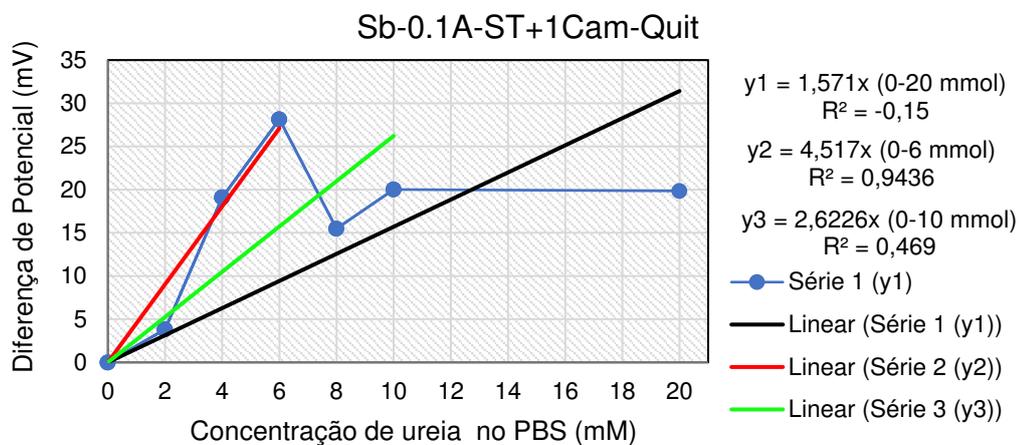
5. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



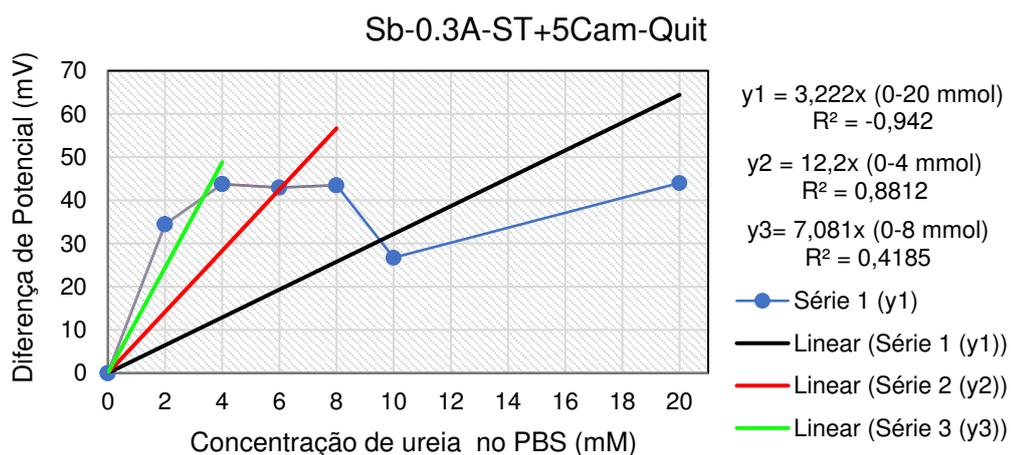
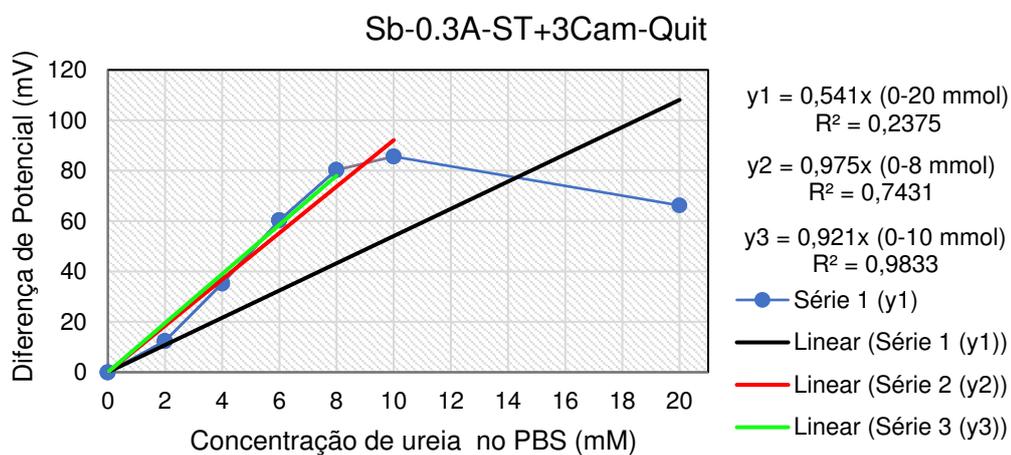
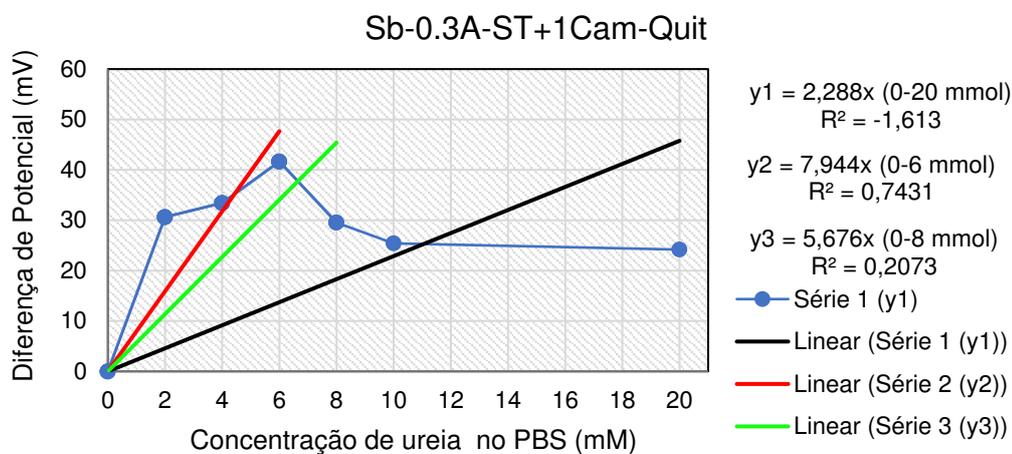
6. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



