

## **I – Objectivo**

---

Este trabalho tem como objectivo a comparação entre duas técnicas de imobilização, nomeadamente aprisionamento com pirrole e ligação covalente, através de biossensores baseados em eléctrodos “screen printed”, para a determinação da amina biogénica histamina.

## II – Introdução

### 2.1 – AMINAS BIOGÉNICAS

#### 2.1.1 Funções:

As aminas biogénicas, e em particular as poliaminas, estão presentes em baixas concentrações nas células dos procariotas e eucariotas e desempenham funções reguladoras no crescimento. São formadas e degradadas durante o metabolismo normal dos animais, plantas e microrganismos. [1-5]

As aminas exercem funções fisiológicas importantes nos tecidos animais e vegetais. São fontes de azoto e são precursores da síntese de hormonas, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas. São importantes substâncias mensageiras e regulam o funcionamento celular. Nas plantas e nos animais, as poliaminas estão envolvidas em vários processos celulares como a divisão e diferenciação celular, regulação da expressão dos genes (através da alteração da estrutura do DNA e modulando as cinases proteicas e os factores de transcrição), a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, manutenção da estabilidade membranar e dos ácidos nucleicos e nas repostas ao stress oxidativo. Devido à diversidade das suas funções no metabolismo celular e no crescimento, são requeridas em elevados níveis nos tecidos em rápido crescimento. Todas as células possuem a capacidade de produzir poliaminas, contudo durante o crescimento e o envelhecimento celular o seu conteúdo em poliaminas diminui. [6-16]

#### 2.1.2 Classificação: [8, 17-25]

As aminas podem ser classificadas em função do número de grupos amina, da estrutura química e da via sintética.

- Quanto ao número de grupos amina na molécula classificam-se em monoaminas (ex: tiramina, feniletilamina), diaminas (ex: histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (ex: espermina, espermidina e agmatina).

- Relativamente à sua estrutura química, podem ser alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterociclícas (histamina e triptamina).

A espermina e espermidina são formadas *in situ* nas células à medida que são requeridas, com a agmatina e a putrescina como intermediárias.

- Quanto à via sintética as amins biogénicas derivam essencialmente da descarboxilação dos aminoácidos do respectivo precursor, através de enzimas substrato específicas resultantes de microrganismos, ou alternativamente devido à aminação e transaminação de aldeídos e cetonas. A descarboxilação dos aminoácidos ocorre pela remoção do grupo  $\alpha$ -carboxilo formando a amina correspondente.

As monoaminas tiramina e fenilalanina, são formadas a partir da tirosina e feniletilamina. As diaminas, histamina, triptamina e serotonina, putrescina e cadaverina, como se observa na Figura 1, formam-se a partir da histidina, triptofano, ornitina e lisina, respectivamente. [24, 26]

A biossíntese das poliaminas é controlada por duas enzimas, ornitina descarboxilase (ODC) e S-adenosimetionina descarboxilase (AdoMetDC) e as poliaminas são formadas a partir da metionina e da ornitina (Fig. 1). A metionina fornece o grupo aminopropil necessário à conversão de putrescina nas poliaminas mais complexas. A síntese é realizada através de duas enzimas aminopropiltransferases, espermina e espermidina sintetase. As plantas e os microrganismos também podem produzir putrescina através da actividade da arginina descarboxilase (ADC). [18]

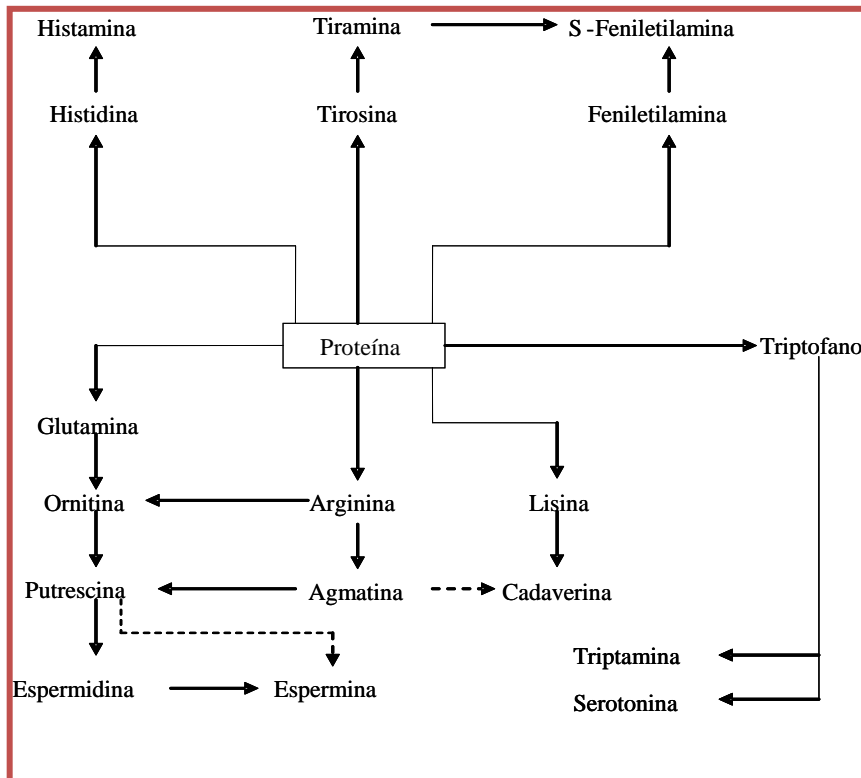


Fig. 1 - Circuitos da formação das aminas biogénicas e das poliaminas. (adaptado de [26])

### 2.1.3 Aminas Biogénicas e os Alimentos:

As aminas estão presentes numa larga variedade de produtos alimentares como o chocolate, bolachas de água e sal, peixe e produtos piscícolas, cerveja, vinho tinto, queijo, etc. São formadas em processos metabólicos ou através de actividade microbiana. [19,21,27-31]

Os pré-requisitos para a formação de elevadas quantidades de aminas biogénicas nos alimentos são a existência de aminoácidos livres, a presença de microrganismos descarboxilase-positivos e condições favoráveis ao crescimento bacteriano e à actividade microbiana. As aminas podem ser constituintes naturais de alguns alimentos: por exemplo a tiramina e a serotonina estão presentes em alguns vegetais e frutos; e a putrescina, igualmente relacionada com a degradação dos alimentos, também se pode encontrar em alguns vegetais e frutos. No decorrer da deterioração dos alimentos é usual observar-se um aumento da concentração de aminas biogénicas. Tal pode ser determinado electroquimicamente por biosensores. [5, 11, 30, 32]

A amina biogénica estudada no presente trabalho foi a histamina daí ela ser descrita, seguidamente, mais pormenorizadamente.

#### 2.1.4 Histamina: [33]

A histamina é uma amina biogénica, quimicamente, 2-(4-imidazolil)-etilamina, ou β aminoetilimidazol sendo formada a partir da L-histidina pela acção da histidina descarboxilase conforme representado na figura 2.

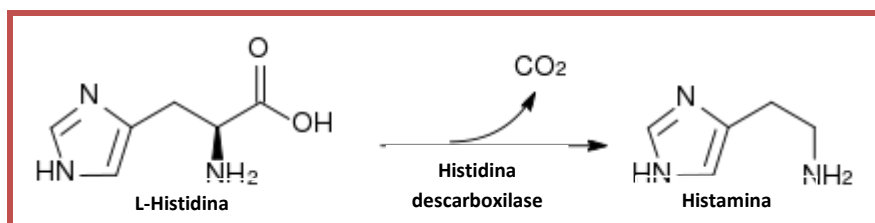


Fig.2 – Formação da histamina a partir da L-histidina, por acção da histidina descarboxilase. (adaptado de 33)

A sua constituição química compreende um anel imidazólico e um grupo amina, ligados por dois grupos metilo (Fig. 3).

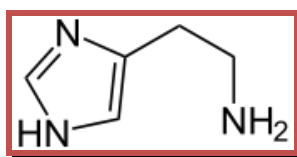


Fig.3 – Estrutura da histamina. (adaptado de 33)

Os principais locais de armazenamento e libertação da histamina são os mastócitos, amplamente distribuídos no organismo, sendo particularmente encontrados em associação com vasos sanguíneos e linfáticos, no tecido conjuntivo subepitelial da pele, ao redor de nervos periféricos e nos tratos gastrointestinal, respiratório, genital e urinário.

Além dos mastócitos, os basófilos e os neurónios no sistema nervoso central (SNC) são outros locais de armazenamento e de libertação de histamina. Está portanto amplamente distribuída pelo organismo, encontrando-se em maiores concentrações na pele, pulmões e mucosa gastrointestinal, dependendo da densidade dos mastócitos.

Após libertação, a histamina, exerce numerosas acções nos sistemas nervoso, endócrino e imune através da interacção com três receptores farmacologicamente diferentes, H1, H2 e H3, membros de uma família de receptores acoplados a proteínas G.

Tabela 1- Efeito da interacção da histamina com os receptores H1, H2 e H3.

Receptores	Ação
H1	<ul style="list-style-type: none"><li>- Efeitos biológicos relacionados principalmente aos processos inflamatórios e alérgicos como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e secreção de muco;</li><li>- função fisiológica como inibidor da libertação de neurotransmissores, particularmente no SNC e no tracto gastrointestinal.</li></ul>
H2	<ul style="list-style-type: none"><li>- medeiam a secreção ácida, o relaxamento do músculo liso vascular, a excitação neuronal, a inibição da desgranulação basófila e o aumento da contractilidade do miocárdico.</li></ul>
H3	<ul style="list-style-type: none"><li>- regulação da libertação autócrina de histamina em tecidos nervosos.</li></ul>

## 2.2 – BIOSENSORES

### 2.2.1 Definição

A IUPAC propôs a seguinte definição para biossensor:

“Um biossensor é um dispositivo que é capaz de fornecer informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que é mantido em contacto directo com um elemento transdutor” (fig.4) [34]. O receptor bioquímico transforma a informação (normalmente a concentração de um analito) procedente de uma amostra num sinal químico ou físico com uma dada sensibilidade [35].

O elemento transdutor traduz o sinal proveniente do receptor bioquímico num sinal secundário, geralmente de domínio electroquímico, dependendo do tipo de transdutor utilizado [35].

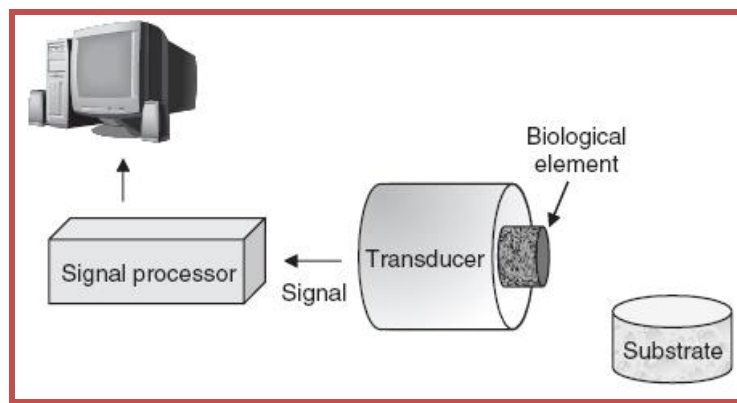


Fig. 4 – Esquema de um Biossensor. (adaptado de [38])

### 2.2.2 Classificação

A classificação dos sensores e biossensores pode realizar-se atendendo a diferentes critérios, tais como, o tipo de receptor utilizado, a metodologia empregue para imobilizar este receptor ou o tipo de transdutor utilizado, sendo esta última a mais aceite [36].

Segundo este último critério, os biossensores podem ser classificados como:

- a) Electroquímicos: o sinal obtido é devido a uma interacção electroquímica entre o analito e o eléctrodo;
- b) Ópticos: a resposta que é originada deve-se a uma interacção óptica entre o analito e o eléctrodo. Sendo assim são baseados na medição do consumo da luz emitida ou absorvida como consequência de uma reacção bioquímica;
- c) Piezo-eléctricos: estes dispositivos envolvem a geração de correntes eléctricas a partir da vibração de um cristal de quartzo. Esta frequência de vibração é afectada pela massa do material absorvido na superfície do eléctrodo;
- d) Térmicos: medem a produção ou absorção de calor sobre a superfície do eléctrodo [36,37]

No presente trabalho, os biossensores utilizados são electroquímicos e miniaturizados.

Os biossensores electroquímicos combinam o poder das técnicas electroquímicas com a especificidade dos componentes biológicos. São também dispositivos de baixo custo, fáceis de serem fabricados em qualquer formato e tamanho, proporcionando a realização de análises *in situ* sensíveis e selectivas. Estas características únicas associadas à tecnologia electroquímica dos biossensores converteu-os num método alternativo com muitas aplicações na análise de amostras reais.

Algumas vantagens a serem consideradas são, por exemplo, a sua elevada selectividade e especificidade, custos de construção e armazenamento relativamente baixos, possíveis de serem miniaturizados e uso de equipamentos simples o que proporciona rápidas análises [38].

### 2.2.3 Biossensores electroquímicos miniaturizados

Estes tipos de biossensores foram desenvolvidos principalmente nos últimos 30 anos, quando os biossensores electroquímicos começaram a ter grande importância, especialmente na indústria. As vantagens destes são que se podem aplicar tecnologias de miniaturização na fabricação de eléctrodos, o que facilita a produção de grandes quantidades de biossensores, reduzindo-se assim o custo de fabricação e assegurando uma grande reprodutibilidade. Desta maneira, é possível a integração numa área reduzida dos três eléctrodos requeridos habitualmente para a realização de medidas electroquímicas [39].

Outra das vantagens que apresenta o uso de biossensores miniaturizados, é o consumo mínimo de reagentes, uma vez que, dispor de uma área de trabalho muito menor, requer menos quantidade de material biológico para a sua fabricação o que permite trabalhar com volumes de amostra mais pequenos. Por outra parte, estas dimensões reduzidas permitem realizar análises rápidas e *in situ*. No entanto, apresentam como desvantagem o uso de instrumentação muito mais sensível pois o sinal obtido vai ser muito menor [40].

No presente trabalho, a tecnologia de miniaturização utilizada foi a “*thick film*”, ou seja, a tecnologia de “capa espessa/grossa”.

### 2.2.4 Eléctrodos serigrafiados

A tecnologia “*thick film*” consiste na utilização de uma série de técnicas que permitem construir eléctrodos planos no estado sólido aplicando sequencialmente capas de diversos materiais (pastas ou tintas) sobre um suporte ou substrato. Ainda que existam uma grande variedade de técnicas de deposição esta faz-se normalmente por serigrafia [41].

#### 2.2.4.1 Construção de Eléctrodos serigrafiados

Previamente à fabricação dos eléctrodos é necessária uma etapa na qual se seleccionam os desenhos dos eléctrodos e os materiais que se vão usar [41].

##### A) Matriz [41]

A matriz, na qual se desenha previamente o original dos eléctrodos que se vão imprimir, é composta por uma malha de filamentos que se entrecruzam deixando uns buracos quadrados finos e que se encontra “tensa” num marco, geralmente de alumínio (fig.5). As malhas que contêm o desenho deixam-se livres, enquanto as restantes são obstruídas por uma solução de cola.

Uma matriz deve ser fácil e rápida de preparar, possuir uma boa definição, ter durabilidade para grandes tiragens e ser resistente às tintas.

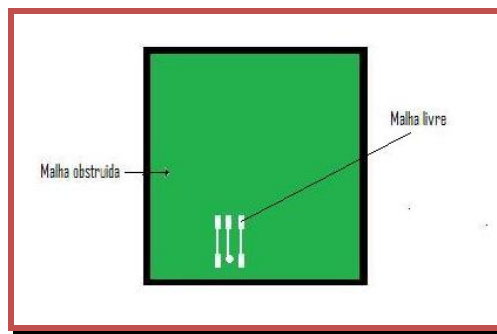


Fig 5 - Matriz serigrafiada.

A selecção da malha adequada é de extrema importância para a fabricação, uma vez que, é desta que depende a quantidade de tinta necessária para a impressão e, como tal, a grossura da capa depositada. Os factores que influenciam na selecção deste parâmetro são tanto a resolução que é necessária nos dispositivos como o tipo de tinta a utilizar.

A área não obstruída da malha depende do número de filamentos e do seu diâmetro. Assim sendo, a um diâmetro e a número de linhas pequeno corresponde a uma área relativamente grande e, como tal, um elevado volume de tinta depositada.

O tecido que antigamente se utilizava para a sua fabricação era a seda ou gaze. Actualmente as matrizes são de poliéster (tecido mais utilizado pois tem boa elasticidade, resistência, durabilidade e oferece pouca resistência ao movimento da paleta encarregada de aplicar a tinta), nylon (é o mais elástico de todos, e é muito

utilizado para depositar tintas em superfícies que não são planas) e malhas metálicas muito finas (cuja principal vantagem é a sua alta resolução o que permite formar motivos de tamanhos muito reduzidos).

## B) Materiais [41]

São usados três tipos de materiais: o substrato, as tintas/pastas e o elemento sensor.

### B.1) Substrato:

O substrato é o material de suporte sobre o qual se imprimem as partes funcionais do sensor. Deve ser inerte, de baixo custo e ser compatível com os restantes elementos do sensor.

O PVC devido às suas propriedades dieléctricas, ser quimicamente inerte e ter um baixo custo é o substrato mais utilizado. No entanto, a cerâmica de alumínio, o policarbonato, nitrocelulose e fibra de vidro também poderão ser usados.

### B.2) Tintas/Pastas

As tintas ou pastas são depositados sequencialmente sobre o substrato.

Existe uma grande variedade delas com diferentes propriedades químicas e físicas (tais como, viscosidade, condutividade, resistência térmica, resistência à água entre outras) usadas na construção de biossensores.

As pastas são formadas por:

- 1) um agente aglomerante (p. ex. resinas);
- 2) solvente (p. ex. terpinol, etilenoglicol etc) que deve ser escolhido baseado na solubilidade do agente aglomerante e na volatilidade.
- 3) Aditivos que conferem as características funcionais à pasta.

Esta pode ser classificada em 2 categorias, consoante o aditivo adicionado:

- condutora: na qual se adicionam materiais condutores tais como, ouro, platina, prata ou grafite;
- dieléctrica: onde se incorporam aditivos baseados em óxidos metálicos.

### B.3) Elemento sensor [41]

O elemento sensor é o receptor bioquímico do qual faz parte o biossensor. Este pode ser directamente incorporado na pasta ou ser fixado sobre a superfície do eléctrodo aplicando os métodos de imobilização já mencionados.

### C) Desenho e fabricação dos eléctrodos [41-43]

c.1) Depois de seleccionados os materiais, inicia-se o processo de serigrafia que consiste em fazer passar uma tinta através de uma matriz de modo a ser depositada sobre um substrato plano com o objectivo de imprimir os eléctrodos. Assim sendo, é obtido um desenho esquemático dos eléctrodos, definidos pelos poros existentes na matriz (fig.6);

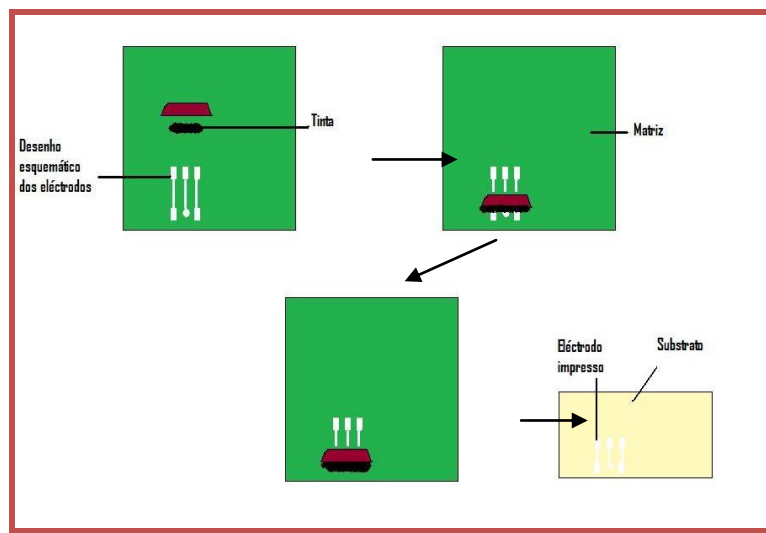


Fig. 6- Representação esquemática do processo de serigrafia.

c.2) A partir da combinação sucessiva de diferentes matrizes e distintas tintas conseguem-se fabricar os distintos eléctrodos (trabalho, referência e auxiliar) (figs. 7 e 8);

c.3) A etapa final da impressão consiste na aplicação de uma capa parcial de isolante de modo a definir uma área, numa das extremidades, em que se irá realizar o contacto eléctrico e outra área, na outra extremidade, que será a superfície do eléctrodo (figs. 7 e 8).

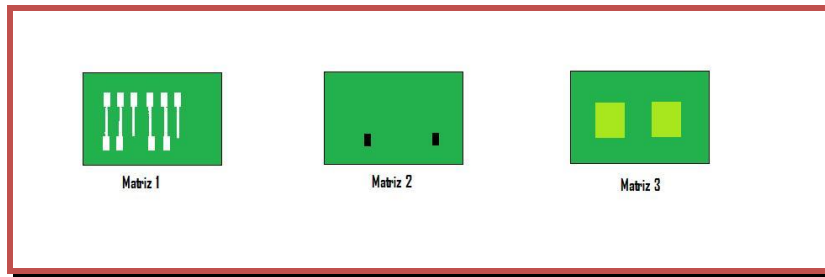


Fig. 7 – Representação esquemática das diferentes matrizes utilizadas na construção de eléctrodos serigrafiados.

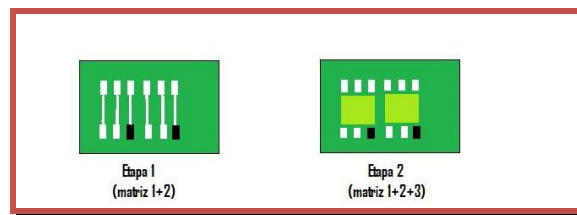


Fig. 8 – Combinação das diferentes matrizes usadas no processo de serigrafado.

Assim sendo, as etapas básicas de fabricação dos eléctrodos serigrafiados são a selecção de matriz, preparação ou selecção de tintas, selecção do suporte, impressão, secagem.

A secagem muitas vezes realiza-se apenas numa única etapa aplicando temperaturas que variam desde a temperatura ambiente até aos 1000°C. Esta etapa é necessária antes de realizar a impressão da camada seguinte.

No caso de se pretenderem eléctrodos com propriedades condutoras, a primeira capa adicionada é uma tinta ou pasta com características que conferem condutividade eléctrica aos mesmos, tais como, carbono, prata, ouro, entre outros.

A técnica de serigrafia permite a construção do eléctrodo de trabalho de forma isolada, do eléctrodo de trabalho juntamente com o de referência ou a fabricação conjunta dos três eléctrodos.

Uma vez terminado o processo de fabricação os dispositivos são individualizados procedendo-se à sua utilização.

### 2.2.5 Construção de biossensores electroquímicos

Para a construção de biossensores electroquímicos as considerações mais importantes a ter em conta são:

- 1) Aplicação da técnica electroquímica apropriada;
- 2) A imobilização do bio-receptor;
- 3) No caso da técnica aplicada ser a amperometria ter em conta o estabelecimento de uma transferência electrónica eficiente [44].

#### 2.2.5.1 Técnicas de medição electroquímica

Existem 3 processos usados pelos transdutores electroquímicos para determinar o sinal proveniente do receptor bioquímico: potenciometria, voltametria e conductometria.

##### a) Potenciometria

As medidas potenciométricas envolvem a determinação da diferença de potencial entre um eléctrodo de trabalho e um de referência ou entre dois eléctrodos de trabalho quando não há corrente entre eles, ou seja, quando a intensidade de corrente é zero [35,38]

Os transdutores mais utilizados neste tipo de técnica podem ser eléctrodos selectivos de iões (ISE- ion-selective electrode), que sofrem uma alteração no potencial de membrana, quando contactam com a solução que contem o analito, como consequência de alterações na densidade da membrana; eléctrodos de pH, de iões ( $F^-$ ,  $I^-$ ,  $CN^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $NH_4^+$ ) ou de gases ( $CO_2$ ,  $NH_3$ ). [35,38]

A diferença de potencial medida entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência é directamente proporcional ao logaritmo da actividade iónica ou concentração e pode ser descrita pela equação de Nernst-Donnan:

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln \left( a_i + \sum_j k_{i,j}^{pot} * a_j^{z_i/z_j} \right) \quad (1)$$

onde  $a_i$  é a actividade do ião principal,  $a_j$  a actividade do ião interferente,  $z_i$  e  $z_j$  as cargas dos iões principal e interferentes, e  $k_{i,j}^{pot}$  o coeficiente de selectividade [35,36].

#### b) Voltametria

O termo voltametria abrange técnicas através das quais a intensidade de corrente é medida por aplicação de um potencial fixo entre os eléctrodos de trabalho e referência numa célula electroquímica que contém uma elevada concentração de um determinado electrólito (que faz com que a solução seja condutora) – chamado electrólito de suporte – e espécies oxidáveis ou reduzíveis – espécies electroactivas [36].

A amperometria é um método voltamétrico baseado na medição de corrente resultante da oxidação ou redução electroquímica de espécies electroactivas. Este método é realizado mantendo um potencial constante sobre um eléctrodo de trabalho, geralmente, Pt, Au ou C em relação a um eléctrodo de referência, que também pode servir de eléctrodo auxiliar se a corrente for baixa (de  $10^{-9}$  a  $10^{-6}$  A) [35,38].

Esta técnica fundamenta-se na proporcionalidade existente entre a concentração de uma determinada espécie electroactiva e a corrente eléctrica registada ao oxidar-se ou reduzir-se sobre a superfície do eléctrodo. Esta relação intensidade-concentração é dada pela lei de Faraday, segundo a equação:

$$I = \frac{nFAD^{1/2}C_{ox}}{\delta} \quad (2)$$

onde  $F$  é a constante de Faraday,  $A$  a área do eléctrodo de trabalho,  $D$  o coeficiente de difusão,  $C$  a concentração do analito e  $\delta$  o tamanho da capa de difusão [36].

Estes são os biossensores electroquímicos mais utilizados devido à sua elevada sensibilidade, rapidez e baixo custo [38].