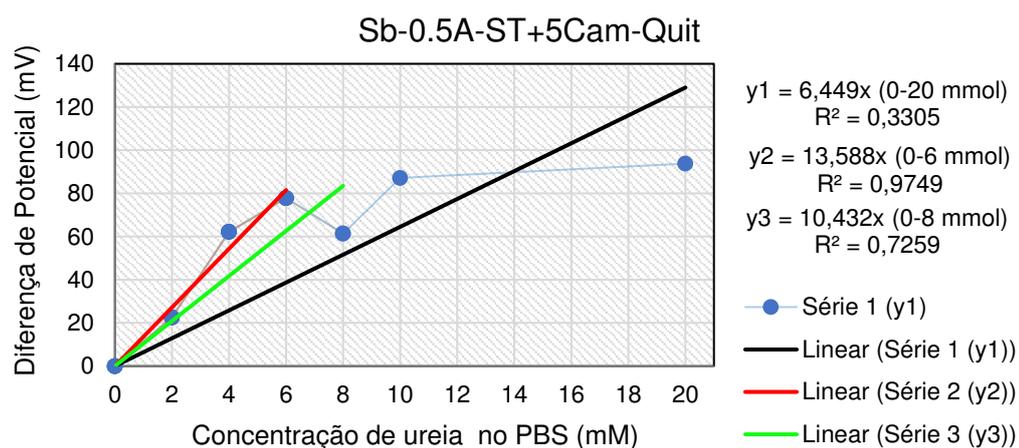
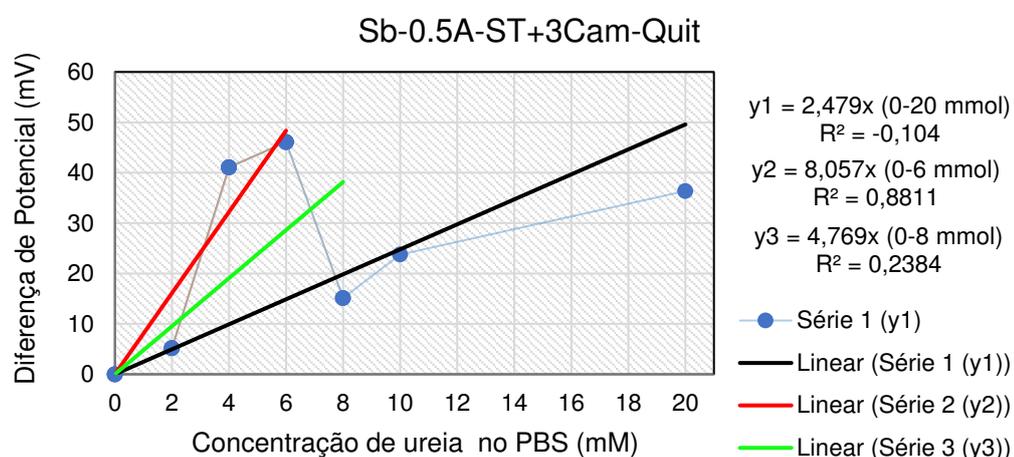
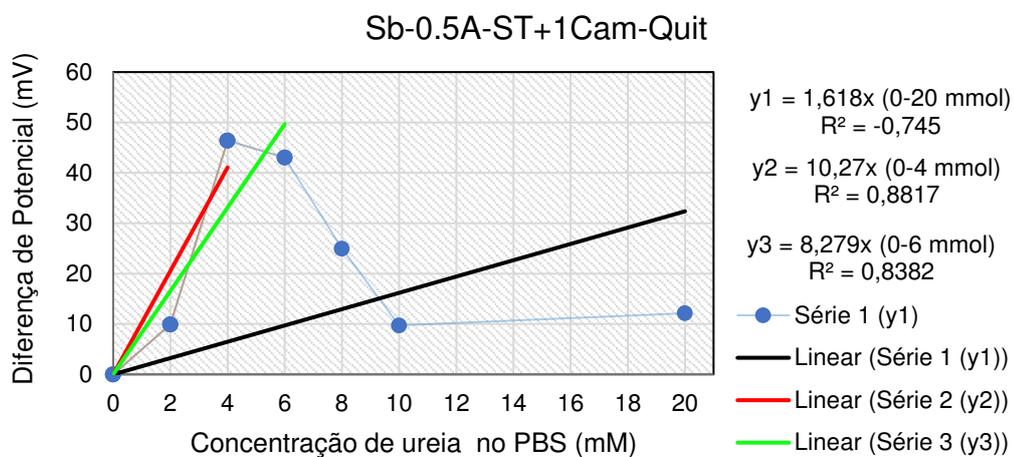
7. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



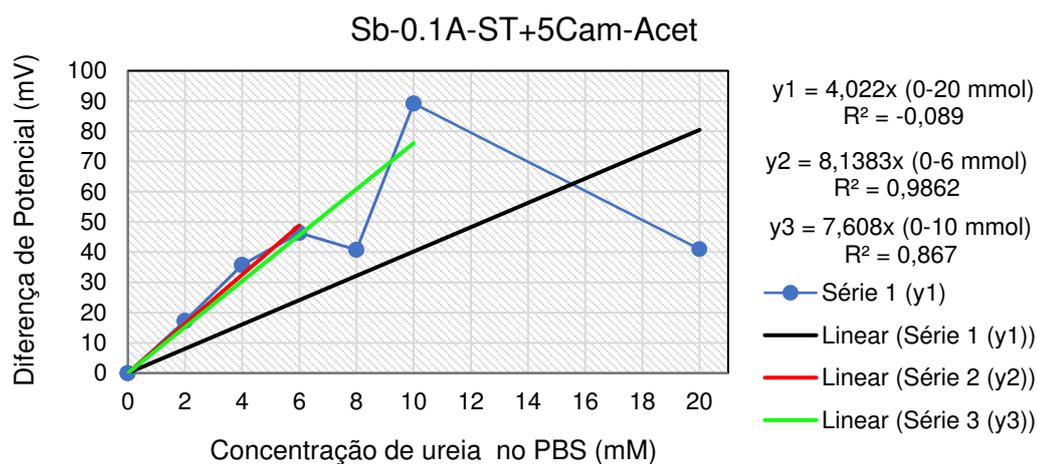
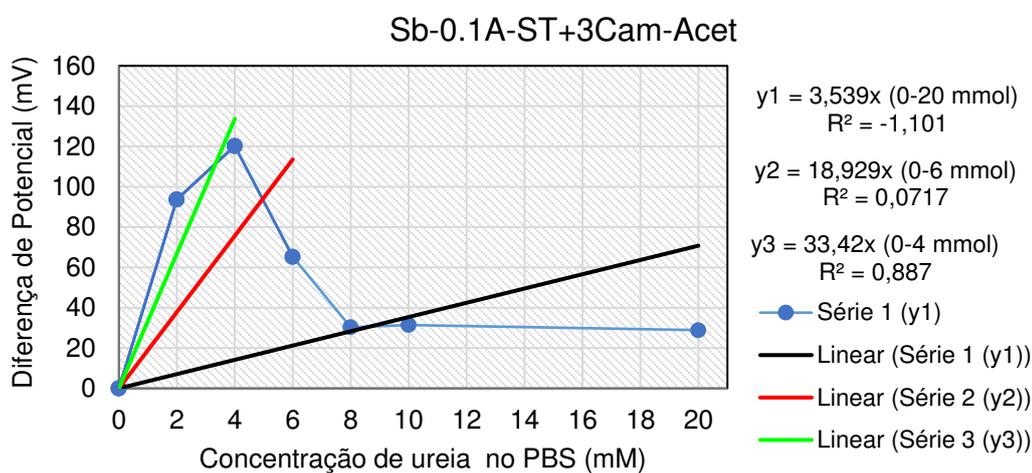
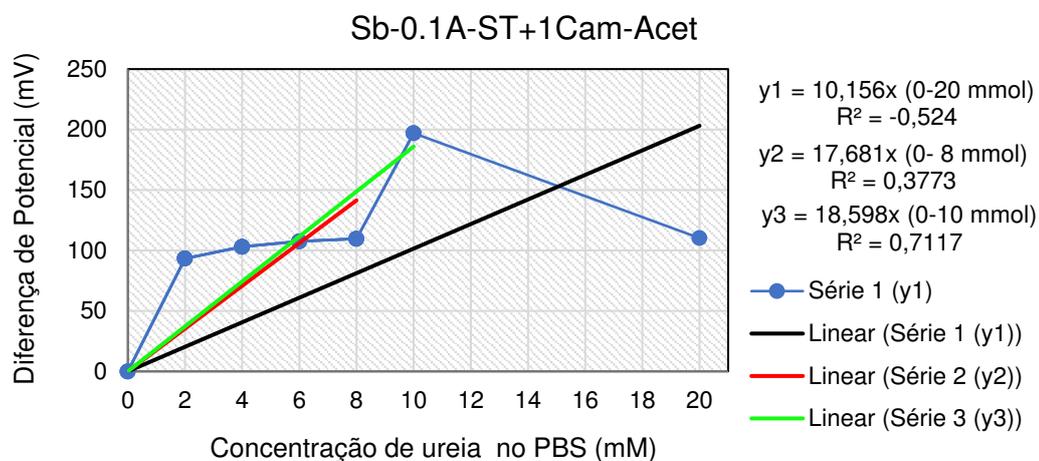
8. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