#### c) Conductimetria

Os biossensores condutimétricos são baseados no facto de muitas reacções bioquímicas em solução originarem alterações na resistência eléctrica. A condutância envolve assim a determinação das medidas de resistência de uma solução que é colocada entre um par de eléctrodos metálicos. Os transdutores utilizados nesta técnica têm como vantagens não exigirem eléctrodo de referência, não serem sensíveis à luz, a voltagem utilizada pode ser suficientemente baixa o que leva a uma significativa diminuição do consumo de energia e diferentes analitos com diferentes naturezas podem ser determinados com base em diferentes mecanismos. No entanto têm como desvantagem terem uma baixa sensibilidade [36-38].

### 2.2.5.2 Imobilização do bio-receptor

#### 2.2.5.2.1 Receptores biológicos

Os receptores biológicos são substâncias que se unem a um substrato em particular mas não a outros. Existem diferentes tipos de receptores, tais como:

- A) Enzimas;
- B) Anticorpos;
- C) Ácidos Nucleicos;
- D) Receptores químicos.

#### A) **Enzimas**

As enzimas são os receptores biológicos mais usados. Podem ser usadas na forma purificada ou então estarem presentes em microrganismos ou em tecidos intactos. Elas actuam como catalisadores biológicos de reacções particulares e ligam-se a substratos específicos.

A actividade catalítica da enzima é influenciada por diversos factores, nomeadamente o pH e força iónica do meio e a temperatura. Todos estes factores afectam a estabilidade do biossensor [36].

As enzimas têm vantagens e desvantagens aquando da sua utilização como biossensores, apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Vantagens e desvantagens do uso de enzimas como receptores biológicos. (adaptado [36])

Vantagens	Desvantagens
Ligam-se ao substrato	Elevado custo
Altamente selectivas	Perda de actividade aquando da sua imobilização no transdutor
Têm actividade catalítica, melhorando assim a sensibilidade	Perda de actividade por desactivação por um período de tempo relativamente curto (tempo de vida curto)
Actuam rapidamente	

Na construção de biossensores enzimáticos, as enzimas habitualmente são imobilizadas na forma purificada. No entanto, a estabilidade da enzima no seu estado puro não é muito grande e os custos associados ao processo de isolamento da enzima

são elevados. Assim sendo, em muitas ocasiões microorganismos bem como parte de tecidos intactos de animais ou plantas, são usados como fontes de actividade enzimática [36].

Os tecidos animais e vegetais podem ser usados directamente com uma preparação mínima. A sua utilização apresenta algumas vantagens, relativamente ao uso da enzima no estado puro, uma vez que a enzima presente em tecidos tem tendência a degradar-se menos. No entanto, como desvantagem há uma perda de selectividade visto que os tecidos geralmente contêm um elevado número de diferentes enzimas. Assim sendo, para evitar este problema, inibidores enzimáticos e agentes estabilizadores são usados com o objectivo de melhorar a selectividade o tempo de vida tecido que contém a enzima. Outra das desvantagens é que a resposta dada pelo biossensor também é lenta devido à presença de materias no tecido que atrasa o contacto enzima-substrato e que pode enfraquecer o efeito das enzimas. Os primeiros documentos que descrevem a utilização de tecidos utilizados na construção de biossensores foram escritos por Sidewell Reichnits e por Wang e Linque. Estes autores determinaram a dopamina utilizando tecidos de banana. Microorganismos e mitocôndrias também têm sido usados como fontes de actividade enzimática [10].

As enzimas utilizadas no presente trabalho foram a Horse-Radish peroxidase (HRP) e a Diamina Oxidase (DAO).

#### A.1) **Horseradish Peroxidase (HRP):**

- Estrutura Química: [45]

As Peroxidases estão distribuídas pela natureza e podem ser extraídas facilmente da maioria das células das plantas e de alguns órgãos e tecidos animais. Pertencem à família das oxi-redutases, ou seja, das enzimas que catalisam reacções de oxi-redução nas quais ocorre transferência de hidrogénio ou electrões de um substrato a outro.

A Horseradish peroxidase (HRP, EC 1.11.1.1), a enzima utilizada no presente trabalho, foi das primeiras peroxidases a serem descobertas e a sua estrutura primária completa foi determinada em 1976 por Welinder.

A HRP é uma proteína heme com 308 resíduos aminoácidos (Fig. 9).



Fig. 9 - Representação da estrutura 3-D da HRP. [adaptado de 45]

É formada por um grupo heme prostético, o ferritoporfirina IX (fig. 10), que é constituído por 4 anéis de pirrol ligados a ferro (III), que se encontra no centro da molécula, por pontes de metano.

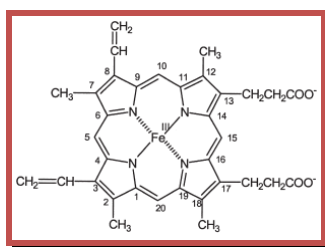


Fig. 10 - Estrutura do ferritoporfirina IX (2,7,12,18-tetramethyl-3,8-divinylporphine-13,17-dipropionic acid). [adaptado de 45]

Contém sete isoenzimas (diferentes formas moleculares da mesma enzima, que catalisam a mesma reacção bioquímica mas têm distintas propriedades físicas, cinéticas e químicas resultantes das pequenas diferenças existentes na sequência de aminoácidos).

#### - Mecanismo de reacção – Mecanismo Ping-Pong [48,49]

Desde que se conhece que a HRP é capaz de reduzir  $H_2O_2$  e alguns peróxidos orgânicos, os biossensores baseados na HRP podem ser usados para controlar e monitorizar estes peróxidos em diversas indústrias, tais como farmacêuticas, alimentares, ambientais, têxteis entre outras.

No mecanismo ping-pong estão envolvidos 2 substratos, um deles é a água oxigenada e o outro o analito que se pretende determinar, na presença da enzima HRP.

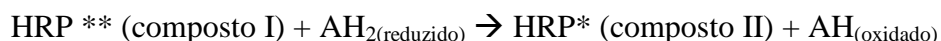
O grupo heme é essencial para a actividade da enzima que sofre alterações electroquímicas durante a reacção de oxidação indicam que o átomo de ferro participa no mecanismo de reacção.

A reacção global pode ser descrita da seguinte maneira:

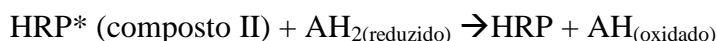
Inicialmente, o peróxido de hidrogénio vai oxidar o ferro do grupo heme da HRP, por transferência de 2 electrões, formando-se um composto intermediário, composto I;



- a) O composto I, HRP\*\*, sofre uma reacção de redução pela transferência de um electrão dador do analito, A:



- b) Um electrão adicional pode ser transferido de novo do analito e reduzindo novamente a enzima, fazendo com que ela volte ao estado nativo:



A monitorização da reacção enzimática é possível pela observação da redução de corrente que é proporcional à concentração de analito presente na solução.

#### A.2) **Diamina Oxidase (DAO)**: [53,54]

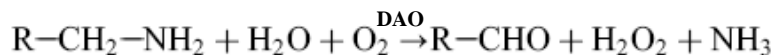
##### - Estrutura Química:

Diamine oxidase (EC 1.4.3.6) é uma enzima que pertence à família das oxi-redutases, ou seja, das enzimas que catalisam reacções de oxi-redução nas quais ocorre transferência de hidrogénio ou electrões de um substrato a outro e que contém cobre na sua constituição.

Além de cobre, possui um cofactor quinona orgânico, responsável pela sua característica cor-de-rosa e pelo seu mecanismo de acção que tem sido estudado desde 1960 mas só recentemente foi compreendido.

- Mecanismo de reacção:

Oxida aminas, produzindo o aldeído correspondente, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de acordo com a reacção global:



A oxidação do substrato envolve tanto os iões Cu (II) e o cofactor quinona onde a transferência de electrões entre ambos é mediada por uma rede integrada de água.

O mecanismo de reacção é do género ping-pong e ocorre em três passos:

- 1) Primeiramente, a amina liga-se ao co-factor quinona formando um complexo enzima-substrato;
- 2) De seguida, o complexo enzima-substrato é hidrolizado ocorrendo a libertação do aldeído correspondente à amina que sofre oxidação.
- 3) Na última etapa, a enzima a forma reduzida da enzima é regenerada para a sua forma nativa, pelo O<sub>2</sub>, com formação de dois produtos de reacção, NH<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

B) Anticorpos

Os anticorpos são os receptores biológicos que mais aumentam a sensibilidade dos biossensores.

São proteínas séricas com a capacidade de reconhecer, por associação estereoespecífica, uma substância estranha presente no organismo que ela invadiu. São produzidos células do sangue em resposta a uma substância estranha. Na maior parte dos casos, um anticorpo só irá ser reconhecido anticorpo na presença de outra substância uma denominada antigénio [38].

Os biossensores baseados em anticorpos necessitam de se ligar especificamente com o antigénio correspondente mas não têm qualquer actividade catalítica. Assim sendo, para aumentar a sensibilidade destes biossensores, por vezes, são acoplados ou isótopos radioactivos ou partículas luminescentes ou enzimas (sendo estas as mais utilizadas), entre outros, ao antigénio ou anticorpo [36,38].

A formação do complexo Ac-Ag é detectada sob condições onde as interacções não-específicas sejam minimizadas. Cada determinação de antigénio requer a produção do seu anticorpo correspondente, o seu isolamento e a sua purificação [35].

A determinação da corrente pelo transdutor é proporcional à concentração das espécies electroactivas geradas pela reacção enzimática [38].

### **C) Ácidos Nucleicos**

O emparelhamento entre os pares de bases distribuídos ao longo da dupla-hélice dos ácidos nucleicos dá origem ao código genético. Este determina as características de replicação dos membros de uma espécie. Assim sendo, este material é considerado de grande interesse na fabricação de biossensores [36].

As duas características necessárias para que os biossensores baseados em ácidos nucleicos tenham sucesso são alta especificidade e sensibilidade. [47] Tal como os anticorpos, os ácidos nucleicos não têm efeito catalítico. Como tal, por vezes, são acoplados com enzimas [36].

A detecção electroquímica da hibridação do DNA em biossensores é baseada no acompanhamento de alterações de intensidade da corrente, resultantes do reconhecimento dos pares de bases presentes na cadeia de DNA, a potencial controlado [38,47].

### **D) Receptores químicos**

Os receptores químicos são proteínas situadas na membrana celular que se ligam especificamente com uma determinada espécie. Esta ligação dá origem a alterações específicas a nível celular.

Estas alterações podem ser transformadas em sinais eléctricos mensuráveis que podem ser relacionadas com o analito que se pretende analisar [38].

### 2.2.5.2.3 Métodos de Imobilização

Para que um biossensor seja viável o componente biológico tem que ser devidamente depositado sobre o transdutor. Este processo é denominado por imobilização. Existem 5 métodos através dos quais se podem imobilizar os bioreceptores sobre o transdutor, tais como: adsorção; microencapsulação; aprisionamento; cross-linking e ligação covalente [36].

Para uma eficiente deposição da biomolécula esta deve satisfazer os seguintes pré-requisitos:

- a) A sua imobilização deve ser eficiente e estável sobre a superfície do transdutor, caso contrário o biossensor perde a sua actividade;
- b) Deve manter as suas propriedades biológicas e/ou catalíticas, após a imobilização;
- c) Deve ser compatível e quimicamente inerte em relação a estrutura em que vai ser imobilizada;
- d) Tem que estar acessível aquando da sua imobilização [44,48].

No presente trabalho os métodos de imobilização utilizados foram o aprisionamento e a ligação covalente daí estes serem descritos com mais detalhe.

#### 1) Adsorção

Este método de imobilização é o mais simples e o que envolve uma menor preparação. No entanto, a ligação entre o bioreceptor e o transdutor é fraca e, como tal, só pode ser aplicado por um curto período de tempo [36].

No caso do elemento biológico ser uma enzima, para realizar a adsorção desta sobre o transdutor basta incubar uma solução que contenha a enzima, por várias horas, com um adsorvente. Os adsorventes mais comuns são o carbono, o alumínio, o colagénio, metais, vidro, sílica gel, entre outros [36,49].

As interações que ocorrem neste tipo de imobilização podem ser iónicas, polares, ligações de hidrogénio ou podem envolver interações hidrofóbicas ou aromáticas. São todas interações não covalentes e, em princípio, reversíveis [36,49].

Os principais factores que influenciam a adsorção são o pH, temperatura, força iónica e o substrato utilizado. Alterações nos valores destes parâmetros, durante o

processo de medição, podem levar a grandes perdas do componente que tenha sido absorvido [36,38].

## 2) Microencapsulação

Neste método, as enzimas são imobilizadas por encapsulação em microcápsulas permanentes (utilizadas analiticamente devido à sua estabilidade) ou não permanentes (usadas em investigação bioquímica). A enzima está no interior das microcápsulas que se encontram rodeadas por uma membrana semi-permeável, sendo que os substratos e os produtos são suficientemente pequenos para a atravessarem. No entanto, esta não permite a passagem da enzima.

Nesta técnica, o biomaterial é colocado atrás da membrana semi-permeável havendo assim um contacto directo entre o biomaterial e o transdutor [36].

Trata-se de um método adaptável, que não interfere com a estabilidade da enzima e fiabilidade dos limites de detecção.

Os principais factores que influenciam a microencapsulação são a temperatura, pH, força iónica e a composição química.

As vantagens deste método são:

- a) o biomaterial está em contacto directo com transdutor;
- b) é um método adaptável e fiável;
- c) a fiabilidade do bioreceptor é mantida pois:
  - c.1) é alcançado um elevado grau de especificidade;
  - c.2) há uma boa estabilidade aquando da alteração da temperatura, pH, força iónica, potencial aplicado e concentração de substrato,
- d) permite ligar o bioreceptor ao transdutor por moléculas condutoras de electrões, tais como, o polipirrole.