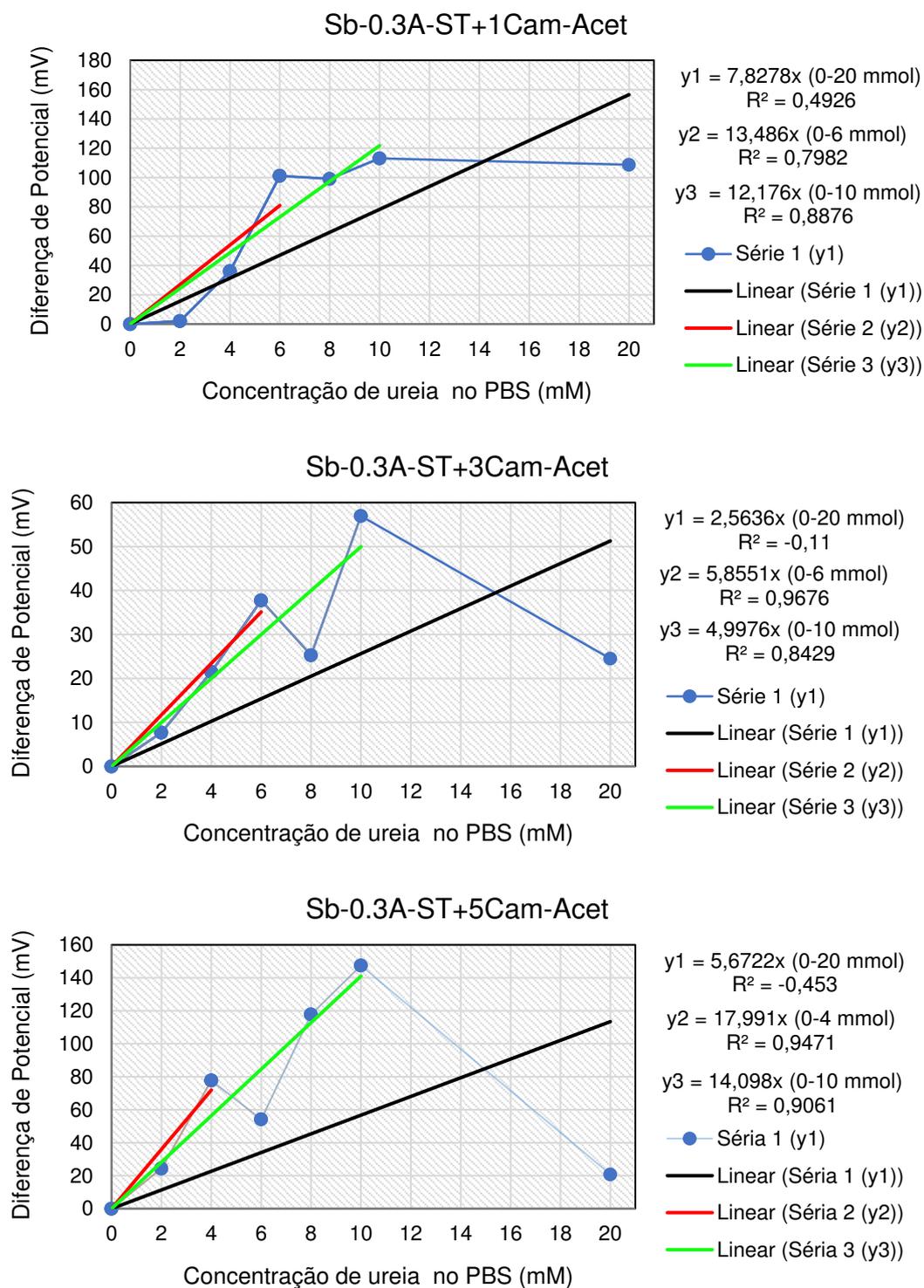
9. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



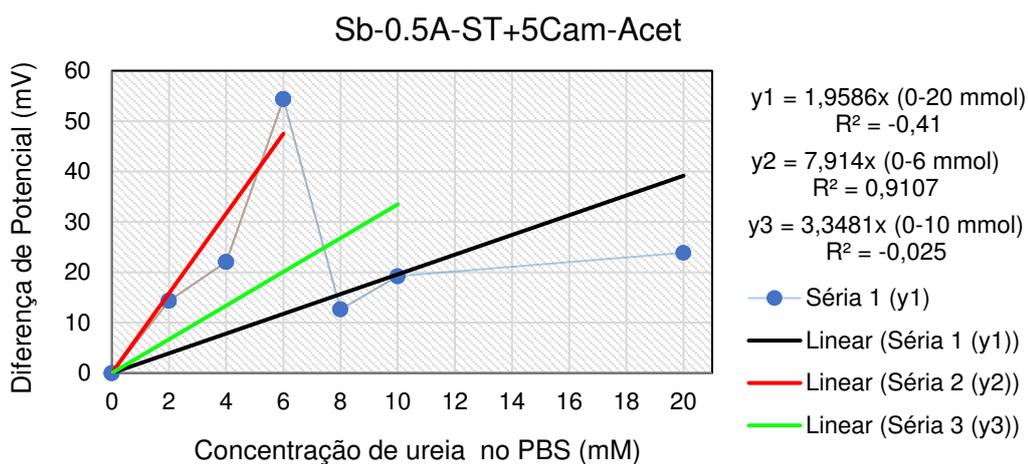
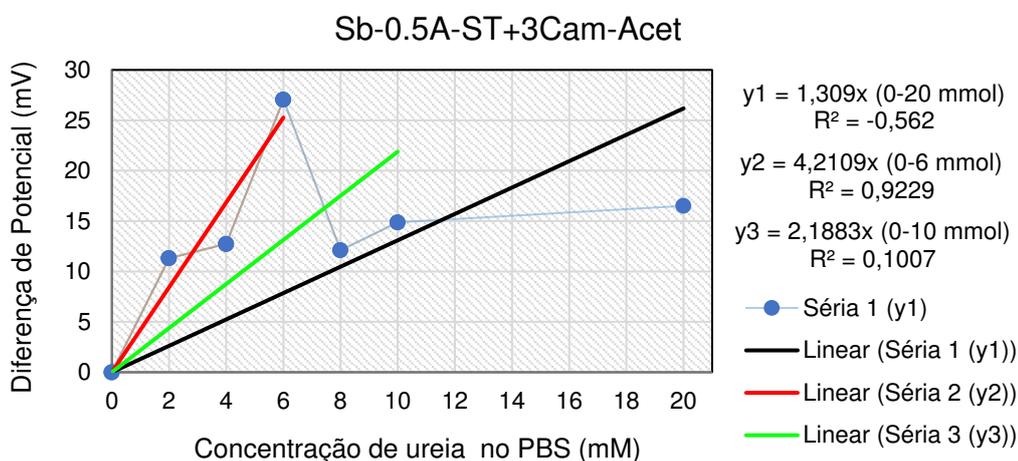
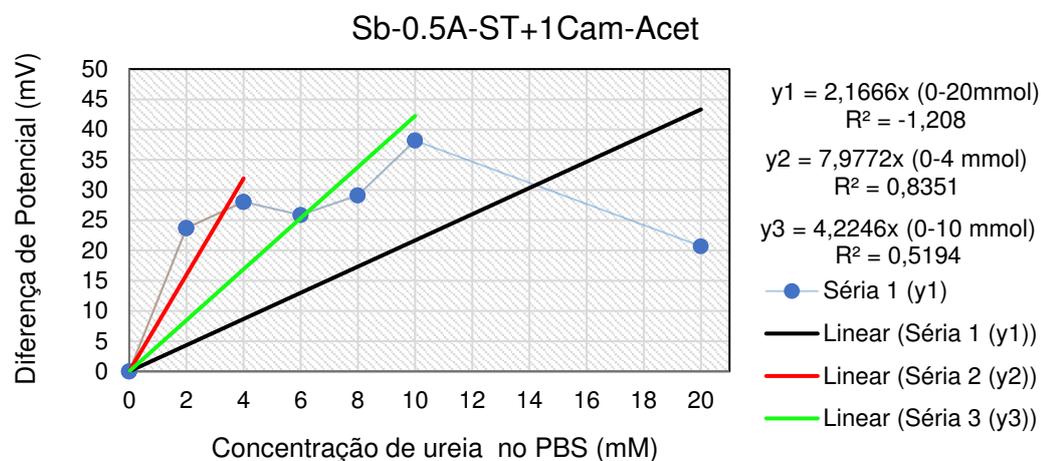
10. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



11. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



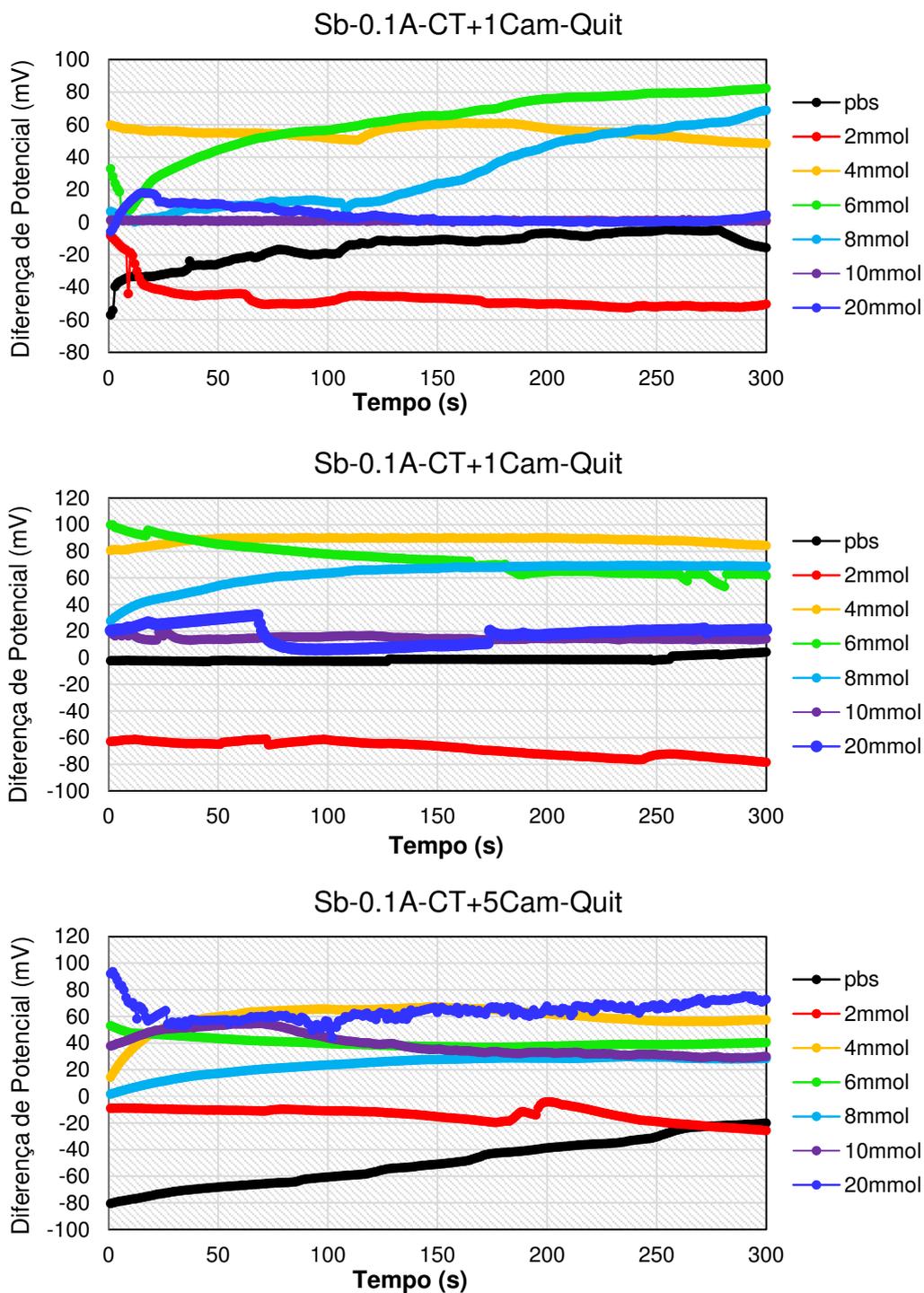
12. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