No entanto, uma desvantagem deste método é que a microcápsula pode ser permeável a materiais que possam interferir no processo, tais como, pequenas moléculas, nas quais se incluem gases e electrões [36,38].

#### 4) Aprisionamento

Esta técnica consiste na retenção da enzima nas cavidades interiores de uma matriz porosa. Esta matriz é constituída essencialmente por monómeros estabilizados ou polímeros do tipo poliacrilamida, colagénio, alginato, carragenato ou resinas de poliuretano. Também são usados hidrogéis como o poli(2-hidroxietil metacrilato) ou polímeros condutores como o polipirrole, usado no presente trabalho [36]. Para tal, o componente biológico é colocado em contacto com uma solução com espécies susceptíveis de serem polimerizadas de modo a formar uma matriz-gel na qual o biocomponente é retido. O polímero é formado a partir da solução contendo os monómeros e o biocomponente é retido por electrólise a um potencial controlado.

Em alternativa, a imobilização por aprisionamento pode ser levada a cabo pela inclusão do material biológico aquando da construção dos transdutores [38].

Como vantagens deste método de imobilização podemos referir, não só, a sua facilidade na preparação do ponto de vista experimental mas também o facto de não requerer uma grande quantidade de material biológico. Além disto, a enzima não sofre nenhuma alteração na sua estrutura. Como desvantagens, podemos referir, não só, que são criadas grandes barreiras o que inibe a difusão do analito tornando a reacção mais lenta, aumentando o tempo de resposta do biossensor, mas também que há uma perda de actividade da enzima através dos poros do gel [38].

##### - Polipirrole (PPy):

A maior parte dos polímeros electroquímicos usados na imobilização de biomoléculas são polímeros condutores, tais como o poliacetileno, polianalina, polipirrole, entre outros [50].

No presente trabalho, para efectuar a retenção da enzima, foi utilizado um polímero condutor, o polipirrole (fig. 11), um dos polímeros mais usados para a construção de biossensores. O polipirrole e os seus derivados são aqueles que têm o papel mais importante devido à sua aplicação versátil e à grande variedade de espécies redox moleculares que se podem ligar ao grupo que o constitui [44,50].

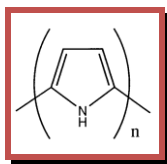


Fig. 11 – Estrutura química do polipirrole. (adaptado do artigo [50])

A versatilidade deste polímero é devida a diversas propriedades que o caracterizam, tais como:

- a) possui actividade redox;
- b) tem a capacidade de formar nanofibras quando, à temperatura ambiente, a condutividade se situa entre  $10^{-4}$  e  $10^{-2}$  Scm<sup>-1</sup>;
- c) possui efeito que depende das condições electroquímicas de polimerização e dos processos de carga e descarga;
- d) possui propriedades absorptivas relativamente a gases, proteínas e DNA;
- e) tem actividade catalítica;
- f) possui propriedades de protecção contra a corrosão, entre outros [44].

Muitas destas propriedades dependem do processo pelo qual o polipirrole é sintetizado [44].

Como vantagens do uso do polipirrole podemos referir que:

- a) é biocompatível, como tal, causa mínimas e reversíveis interferências no ambiente de trabalho em que está a ser utilizado;
- b) capacidade de converter energia decorrente da interacção do analito com “analyte-recognize-site” em sinais eléctricos que são facilmente monitorizados;
- c) capacidade de proteger eléctrodos de materiais interferentes;
- d) a sua deposição electroquímica é feita de forma fácil na superfície de qualquer tipo de eléctrodo;
- e) pode ser depositado a pH neutro a partir de soluções que contêm monómeros de polipirrole;
- f) pode ser sintetizado electroquimicamente e modificado por enzimas por diferentes vias o que origina características analíticas diferentes para a construção de biossensores;
- g) em casos particulares pode ser usado como mediador redox tendo a capacidade de transferir electrões de oxiredutases para o eléctrodo [44,50].

O polipirrole pode ser gerado electroquimicamente e ser depositado sobre superfícies condutoras. Esta técnica é usada em diferentes tipos de sensores electroquímicos e biossensores, tais como:

- a) Sensores catalíticos baseados na imobilização de enzimas;
- b) Imunosensores baseados na imobilização de proteínas com afinidade;

c) Sensores de DNA baseados na imobilização covalente e/ou aprisionamento de ssDNA;

*Técnica de Imobilização de uma biomolécula usando Polipirrole* [44]:

Para a eficiente deposição de uma biomolécula esta deve obedecer a um conjunto de características, conforme referido acima. Muitas vezes, para que estas características sejam satisfeitas, são usados polímeros condutores (p. ex. o polipirrole) como substratos para a imobilização do biomaterial.

O método utilizado no nosso trabalho é o aprisionamento da biomolécula durante a deposição electroquímica do polipirrole. Esta técnica permite a formação de camadas em que a espessura e morfologia destas pode ser controlada pela regulação da intensidade de corrente e/ou pelo potencial aplicado.

*Procedimento para a imobilização da biomolécula com polipirrole* [44]:

O sucesso da aplicação do polipirrole envolvendo enzimas em biossensores catalíticos começou pelo aprisionamento da glucose oxidase proveniente da *Aspergillus niger* em polipirrole. A partir daí várias enzimas, incluindo as peroxidases (usadas no presente trabalho), foram usadas na construção de biossensores catalíticos por aprisionamento em polímeros condutores como o polipirrole.

O aprisionamento de enzimas em polipirrole envolve a aplicação de um potencial apropriado ao eléctrodo de trabalho, mergulhado numa solução aquosa que contém, não só, a enzima, mas também, monómeros de polipirrole. Assim sendo, as enzimas presentes na proximidade da superfície do eléctrodo são incorporadas no polímero em crescimento. O aprisionamento da enzima ocorre sem nenhuma reacção química que possa afectar a sua actividade.

A vantagem da polimerização electroquímica é que as camadas podem ser preparados facilmente, apenas num único passo. Além disso, este método permite o controlo exacto da espessura da camada do polímero com base na medição da carga eléctrica que passa aquando da polimerização. Esta é também uma técnica na qual a quantidade de biomolécula requerida para o aprisionamento é mínima.

O aprisionamento de enzimas com polipirrole parece ser das mais promissoras técnicas para a construção de biossensores catalíticos uma vez que este método permite o aprisionamento de uma quantidade significativa de enzimas redox (oxiredutases) que são capazes de converter grandes quantidades de analito em produtos. Este processo

causa elevadas modificações que podem ser, assim, quantificáveis por sinais electroquímicos.

#### 4) Cross-Linking

Neste método são usados agentes bifuncionais (dialdeídos, di-imino-ésteres, sais de biadiazónio) que originam uniões intermoleculares entre a biomolécula e a enzima. Os agentes bifuncionais mais usados são gluteraldeído e 1,5-dinitro-2,4-difluorobenzeno. Como vantagens podemos referir que este é um método de custo moderado e é usado para estabilizar biomateriais adsorvidos. No entanto, é uma técnica que limita a difusão do substrato e em que pode ocorrer dano na enzima [8].

#### 5) Ligação Covalente

Nesta técnica, alguns grupos funcionais que não são essenciais para a actividade catalítica da enzima podem ser covalentemente ligados à matriz de suporte (transdutor ou membrana). Neste método são usados grupos nucleofílicos, tais como,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$ ,  $\text{SH}$  e imidazole. Mais à frente será explicado com maior detalhe o modo de como a técnica será efectuada no presente trabalho.

Ter em conta que este tipo de imobilização necessita de ser feita sob diversas condições, tais como, baixa temperatura, baixa força iónica e o pH deve também ser controlado.

A grande vantagem deste método é que permite conseguir tempos de vida muito grandes. [36,56]

#### 2.2.5.3 Biossensor amperométrico enzimático

Os tipos de biossensores utilizados neste trabalho são amperométricos enzimáticos no qual se mede a intensidade de corrente durante a oxidação ou redução de um produto a potencial constante. O factor mais importante que afecta o funcionamento dos biossensores amperométricos é a transferência electrónica entre o bioreceptor, normalmente uma enzima ou duas enzimas como neste caso, e a superfície do eléctrodo. Esta reacção normalmente envolve um mediador ou um polímero condutor [37] (fig.12).

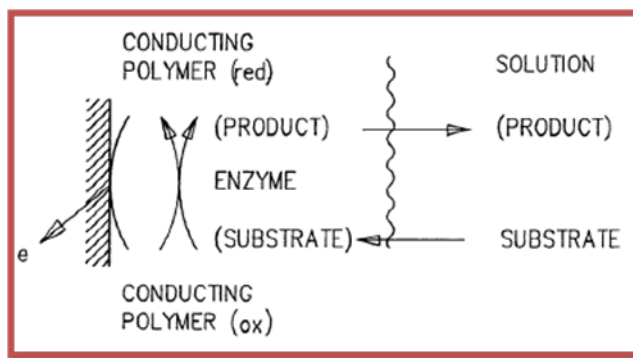


Fig. 12 - Esquema de um biossensor amperométrico que envolve um polímero condutor:

- o analito difunde-se através da solução, e depois através da membrana;
- de seguida, entra em contacto com o centro activo da enzima onde se dá a reacção e é originado um produto com propriedades redox que é oxidado ou reduzido sobre a superfície do eléctrodo que é difundido para a solução [44].

No caso do presente trabalho, são usadas duas enzimas, a HRP e a DAO, assim como um mediador, o ácido ferroceno carboxílico (mediador que facilita a transferência electrónica entre o eléctrodo e a HRP), conforme descrito na seguinte figura:

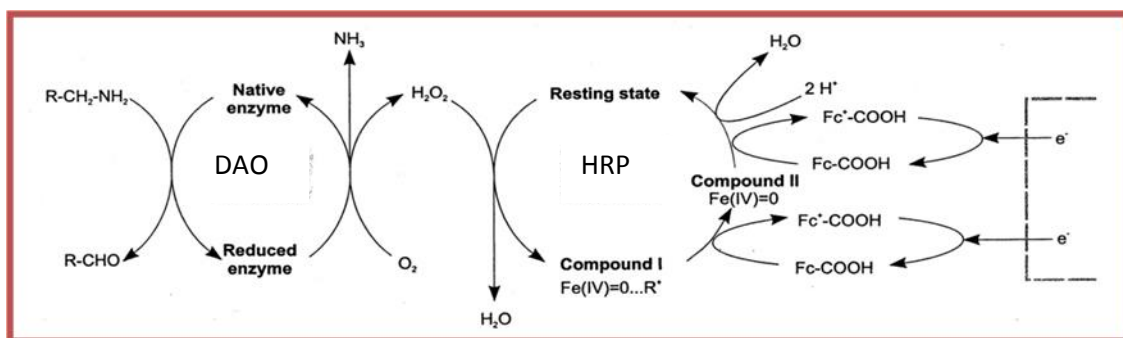


Fig.13 – Esquema de transferência electrónica envolvendo a detecção do grupo amina de uma amina biogénica. [adaptado de 55]

Legenda [adaptado de 45, 55]

- a) A DAO, na sua forma nativa, catalisa a oxidação da amina e, subsequentemente, o co-substrato, o  $O_2$ , é reduzido a peróxido de hidrogénio, libertando-se uma molécula de água;
- b) O  $H_2O_2$ , é utilizado na seguinte reacção reagindo com o ferro do grupo heme da HRP, dando origem ao composto I;
- c) O composto I sofre uma reacção de redução por transferência de um electrão dador do mediador, originando o composto II;
- d) Um electrão adicional pode ser transferido de novo do mediador reduzindo novamente a HRP, fazendo com que ela volte ao estado nativo.

A monitorização da reacção enzimática é possível pela observação da redução de corrente que é proporcional à concentração de analito presente na solução.

### 2.2.6 Aplicações industriais dos biossensores

As indústrias mais beneficiadas pela utilização destes dispositivos são a clínica, a ambiental e a alimentar.

Todas elas requerem instrumentação capaz de realizar análises rápidas e sem necessidade de serem efectuadas em laboratórios. Estas necessidades são cobertas pelo uso dos biossensores [38,51].

#### - Aplicações na indústria alimentar

A análise alimentar é um dos campos onde os biossensores têm um maior potencial de aplicação, uma vez que, os produtos manufacturados nesta indústria se destinam para o consumo humano daí que necessite de uma avaliação rigorosa no controlo de qualidade dos mesmos.

Para assegurar uma elevada qualidade dos produtos o controlo tem que ser efectuado não só na fase final mas em todos os estágios de elaboração do produto. Os biossensores electroquímicos estão capacitados para determinar um largo espectro de espécies em alimentos. São capazes de monitorizar e quantificar não só um ingrediente em particular mas também componentes minoritários.

A maioria dos componentes analisados são açúcares, tais como a glucose e a frutose. No entanto, moléculas como o etanol, glicerol, ácidos cítrico e ascórbico também são monitorizadas por este tipo de biossensores. [38,51,52]

#### - Aplicações em análises clínicas

O diagnóstico e a monitorização de diversas doenças requer variadas análises de rotina de amostras de sangue e de outros testes associados.

Os biossensores oferecem um importante contributo em aplicações clínicas devido à sua especificidade, rapidez, portabilidade e baixo custo.