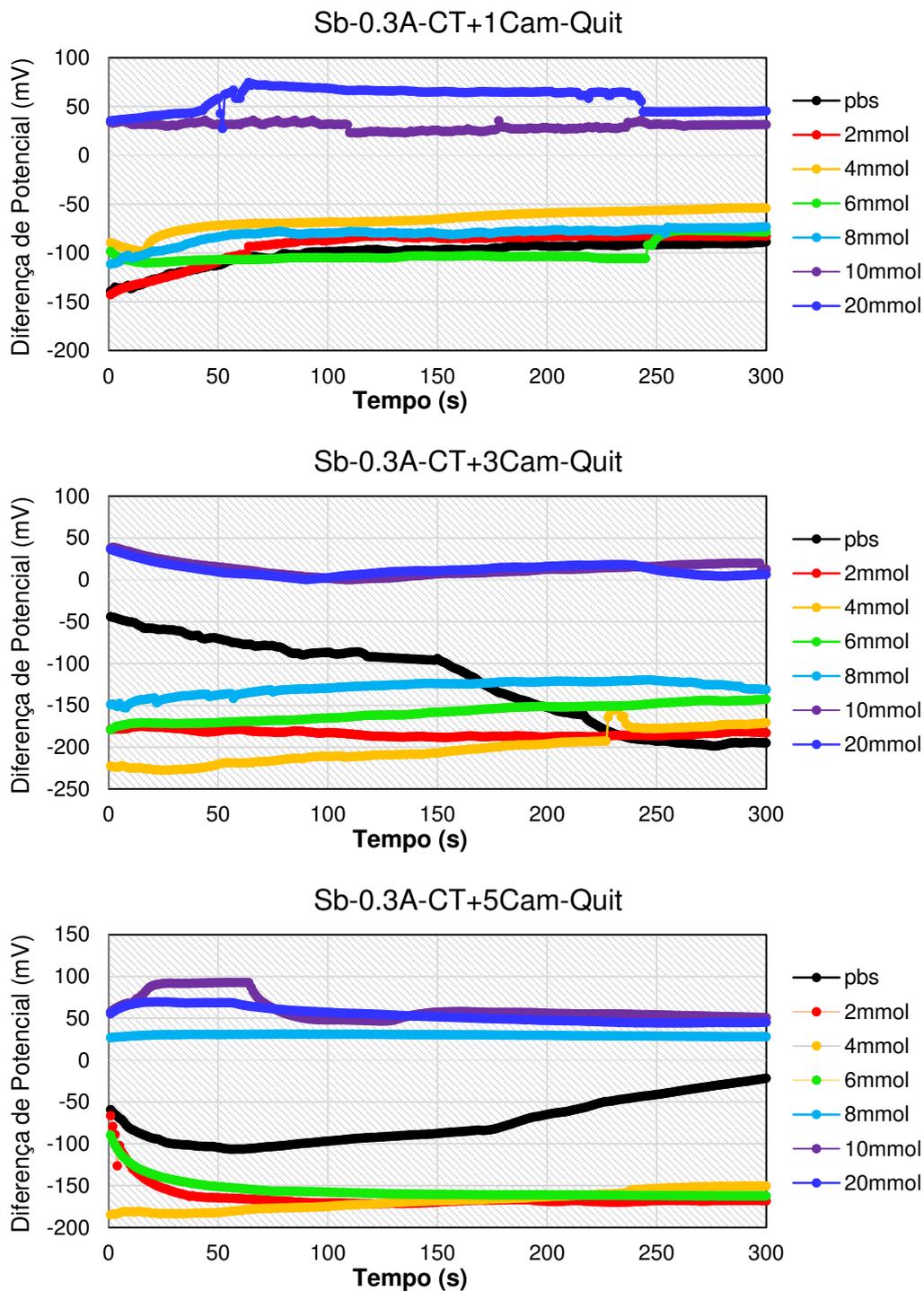
## **Anexo III**

### ***Período de Estabilidade dos Biossensores***

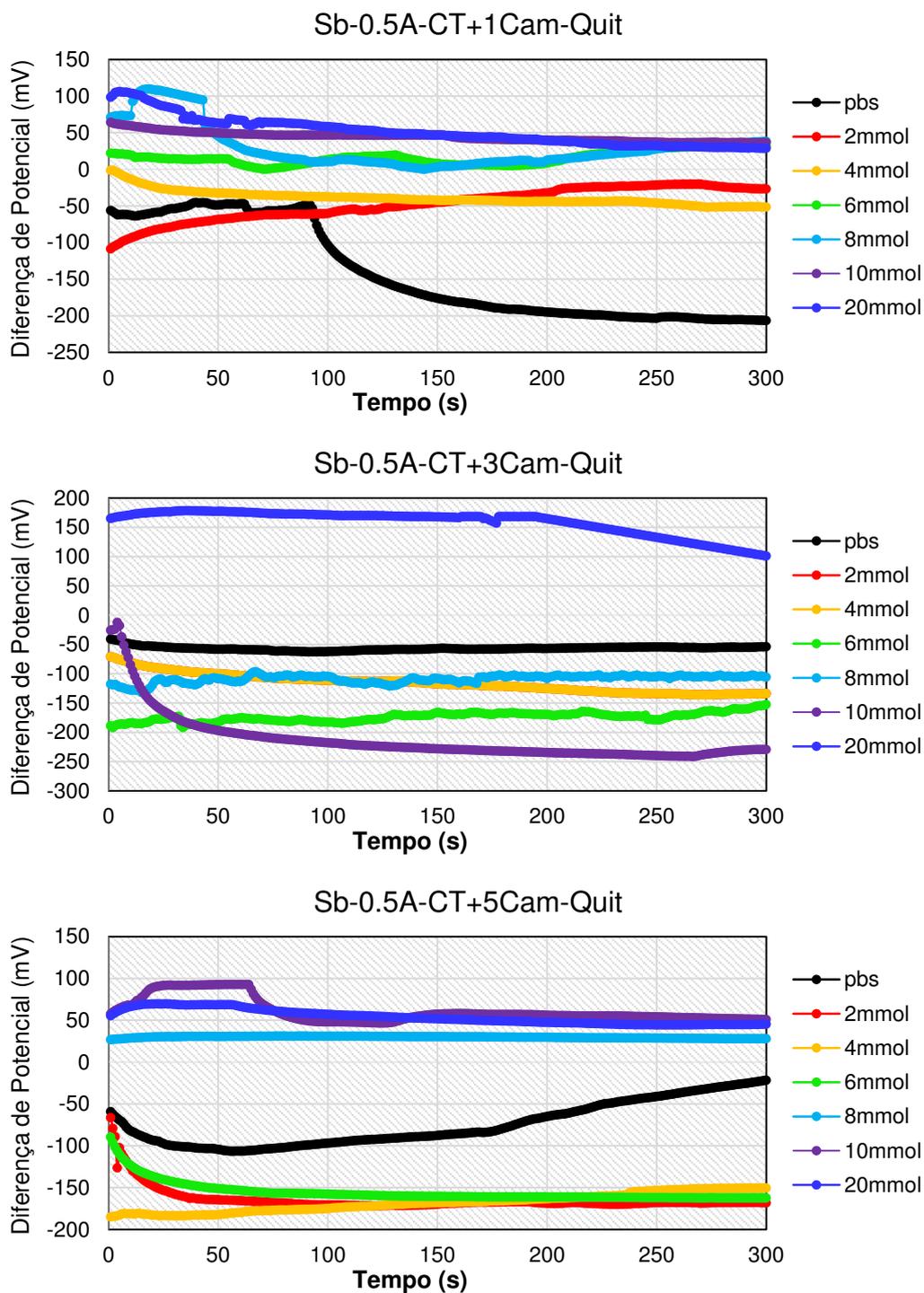
1. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



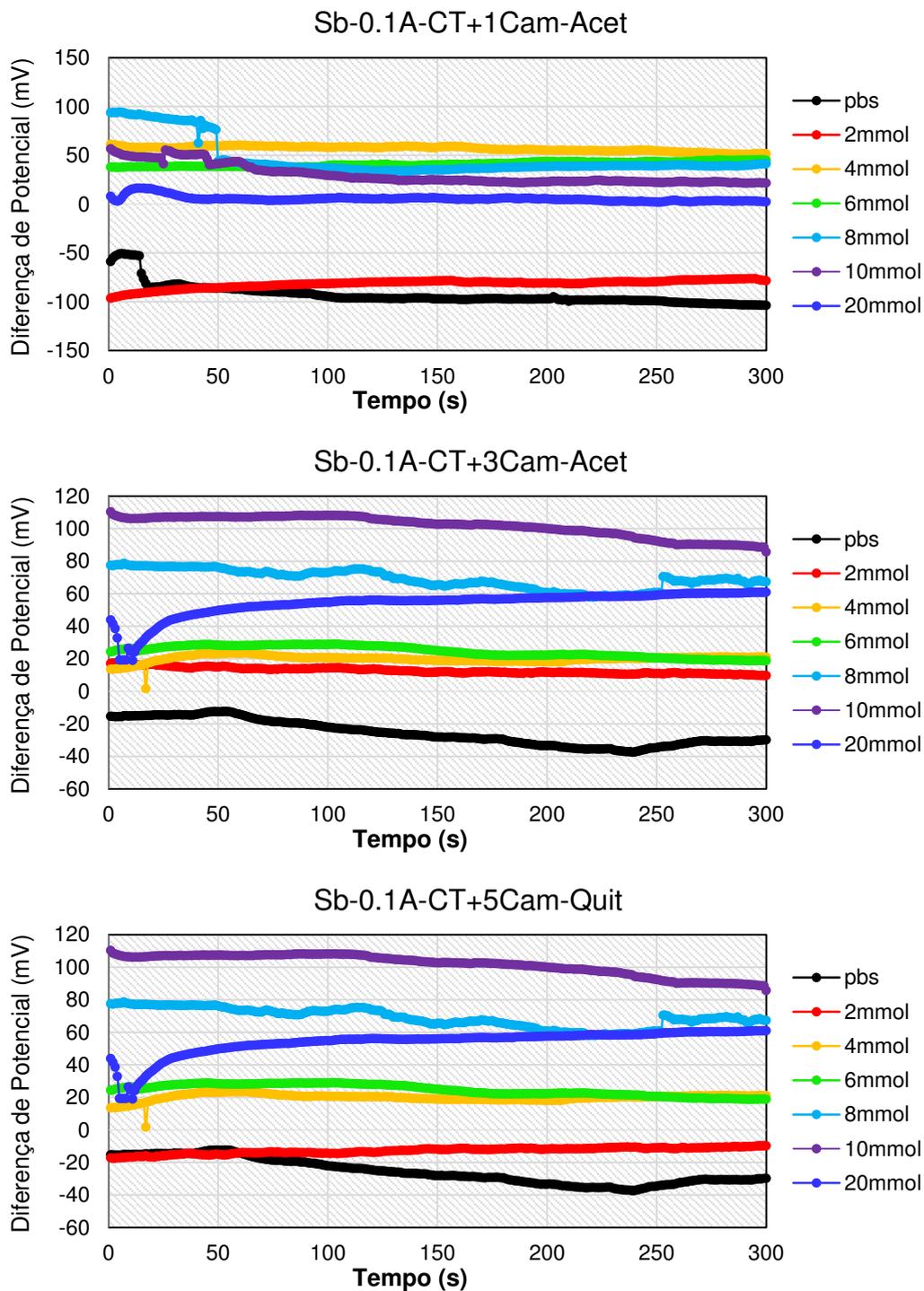
2. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



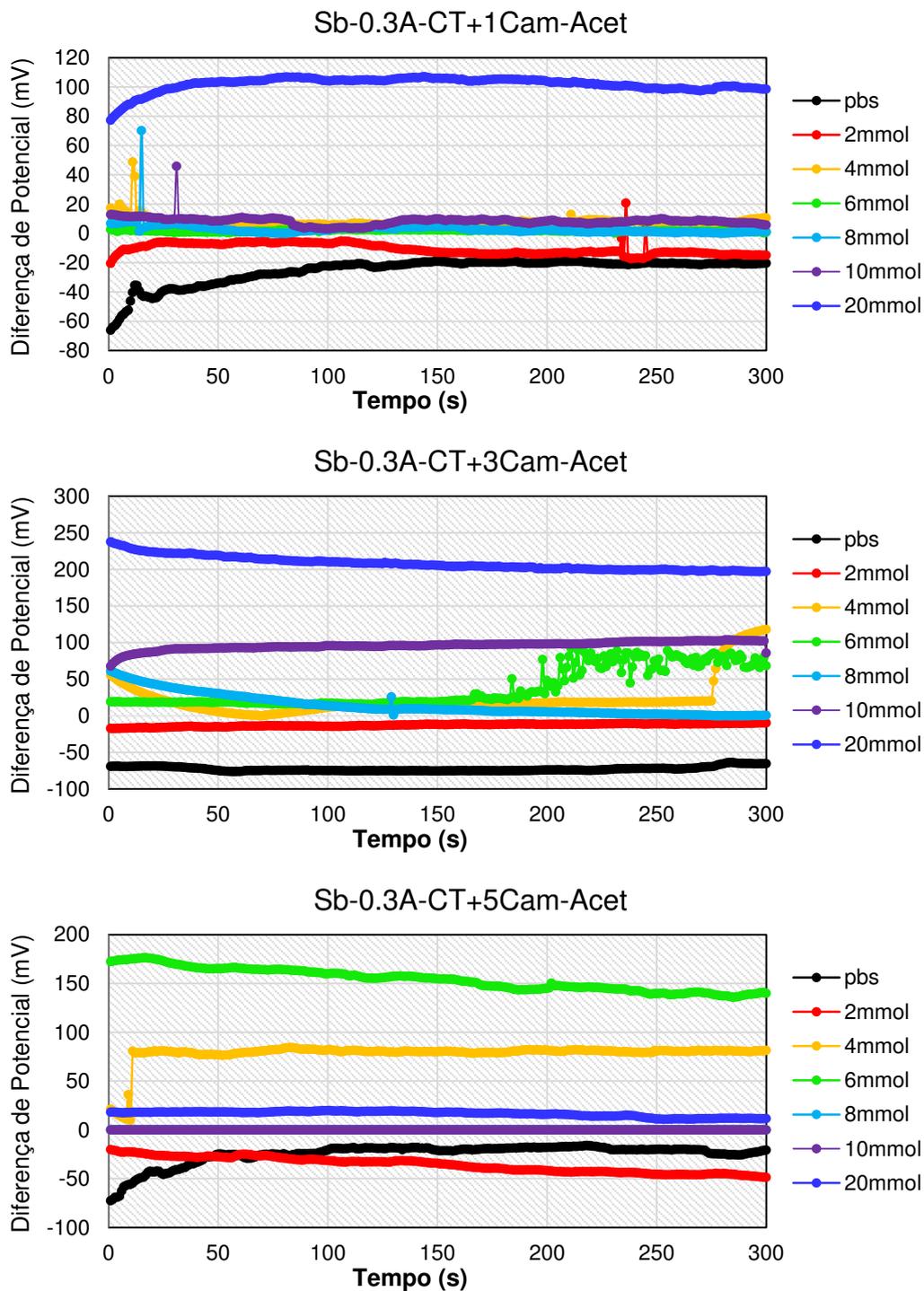
3. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



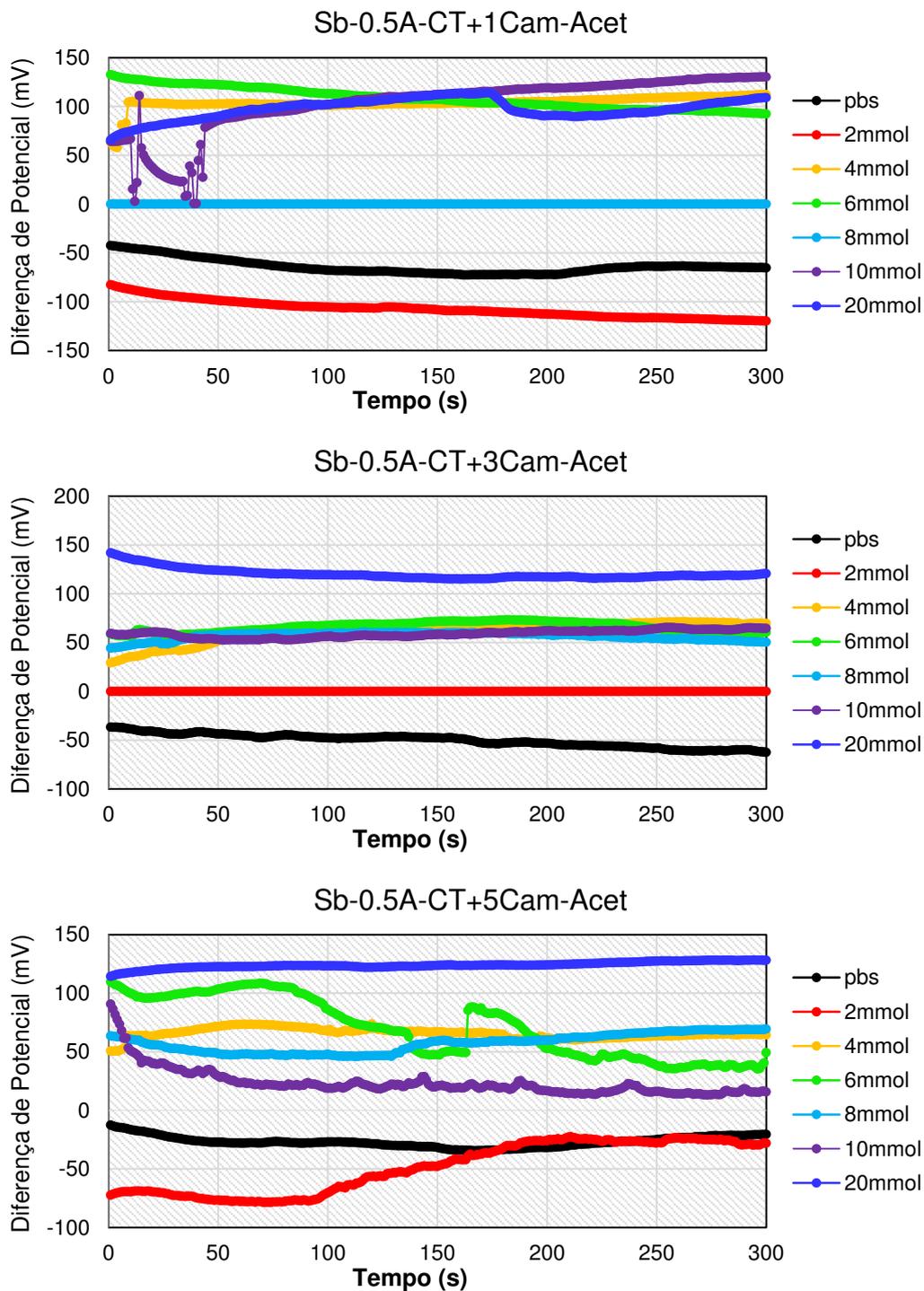
4. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