A maioria dos parâmetros avaliados clinicamente pelos biossensores são a glucose presente no sangue, a ureia, lactato, colesterol, ácido úrico, hormonas, entre outros [38,51,52].

- Aplicações na indústria ambiental

O aumento da contaminação ambiental fez com que aumentasse o número de tecnologias capazes de monitorizar a concentração de contaminantes na água e no ar. Os biossensores constituem uma importante ferramenta para este fim, especialmente no controlo de águas potáveis. Assim sendo, têm ampla gama de aplicações na análise ambiental entre as quais podemos referir a determinação de contaminantes, tais como, pesticidas e metais pesados [38,51,52].

### III – Parte Experimental

#### 3.1 – REAGENTES

- As tintas usadas na **fabricação dos SPCE's** foram:

- a) Electrodag PF-407 A (tinta de carbono);
- b) Electrodag 6037 (tinta prata/cloreto de prata);
- c) Electrodag 452 SS (tinta dielétrica).

todas elas provenientes de Achenson Colloiden (Scheemda, The Netherlands).

- Todas as soluções foram preparadas com água purificada num aparelho Mili-Q que proporciona uma condutividade de 0,05  $\mu\text{S/cm}$ . Nitrogénio (99,99%) foi usado para remover o oxigénio dissolvido.

- Para a **imobilização do eléctrodo** foram usadas as seguintes soluções:

- a) HRP (E.C. 1.11.1.7., Sigma, Steinheim, Germany);
- b) DAO (EC 1.4.3.6., Sigma, Steinheim, Germany);
- c) 0,05 M pirrol (Sigma, Steinheim, Germany);
- d) 0,1 M  $\text{LiClO}_4$  (Aldrich, Steinheim, Germany)
- e) 3 mM Tetrafluoroborato 4-nitrobenzenodiazónio ( $\text{N}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2 \text{BF}_4^-$ ) (Sigma, Steinheim, Germany);
- f) 0.1 M Tetrabutílamónio Tetrafluoroborato ( $\text{NBu}_4\text{BF}_4$ ) (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany);
- g) Acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ );
- h) NHS (Aldrich, Steinheim, Germany);
- i) EDC (Fluka, Steinheim, Germany);
- j) Solução 9 Etanol:1Água

- As soluções padrão de Histamina foram preparadas com a quantidade apropriada de água de modo a serem dissolvidas;

- Ácido Carboxílico Ferroceno

- Foi usada uma solução tampão de fosfato 0,05M ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Panreac, Barcelona, Spain) e 0,1 M KCl (Merck, Darmstadt, Germany). Para ajustar o pH desta solução foi usado NaOH (J.T. Baker, deventer, The Netherlands);

### **3.2 – APARELHOS E SOFTWARE**

- Os SPEs foram fabricados com um equipamento de serigrafia DEK 248 (DEK, Reino Unido) (fig.14) usando matrizes de poliéster com os desenhos apropriados:



Fig. 14 - Equipamento de serigrafia DEK 248 (DEK, Reino Unido).

- O pH das soluções foi medido com um medidor de pH Crison Model 2002 (Barcelona, Spain);

- As medidas electroquímicas foram feitas usando  $\mu$ Autolab electrochemical system with GPES software (Eco Chemie, Utrech, the Netherlands);

- A análise dos dados foi feita mediante o software STATGRAPHICS PLUS (STATGRAPHICS Copy 1994-2001) para o desenho das experiências, PROGRESS (Rousseuw and Leroy 1989) para as regressões robustas e DETARCHI para o cálculo do limite de detecção (LOD) (Sarabia and Ortiz, 1994).

### 3.3 – MÉTODOS

#### 3.3.1 Preparação dos SPE's

##### a) Desenho dos dispositivos

Foram desenhados dois tipos de transdutores amperométricos mediante a tecnologia serigráfica, baseados na configuração integrada de três eléctrodos.

Dois dos eléctrodos, trabalho e auxiliar, foram construídos em carbono e o terceiro, eléctrodo de referência, por tinta de prata/cloreto de prata.

Em ambos casos, o eléctrodo de trabalho consistiu num quadrado ( $4 \text{ mm}^2$ ). Os desenhos diferenciaram-se pela forma do eléctrodo auxiliar. Num dos casos tem a forma rectangular, situado ao lado eléctrodo de trabalho (Fig. 15-A) e o outro consiste num arco que envolve o eléctrodo de trabalho (Fig. 15-B).

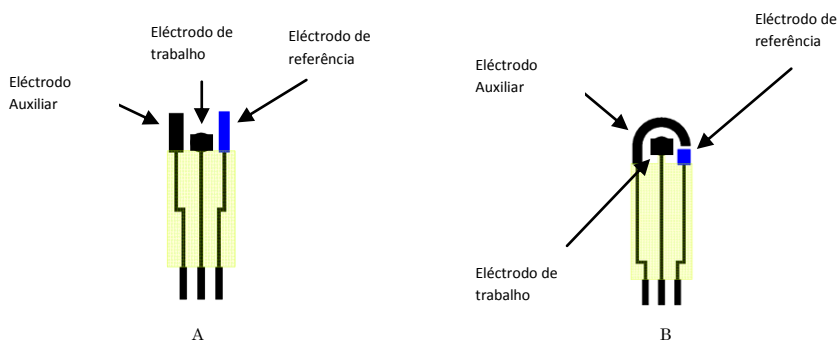


Fig. 15 - Desenhos realizados para a fabricação de eléctrodos serigráficos.

Foram desenhadas três matrizes diferentes para a fabricação destes dispositivos, correspondentes a cada nível de deposição de tintas:

- 1) Uma primeira matriz para a formação dos eléctrodos de trabalho e auxiliar (fig.16).

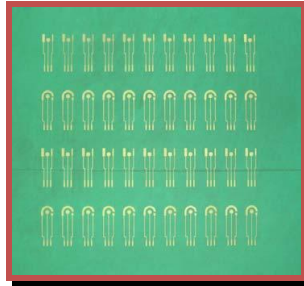


Fig. 16 - Fotografia da matriz correspondente à deposição de carbono.

- 2) Uma segunda matriz que define a forma e posição do eléctrodo de referência (fig.17).

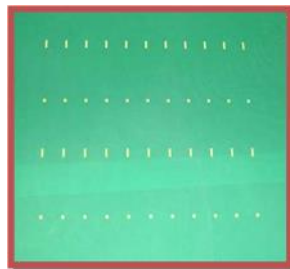


Fig. 17 - Fotografia da matriz correspondente à deposição de Ag/AgCl no eléctrodo de referência.

- 3) E a última matriz correspondente à deposição do isolante (fig.18)

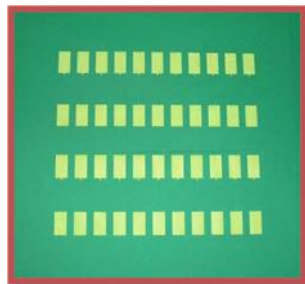


Fig. 18 - Fotografia da matriz correspondente à deposição do isolante.

b) Fabricação dos dispositivos

Conforme referido na introdução, o processo de construção por serigrafia implica, basicamente, cinco etapas que consistem na deposição sequencial das diferentes tintas e posteriores secagens.

- A primeira etapa foi a deposição da tinta de carbono (Electrodag PF-407 A) sobre um substrato de poliéster (PVC), limpo previamente com etanol. Desta maneira foram definidos os eléctrodos auxiliar e de trabalho, assim como as vias condutoras (Fig 15). Depois da impressão, foi necessário esperar 24h, à temperatura ambiente, para que se evaporassem os solventes da tinta de carbono;

- Seguindo o procedimento descrito anteriormente, e utilizando a matriz adequada, procedeu-se à deposição de uma tinta formada por Ag/AgCl (Electrodag 6037) para definir o eléctrodo de referência. Neste caso foram necessárias duas deposições para garantir uma grossura adequada e, como tal, o bom funcionamento do eléctrodo de referência.

- A seguinte etapa consiste na secagem destas tintas. Este realizou-se mediante um ciclo térmico (80 °C durante 30 minutos seguido de 120 °C durante 5 minutos mais). É importante destacar que este processo foi feito de maneira gradual para reduzir as tensões que possam ser originadas por alterações bruscas de temperatura nas capas depositadas.

- A última etapa consistiu na deposição e endurecimento do isolante (Electrodag 452 SS) cuja função é isolar as vias condutoras da solução electrolítica. Neste caso, uma vez depositado o isolante utilizando a matriz fabricada para este fim, este foi irradiado com luz ultravioleta de modo a ser endurecido.

- Foi necessário cobrir o substrato durante a sua polimerização, evitando o contacto com o oxigénio e impedindo assim que este reagisse com os radicais formados na tinta durante o processo de polimerização e provocasse um endurecimento defeituoso;
- Uma vez finalizado o processo de fabricação os transdutores foram individualizados (figs. 19 e 20) e procedeu-se à sua utilização.

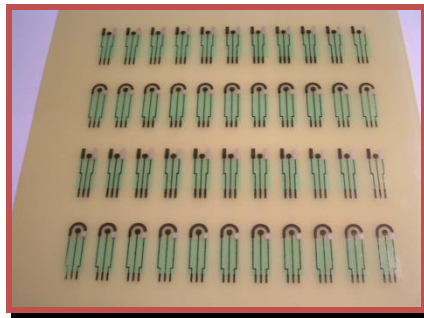


Fig. 19 - Fotografia de um lote de transdutores obtidos após o processo de fabricação.



Fig. 20 - Imagem de um transdutor individualizado.

### 3.3.2 Modificação do eléctrodo de trabalho:

#### 3.3.2.1 Limpeza/Activação do eléctrodo

O carbono é um material muito absorvente. Assim sendo, não só durante o processo de fabricação é possível que se contamine com substâncias não condutoras mas também durante os processos de evaporação e secagem das tintas, as partículas de carbono, por efeito da gravidade, têm tendência a deslocar-se para a parte inferior do eléctrodo deixando na parte superior grande quantidade de material aglutinante para inactivá-lo. Para corrigir tal facto realiza-se a limpeza do eléctrodo utilizando como técnica electroquímica a voltametria cíclica, conforme descrito de seguida.

- Inicialmente poliu-se os eléctrodos, auxiliar e de trabalho, com uma lixa;
- De seguida, efectuou-se a activação electroquímica. Para tal, submergiu-se o eléctrodo numa solução  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  de KCl registando-se 40 voltamogramas cíclicos entre  $-2\text{V}$  e  $2\text{V}$ , a  $100 \text{ mV s}^{-1}$  (gráfico 1);
- O eléctrodo foi lavado com água Mili-Q.

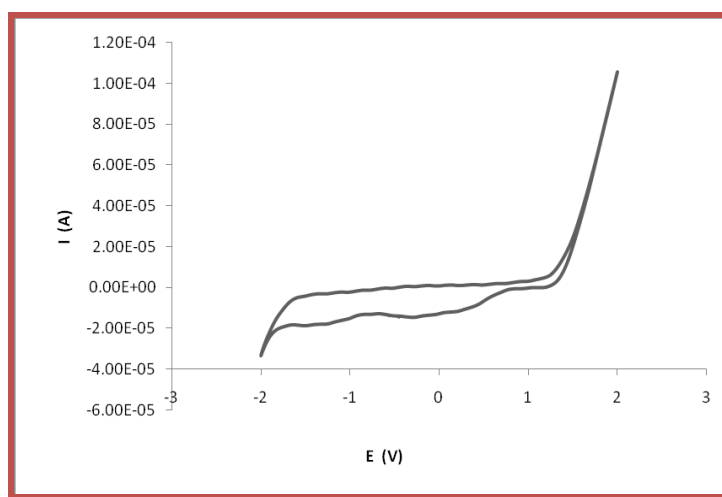


Gráfico 1- Voltamograma cíclico registado numa solução de KCl 0,1 M durante o processo de activação do eléctrodo.

- d) De seguida, lavou-se bem o eléctrodo com água Mili-Q e realizou-se um branco submergindo-se o eléctrodo numa solução 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl registando-se 1 voltamograma cíclicos entre - 0.4V e 0.8V, a 100 mV s<sup>-1</sup> (gráfico 2);

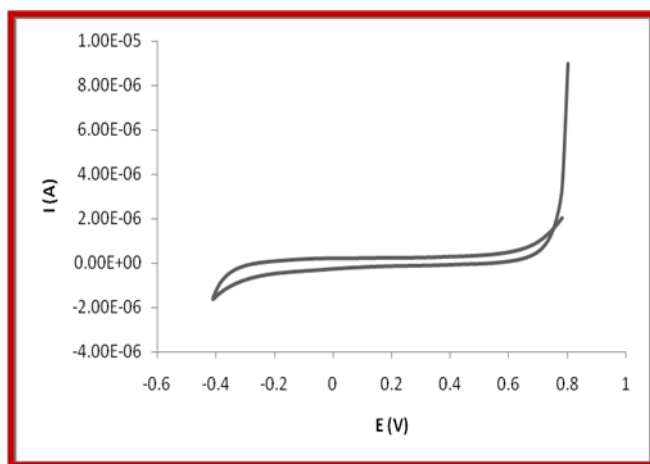


Gráfico 2 - Voltamograma cíclico registado numa solução de KCl 0,1 M (branco).

- e) Para comprovar a efectividade da activação submergiu-se o eléctrodo numa solução contendo Ferrocianuro 10mM dissolvido em 0.1 mol dm<sup>-3</sup> de KCl registando-se 1 voltamograma cíclico entre - 0.4V e 0.8V, a 100 mV s<sup>-1</sup> (gráfico 3).

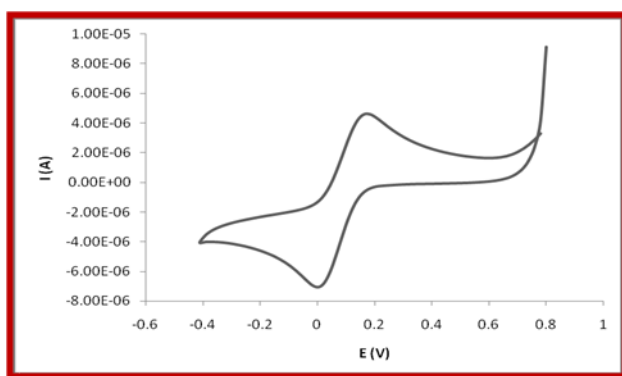


Gráfico 3 - Voltamograma cíclico registado numa solução de KCl 0,1 M contendo Ferrocianuro 10mM dissolvido.

- f) Realizou-se a lavagem do eléctrodo e comprovou-se que os resíduos de ferrocianuro tinham desaparecido, repetindo-se o branco nas mesmas condições de b) (gráfico 4).

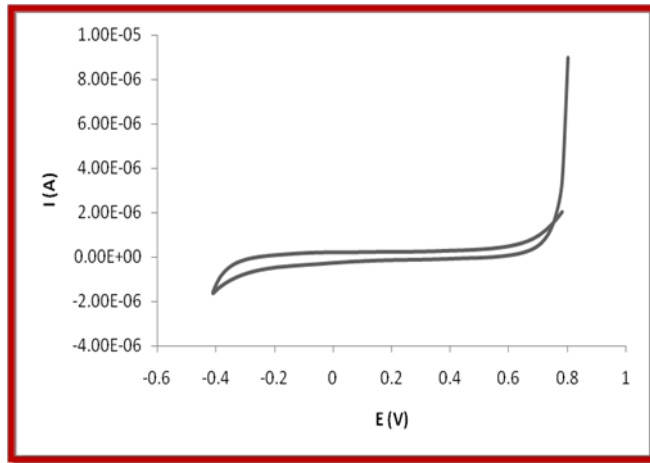


Gráfico 4 - Voltamograma cíclico registado numa solução de KCl 0,1 M, após verificação com ferrocianuro (branco).



A) Técnica de imobilização: Aprisionamento com Polipirrole

3.3.2.2 Electropolimerização da pré-camada de polipirrole

Para garantir uma melhor imobilização da enzima sobre a superfície do eléctrodo foi depositada uma pré-capa de polipirrole na sua superfície:

- a) Para tal, introduziu-se o SPE em 5 mL de solução que continha 0,1 M  $\text{LiClO}_4$  e 0,05M de pirrole;
- b) A pré-capa de polipirrole foi depositada sobre a superfície do eléctrodo mediante o registo de um voltamograma cíclico cujo potencial variou entre -0,1V e +0,9V a uma velocidade de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ , à temperatura ambiente (gráfico 5).

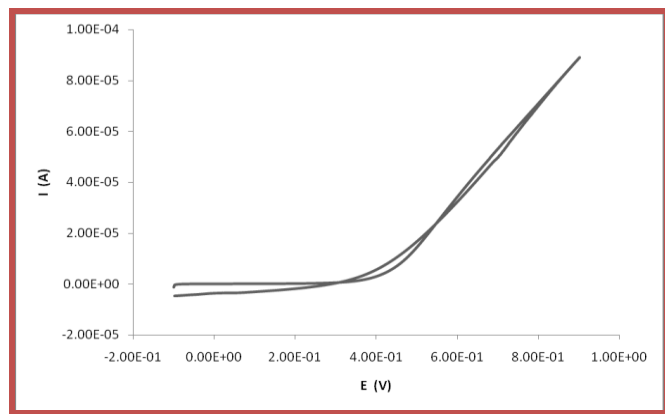


Gráfico 5 - Voltamograma cíclico correspondente à formação da pré-capa de PPy na superfície electródica.

3.3.2.3 Imobilização das enzimas na superfície do eléctrodo de trabalho:

- a) A capa de HRP/DAO/polipirrole foi depositada de seguida sobre a superfície do SPE;
- b) Para tal, mergulhou-se o SPE numa solução de 5 mL que continha 0,1 M LiClO<sub>4</sub>, 0,05M de pirrole, HRP e DAO, à temperatura ambiente;
- c) Para a deposição da capa de HRP/DAO/polipirrole realizou-se um voltamograma cíclico entre -0,1V e +0,9V, durante 2 ciclos completos a uma velocidade de (scan rate) 10 mV s<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente (gráfico 6).

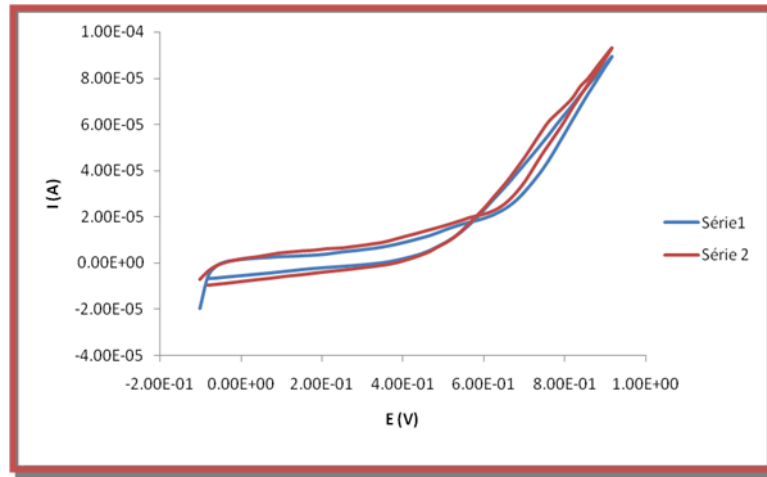


Gráfico 6 - Voltamogramas cíclicos correspondentes à imobilização das enzimas HRP e DAO na superfície electródica.



B) Técnica de imobilização: Ligação Covalente

3.3.2.2 Formação da monocapa de aminofenis

O procedimento de modificação do eléctrodo de carbono consiste na funcionalização electroquímica dos eléctrodos a partir de sais de diazónio.

Os passos do processo podem observar-se na seguinte figura:

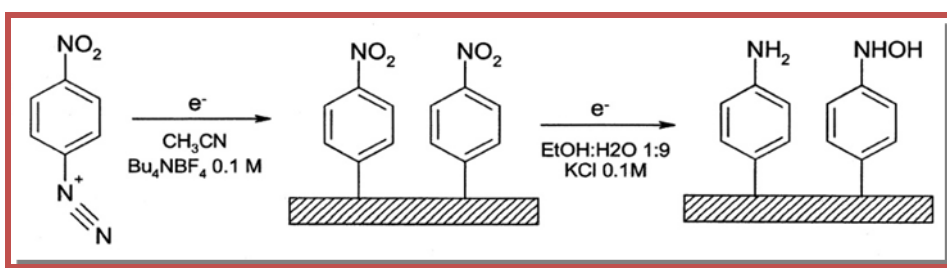


Fig.21 – Funcionalização da superfície do eléctrodo de carbono com uma monocapa de aminofenis.

Legenda:

- 1) Num primeiro passo a funcionalização dos SPCE's foi atingida pela ligação electroquímica do eléctrodo de carbono a uma solução 3mM de sal de diazónio ( $N_2C_6H_4NO_2 BF_4^-$ ) dissolvida em acetonitrilo ( $CH_3CN$ ) contendo  $NBu_4BF_4$  0.1 M. Desta maneira foi obtida uma monocapa de nitrofenis covalentemente unida, através de um enlace C-C, à superfície de carbono.
- 2) Para a redução dos grupos nitro a amina o eléctrodo foi transferido para uma solução desoxigenada de 1:9 de EtOH:H<sub>2</sub>O 1:9 contendo KCl 0.1 M.

Nos gráficos seguintes estão esquematizados os voltamogramas cíclicos juntamente com as etapas electroquímicas que ocorrem no eléctrodo.

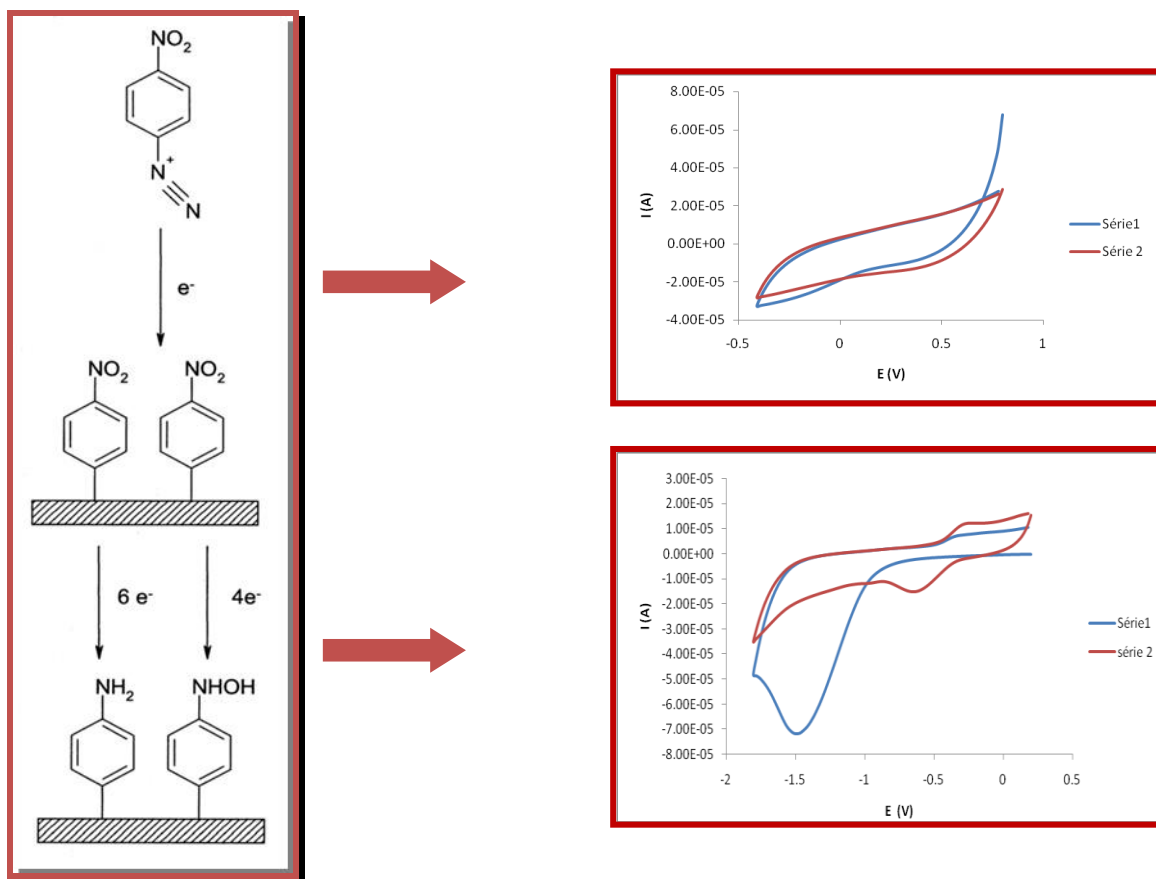


Fig.22 – Esquematização das etapas distintas de funcionalização da superfície do eléctrodo de carbono com uma monocapa de aminofenis e respectivos voltamogramas cíclicos.

Legenda:

- Redução do sal de diazónio na superfície electródica através da realização de dois voltamogramas cíclicos entre 0.8V e -0.4V, durante 2 ciclos completos a uma velocidade de (scan rate) 200 mV s<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente;
- Redução dos grupos nitro formados na monocapa a partir do sal de diazónio, numa solução desoxigenada de 1:9 de EtOH:H<sub>2</sub>O 1:9 contendo KCl 0.1 M, dando origem a grupos amina e hidroxilamina. Tal ocorre através da realização de dois voltamogramas cíclicos entre 0.2V e -1.8V, durante 2 ciclos completos a uma velocidade de (scan rate) 200 mV s<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente.

- a redução dos grupos nitro tem lugar durante o primeiro ciclo, observando-se no voltamograma um pico irreversível de redução a -1,446 V ;

- e os grupos hidroxilamina reduzem-se no segundo ciclo, observando-se no voltamograma um pico irreversível de redução a -0,3 V;

De seguida, lavou-se a superfície do eléctrodo com tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl 10mM, pH=6 e procedeu-se à imobilização da enzima na superfície do eléctrodo.

### 3.3.2.3 Imobilização das enzimas na superfície do eléctrodo de trabalho:

- Sobre a superfície electródica funcionalizada e seca foram colocados as seguintes soluções:

- 1º) 2  $\mu\text{L}$  de solução de HRP diluída em água;
- 2º) 5  $\mu\text{L}$  de solução de DAO diluída em água;
- 3º) 2,8  $\mu\text{L}$  de solução de NHS diluída em tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl 10mM, pH=6;
- 4º) 2,8  $\mu\text{L}$  de solução de EDC diluída em tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl 10mM, pH=6.