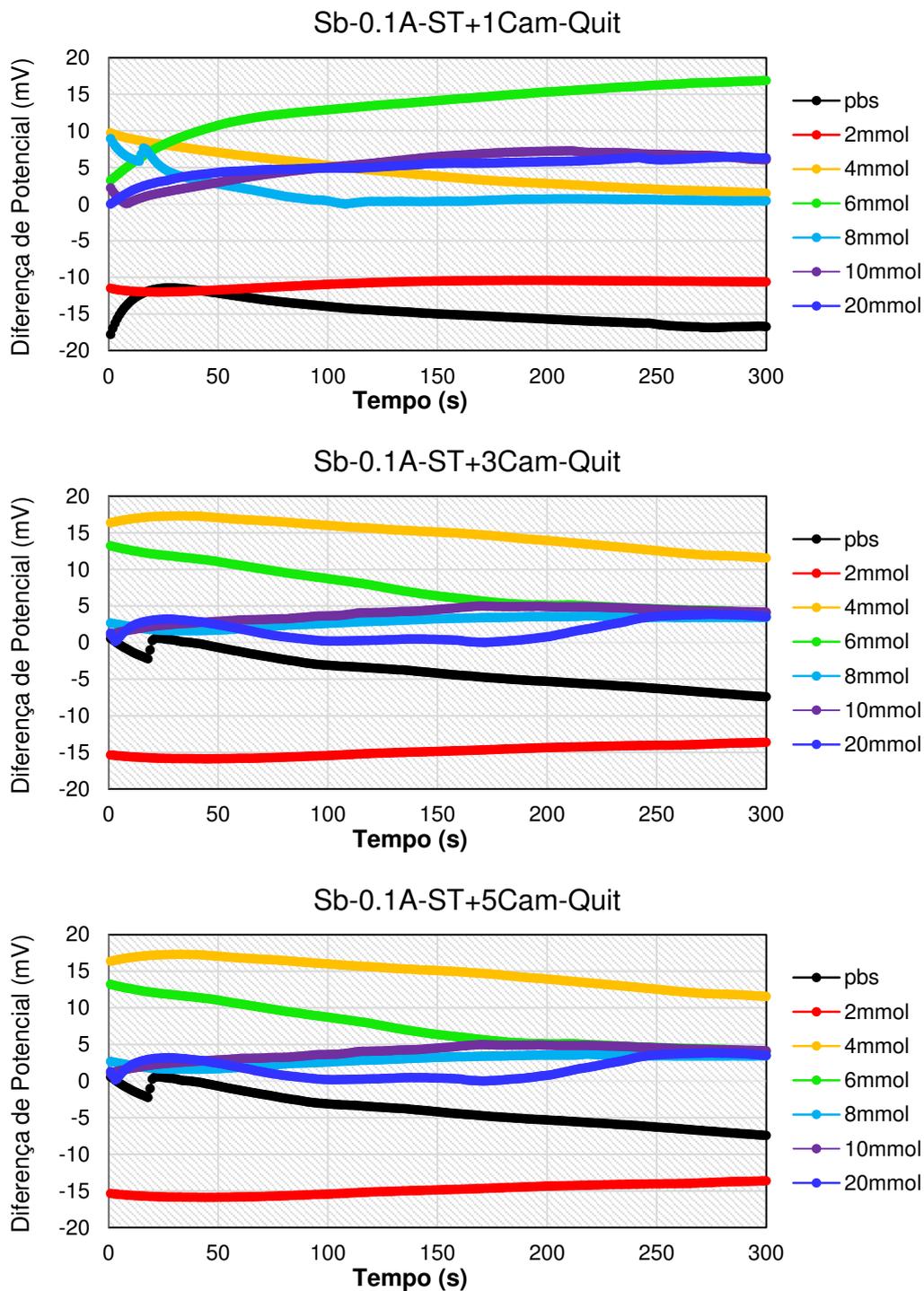
5. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



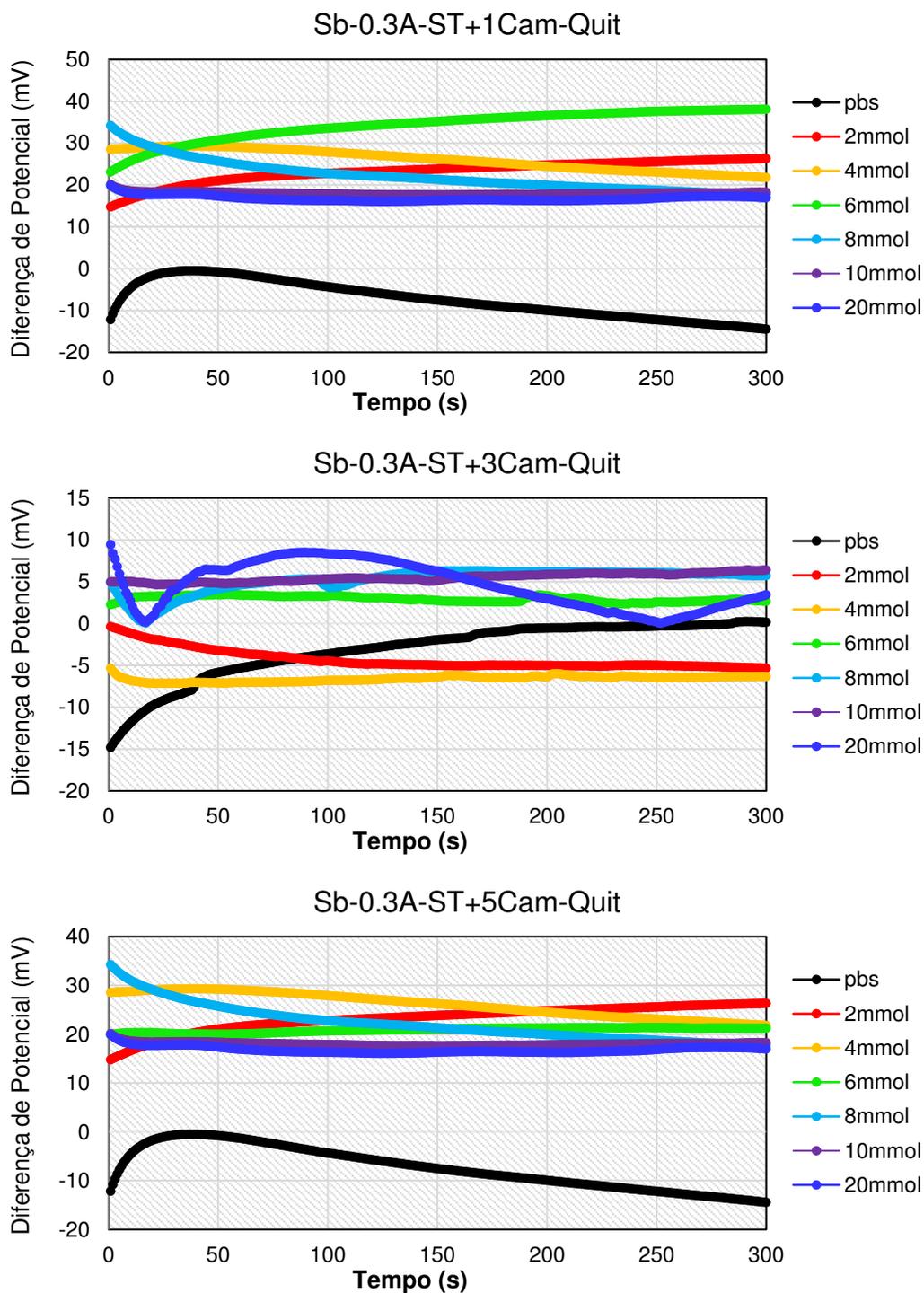
6. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere com tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



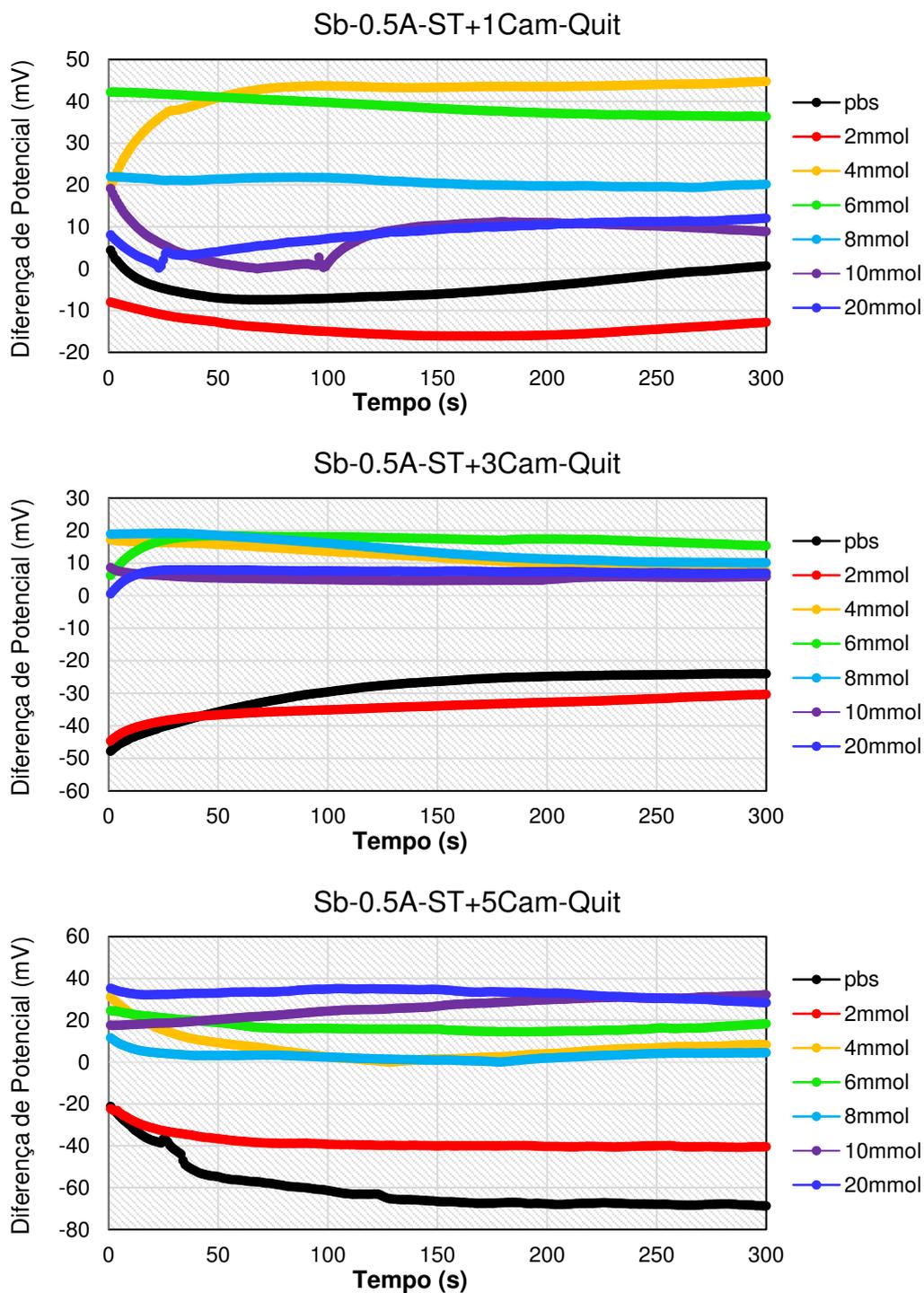
7. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