- O eléctrodo, já modificado, foi colocado durante 3h no frigorífico de modo a que as enzimas se liguem covalentemente ao eléctrodo pela formação de ligações entre os grupos presentes nestas (grupos CARBOXILO que estão presentes nas enzimas após imobilização) e os grupos amina e carboxílico expostos na superfície do eléctrodo. A NHS e a EDC servem para catalizar esta reacção. A figura seguinte retrata esta reacção, no caso dos grupos amina, resumidamente:

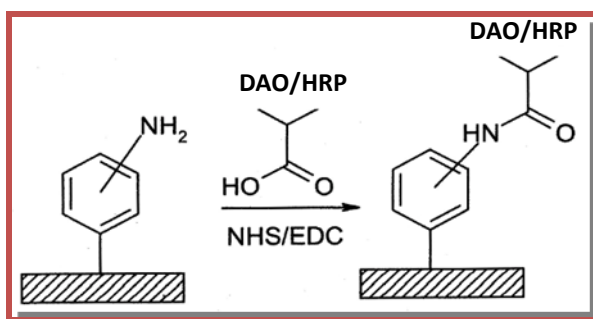


Fig.23 – União covalente das enzimas às superfícies funcionalizadas com o grupo amina.

- Passadas as 3h o biossensor é finalmente lavado na célula, agitando durante 1,5 min., em tampão fosfato pH 10.

#### 3.3.2.4 Conservação do biossensor

Na determinação electroquímica do analito, a superfície do eléctrodo modificado pode contaminar-se facilmente com restos de analito ou produtos da reacção enzimática. Com a finalidade de conseguir medidas repetitivas, a superfície do eléctrodo é regenerada imergido o biossensor numa solução tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl, pH=7, durante 30 minutos e à temperatura de 4°C, entre os diferentes calibrados efectuados.

## IV – Resultados e Discussão

### 4.1 – RESPOSTA OBTIDA DO BIOSSENSOR AMPERÓMETRICO ENZIMÁTICO BASEADO NA DAO/HRP - MECANISMO DE ACÇÃO:

No caso do presente trabalho, são usadas duas enzimas, a HRP e a DAO, assim como um mediador, o ácido ferroceno carboxílico (mediador que facilita a transferência electrónica entre o eléctrodo e a HRP), conforme descrito na figura 24.

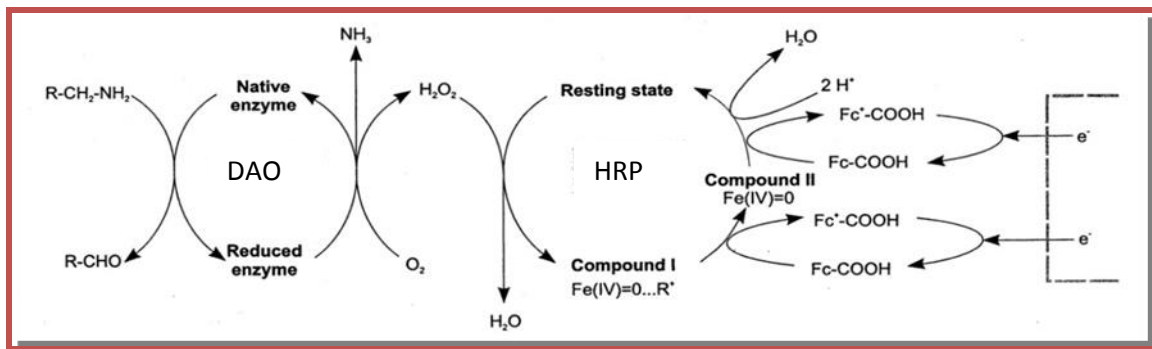


Fig.24 – Esquema de transferência electrónica envolvendo a detecção do grupo amina de uma amina biogénica.

#### Legenda

- A DAO, na sua forma nativa, catalisa a oxidação da amina e, subsequentemente, o co-substracto formado, o  $O_2$ , é reduzido a peróxido de hidrogénio, libertando-se uma molécula de água;
- O  $H_2O_2$ , é utilizado na seguinte reacção reagindo com o ferro do grupo heme da HRP, dando origem ao composto I;
- O composto I sofre uma reacção de redução por transferência de um electrão dador do mediador, originando o composto II;
- Um electrão adicional pode ser transferido de novo do mediador reduzindo novamente a HRP, fazendo com que ela volte ao estado nativo.

A monitorização da reacção enzimática é possível pela observação da redução de corrente que é proporcional à concentração de analito presente na solução.

#### 4.2 – OPTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS:

Em qualquer procedimento analítico no qual se pretende obter uma resposta relacionada com o analito em estudo, é de grande utilidade conhecer e controlar os parâmetros ou variáveis experimentais que intervêm nesse processo.

Com a finalidade de melhorar a resposta analítica de uma substância é importante relaciona-la só com aqueles parâmetros que têm maior influência na variável resposta e que podem ser controlados pelo investigador.

Neste caso, a resposta amperométrica do analito no biossensor do presente trabalho é influenciada por 3 factores:

- a) pH do meio;
- b) Potencial aplicado ( $E_{ap}$ );
- c) Volume de ferroceno adicionado ( $V_{Fc}$ ).



#### A) Técnica de imobilização: Aprisionamento com Polipirrole

Baseados em estudos anteriores (artigos 30, 54, 56 p. ex.) e por diversos experimentos feitos laboratorialmente chegámos à conclusão que:

- **pH** neutros ou mais alcalinos dariam melhor resposta;
- relativamente ao **potencial aplicado**: potenciais muito positivos não são explorados devido à sobreoxidação do polipirrole, o que implicaria a incorporação de grupos com oxigénio na sua estrutura, assim como a perda da carga catiónica do mesmo e, como tal, a sua capacidade condutora. A potenciais muito negativos o polipirrole era destruído daí também não terem sido explorados;
- o **volume de ácido carboxílico ferroceno** não influencia muito a resposta.

Assim sendo, a partir deste processo de optimização foram seleccionados os seguintes valores óptimos para cada uma das variáveis experimentais que influenciam a resposta amperométrica do analito no biossensor:

$$\mathbf{pH} = 7,0$$

$$\mathbf{E}_{\mathbf{ap}} = 0 \text{ V}$$

$$\mathbf{V}_{\mathbf{Fc}} = 100 \text{ } \mu\text{L}$$

A partir da optimização dos parâmetros que influenciam a resposta do biossensor foram efectuados diversas calibrados de modo a relacionar o sinal medido com a concentração do analito.

#### 4.3 – REALIZAÇÃO DE CALIBRADOS COM APRISIONAMENTO COM PIRROLE

Tendo em conta as condições experimentais óptimas, na realização dos calibrados procedeu-se da seguinte maneira:

- Mergulhou-se o SPE, já com as enzimas imobilizadas, numa solução de 5 mL que continha tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl, pH=7 à temperatura ambiente;
- Quando se observou a estabilização da curva do amperograma, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de mediador - solução de Fc  $1,0 \times 10^{-3}$  M;
- Esperou-se novamente à estabilização da curva e fizeram-se 10 adições sucessivas de 100  $\mu\text{L}$  cada numa solução de histamina  $5,0 \times 10^{-3}$  M;
- Na realização de diversas calibrados com o mesmo eléctrodo, entre cada medição realizada, regenerou-se a sua superfície com uma solução tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl, pH=7, durante 30 minutos e à temperatura de 4°C.

No gráfico 7, mostra-se uma das curvas de calibrados obtidas nas condições experimentais óptimas que obtivemos para este método de imobilização.

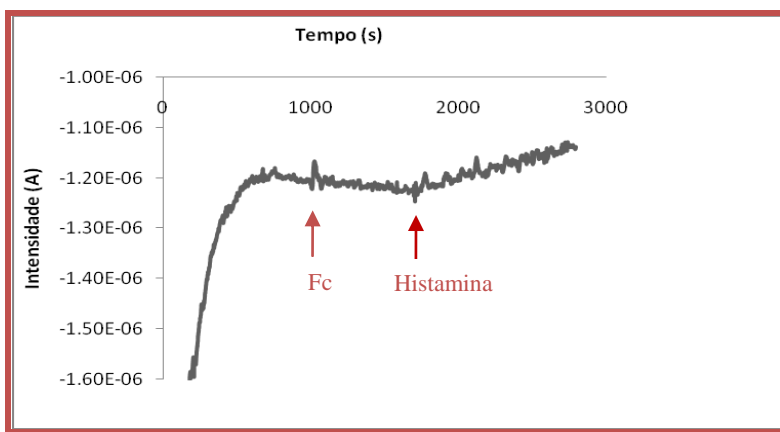


Gráfico 7- Amperograma registado nas condições óptimas para a determinação da histamina mediante o biossensor baseado na DAO/HRP/Fc pelo método de aprisionamento com pirrol. Cada adição corresponde a 100  $\mu\text{l}$  de uma dissolução de 0,05 M de histamina.

Conforme se observa no amperograma do gráfico 7, os “saltos” de histamina não são muito visíveis, possuem muitas interferências. Houve diversas repetições nestas condições, as melhores encontradas com esta técnica, mas umas vezes eram observados alguns saltos, outras não. Assim sendo, partimos para a imobilização com ligação covalente na qual se consegue controlar a orientação da enzima, ao contrário da imobilização com aprisionamento com pirrole.



### B) Técnica de imobilização: Ligação Covalente

Baseados em estudos anteriores e por diversas experiências chegámos à conclusão que:

- **pH** neutros ou mais alcalinos dariam melhor resposta;
- Relativamente ao **potencial aplicado**: potenciais muito positivos foram explorados pois, baseado em estudos prévios, seriam os que melhor nos dariam resultados. Nesta técnica de imobilização puderam ser aplicados pois a monocapa que se forma já os suporta ao contrário do polipirrole;
- O **volume de ácido carboxílico ferroceno** não influencia muito a resposta.

Assim sendo, a partir deste processo de optimização foram seleccionados os seguintes valores óptimos para cada uma das variáveis experimentais que influenciam a resposta amperométrica do analito no biossensor:

$$\text{pH} = 10$$

$$E_{\text{ap}} = 0,7 \text{ V}$$

$$V_{\text{Fc}} = 100 \mu\text{L}$$

A partir da optimização dos parâmetros que influenciam a resposta do biossensor foram efectuados diversos calibrados de modo a relacionar o sinal medido com a concentração do analito.

#### 4.4 – REALIZAÇÃO DE CALBRADOS COM UNIÃO COVALENTE

Tendo em conta as condições experimentais óptimas, na realização dos calbrados procedeu-se da seguinte maneira:

- e) Mergulhou-se o SPE, já com as enzimas imobilizadas, numa solução de 5 mL que continha tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl, pH=10 à temperatura ambiente;
- f) Quando se observou a estabilização da curva do amperograma, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de mediador - solução de Fc  $1,0 \times 10^{-3}$  M;
- g) Esperou-se novamente à estabilização da curva e fizeram-se 10 adições sucessivas de 100  $\mu\text{L}$  cada numa solução de histamina  $5,0 \times 10^{-5}$  M;
- h) Na realização de diversas calbrados com o mesmo eléctrodo, entre cada medição realizada, regenerou-se a sua superfície com uma solução tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05M e 0,1 M KCl, pH=10, durante 30 minutos e à temperatura de 4°C.

No gráfico 8, mostra-se uma das curvas de calbrados obtidas nas condições experimentais óptimas que obtivemos para este método de imobilização.

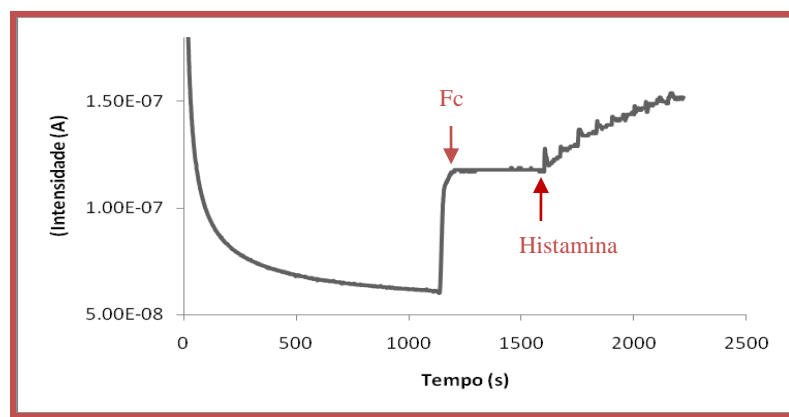


Gráfico 8 - Amperograma registado nas condições óptimas para a determinação da histamina mediante o biossensor baseado na DAO/HRP/Fc pelo método de união covalente. Cada adição corresponde a 100  $\mu\text{L}$  de uma dissolução de  $5,0 \times 10^{-5}$  M de histamina.

Através do amperograma do gráfico 8 já podemos verificar os saltos da histamina em melhores condições que com a técnica de imobilização anteriormente efectuada, daí a ligação covalente ser o melhor método electroquímico, em relação ao aprisionamento com pirrole, para quantificar a histamina.

➤ **Controlos Negativos:**

Assim sendo, foram efectuados controlos negativos na técnica de imobilização da união covalente de modo a se verificar que era a molécula em estudo, a histamina, que estava a reagir e que reagia apenas com a monocapa de aminofenóis e com as enzimas já imobilizadas.