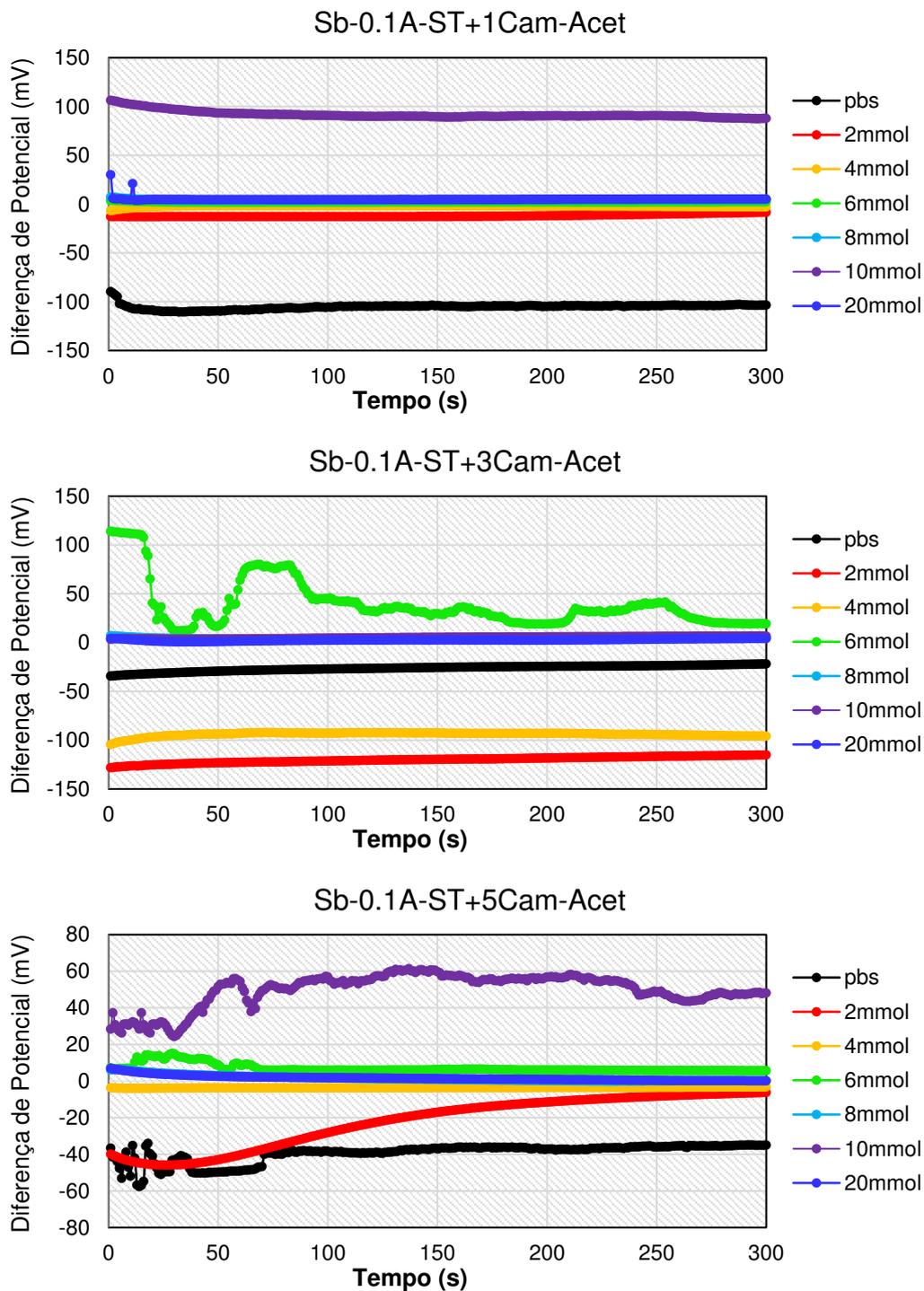
8. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



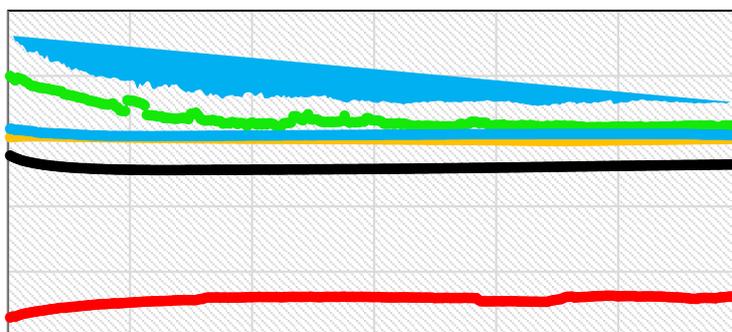
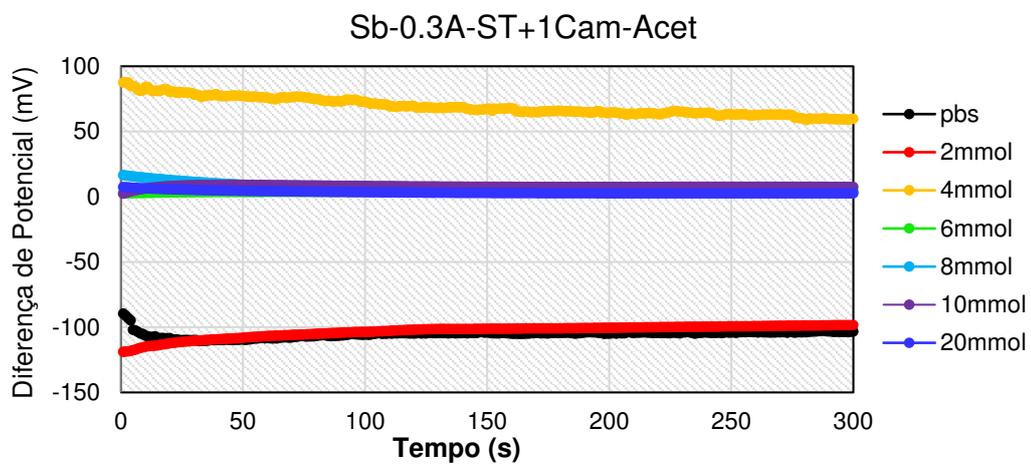
9. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de quitosana.



10. Biossensor de antimônio a 0.1 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



11. Biossensor de antimônio a 0.3 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.



12. Biossensor de antimônio a 0.5 ampere sem tratamento térmico com 1, 3 e 5 camadas de acetato de celulose.