- a) Só **SCPE's** (sem monocapa de aminofenóis e sem a imobilização das enzimas, de NHS e EDC):

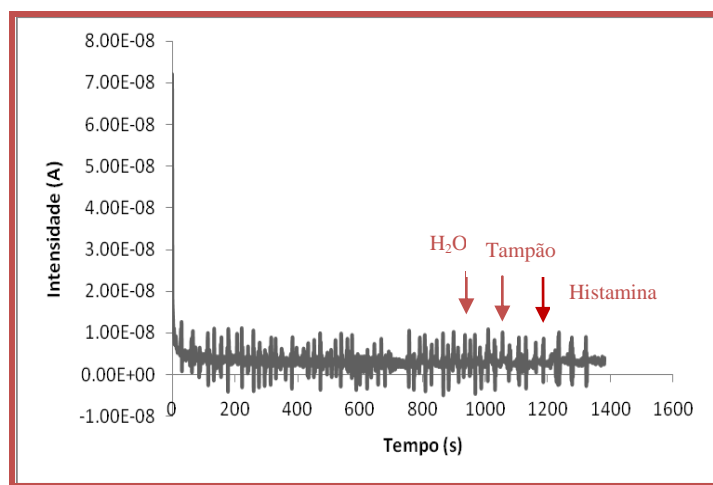


Gráfico 9- Amperograma registado nas condições óptimas utilizando a técnica de união covalente, para a determinação da histamina, apenas sobre o SCPE. Os “saltos” correspondentes às adições de histamina não se observam e existem muitas interferências.

- b) SPCE's + Monocapa de aminofenóis (sem imobilização das enzimas, de NHS e EDC):

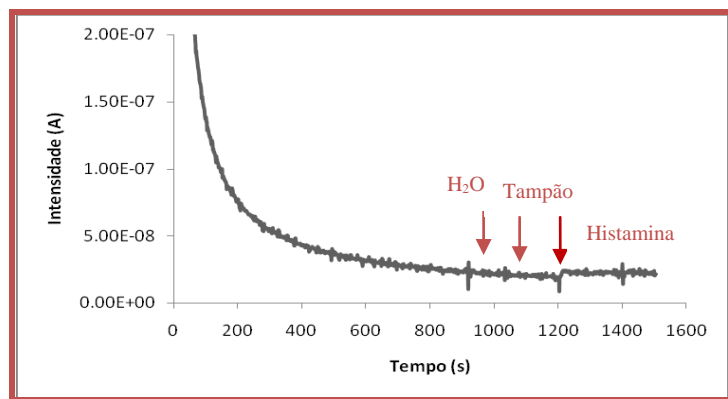


Gráfico 10 - Amperograma registado nas condições óptimas utilizando a técnica de ligação covalente, para a determinação da histamina, apenas sobre o SCPE. Os “saltos” correspondentes às adições de histamina não se observam e existem algumas interferências.

- c) SPCE's + Monocapa (sem imobilização apenas da enzima, ou seja, aqui existe NHS e EDC):

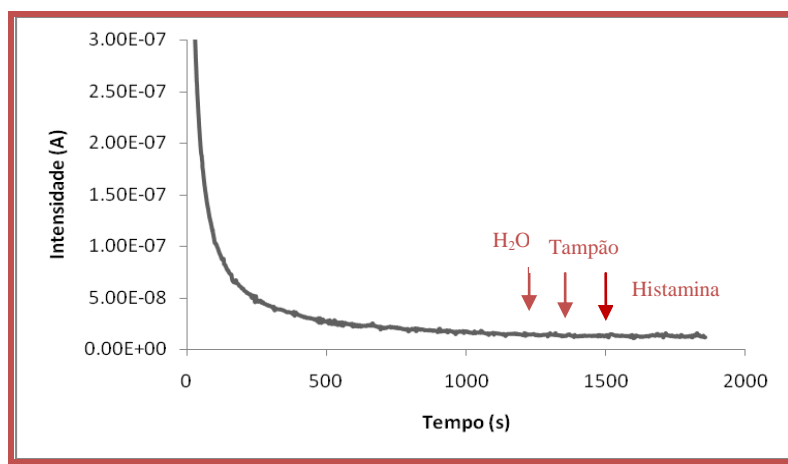


Gráfico 11 - Amperograma registado nas condições óptimas utilizando a técnica de união covalente, para a determinação da histamina, apenas sobre o SCPE. Os “saltos” correspondentes às adições de histamina não se observam e existem poucas interferências.

*Nota 1: Adicionamos água e tampão, além de histamina, de modo a comprovarmos que os “saltos” que observamos são mesmo efeito da nossa molécula.*

*Nota 2: Não adicionamos ferroceno nos controlos negativos visto este apenas reagir de certeza, conforme verificado no artigo 55, com a presença da enzima HRP.*

## V – Conclusão

Os resultados experimentais obtidos anteriormente podem-se resumir nas seguintes conclusões:

- 1) A histamina, diaminas biogénica heterocíclica, é uma molécula susceptível de sofrer processos de oxidação-redução e, como tal, pode ser analisada mediante técnicas electroanalíticas;
- 2) A amperometria demonstrou ser uma técnica electroanalítica eficaz para a determinação da histamina;
- 3) A determinação da histamina por amperometria está influenciada por diversas variáveis, tais como, pH do meio, potencial aplicado ( $E_{ap}$ ) e Volume de ferroceno adicionado ( $V_{Fc}$ );
- 4) O processo efectuado de optimização das variáveis experimentais que influenciam a determinação amperométrica da histamina permitiu determinar as condições óptimas para a análise ser efectuada pelos diferentes métodos de imobilização utilizados:

a) Aprisionamento com pirrole:

**pH** = 7,0                       **$E_{ap}$**  = 0 V                       **$V_{Fc}$**  = 100  $\mu$ L

b) Ligação Covalente:

**pH** = 10                       **$E_{ap}$**  = 0,7 V                       **$V_{Fc}$**  = 100  $\mu$ L

- 5) A construção de um biossensor baseado na imobilização das enzimas DAO/HRP posterior à electropolimerização do pirrol na superfície electródica, permite a determinação de histamina, em presença de ácido ferroceno carboxílico. No entanto, conforme se observa no gráfico 7, imobilização possui muitas interferências e os “saltos” correspondentes à

adição da solução de histamina umas vezes são observados outras não e quando o são mal se vêem.

- 6) A construção de um biossensor baseado na imobilização das enzimas DAO/HRP posterior à funcionalização electroquímica a partir de sais de diazónio, e usando, para a imobilização das enzimas, NHS e EDC sobre a superfície electródica, permite a determinação de histamina, em presença de ácido carboxílico ferroceno. Conforme se observa no gráfico 8, esta imobilização possui poucas interferências e os “saltos” correspondentes à adição da solução de histamina umas vezes são facilmente observados.
- 7) Assim sendo, por comparação de ambas as técnicas é-nos possível chegar à conclusão que a união covalente é mais eficaz para a determinação electroquímica da histamina, talvez por podermos controlar a orientação da enzima com este método. Inclusivamente, através desta última técnica podemos até determinar a histamina em concentração menor do que com o método de imobilização de aprisionamento com pirrole.

Por tudo isto, podemos concluir que o objectivo do trabalho foi alcançado, ou seja, é possível, determinar electroquimicamente histamina através de biossensores baseados em eléctrodos “screen printed” e, comparando as duas técnicas de imobilização utilizadas, a união covalente demonstrou ser a melhor técnica para tal, perante o aprisionamento com pirrole.

## VI – Bibliografia

- 1 – Saito, K.; Horie, M.; Nose, N.; Nakagomi, K.; Nakazawa, H., 1992, “Determination of polyamines in foods by liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization”, *Analytical Sciences*, 8, pp. 675-680;
- 2 – Stute, R.; Petridis, K.; Steinhart, H.; Biernoth, G., 2002, “Biogenic amines in fish and soy sauces”, *European Food Research Technologies*, 215, pp. 101-107;
- 3 – Leitão, M. C.; Marques, A. P.; Romão M. V. S., 2005, “A survey of biogenic amines in commercial Portuguese wines”, *Food Control*, 16, pp. 199–204;
- 4 – Lavizzari, T.; Veciana-Nogués, M. T.; Bover-Cid, S.; Mariné-Font, Vidal-Carou, M. C., 2006, “Improved method for the determination of biogenic amines and polyamines in vegetable products by ion-pair high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chromatography A*, 1129, pp. 67–72;
- 5 – Innocente, N.; Biasutti, M.; Padovese, M.; Moret, S., 2007, “Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract”, *Food Chemistry*, 101, pp. 1285–1289;
- 6 – Soulet, D.; Rivest, S., 2007, “Polyamines play a critical role in the control of the innate immune response in the mouse central nervous system”, *The Journal of cell Biology*, 162, pp. 257-268;
- 7 – Brink, B. T; Damink, C.; Joosten, H., M., L., J.; Huis in` t Veld, J., H., J., 1990, “Occurrence and formation of biologically active amines in foods”, *International Journal of Food Microbiology*, 11, pp. 73-84;
- 8 – Medina, M., A.; Urdiales, J., L.; Ródriguez-Caso, C.; Ramirez, F., J.; Sánchez-Jiménez, F., 2003, “Biogenic amines and polyamines: similar biochemistry for different physiological missions and biomedical applications”, *Criticals Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 38, pp. 23-59;
- 9 – Chiacchierini, E.; Restuccia, D.; Vinci, G., 2006, Evaluation of two different extration methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products”, *Talanta*, 69, pp. 548-555;

- 10 – Sousadias, M., G.; Smith, T., 1995, “Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks”, *Journal of Animal Science*, 73, 2375-2381;
- 11 – Wada, M.; Funada-Wada, U., Mano, H.; Higashiguchi, M.; Haba, R.; Watanabe, S.; Udaka, S., 2002, “Effects of dietary polyamines on the promotion of mamary tumor in rats”, *Journal of Health Science*, 48, pp. 376-380;
- 12 – Moret, S.; Smela, D.; Populin, T.; Conte, L. S., 2005, “A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables”, *Food Chemistry*, 89, pp- 355–361;
- 13 – Soda, K.; Yoshiko, K.; Nakamura, T.; Kasono, K.; Kawakami, M.; Konishi, F., 2005, “Spermine, a natural polyamine, suppresses LFA-1 expression on human lymphocyte”, *The Journal of Immunology*, pp. 237-245;
- 14 – Karovičová, J.; Kohajdová, Z., 2005, “Biogenic amines in food”, *Chemistry Pappers*, 59, pp.70-79;
- 15 – Santos, M., H., S., 1996, Biogenic amines: their importance in foods”, *International Journal of Food microbiology*, 29, pp. 213-231;
- 16 – Nishimura, k.; Shiina, R.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K., 2006, “Decrease in polyamines with aging and their ingestion from food and drink”, *Journal of Biochemistry*, 139, pp. 81-90;
- 17 – Bardócz, S.; Duguid, T., J.; Brown, D., S.; Grant., G.; Pusztai, A.; White, A.; Ralph, A., 1995, “The importance of dietary polyamines in cell regeneration and growth”, *British Journal of Nutrition*, 73, pp. 819-828;
- 18 – Kalač, P.; Křížek, M.; Pelikánová, T.; Langová, M.; Veškrna, O., 2005, “Contents of polyamines in selected foods”, *Food Chemistry*, 90, pp. 561-564;
- 19 – Smith, T. K.; Tapia-Salazar, M.; Cruz-Suarez, L. E.; Ricque-Marie, D., “Feed-borne biogenic amines: Natural toxicants or growth promoters?” In *Avances en Nutrición Acuícola V*; Cruz-Suárez, L. E.; Ricque-Marie, D.; Tapia-Salazar, M.; Olvera-Norvoa, M. A.; Civera-Cerecedo, R., Eds; Memorias del Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, 2000; pp. 24-32;
- 20 – Larqué, E.; Sabater-Molina, M.; Zamora, S., 2007, “Biological significance of dietary polyamines”, *Nutrition*, 23, pp. 87–95;

- 21 – Kvasnička, F.; Voldřich, M., 2006, “Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection”, *Journal of Chromatography A*, 1103, pp.145–149;
- 22 – Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F., 2004, “Biogenic amines in meat and meat products”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 489-499;
- 23 – Friday, M. L.; Firman, J. D., 1999, “Effects of biogenic amines on broiler performance”, *Applied Poultry Science, Inc.*, pp. 408-413;
- 24 – Punakivi, K.; Smolander, M.; Niku-Paavola, M. -L.; Mattinen, J.; Buchert, J., 2006, “Enzymatic determination of biogenic amines with transglutaminase”, *Talanta*, 68, pp-1040–1045;
- 25 – Shalaby, A., R., 1996, “Significance of biogenic amines to food safety and human health”, *Food Research International*, 29, pp. 675, 690;
- 26 – Mariné-Font, A.; Vidal-Carou, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, T.; Hernández-Jover, T., 1995, “Les amines biogenes dans les aliments: Leur signification, leur analyse”, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, n° 931, 88, pp. 119-140;
- 27 – Arce, L.; Rios, A.; Valcárcel, M., 1998, “Direct determination of biogenic amines in wine by integrating continuous flow clean-up and capillary electrophoresis with indirect UV detection”, *Journal of Chromatography A*, 803, pp. 249-260;
- 28 – Bodmer, S.; Imark, C.; Kneubühl, M., 1999, “Biogenic amines in foods: Histamine and food processing”, *Inflammatory Research*, 48, pp. 296-300;
- 29 – Soleas, J. G.; Carey, M.; Goldberg, D. M., 1999, “Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines”, *Food Chemistry*, 64, pp. 49-58;
- 30 – Lange, J.; Wittmann, C., 2002, “Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples”, *Anal Bioanal Chem*, 372, pp. 276–283;
- 31 – Önal, A., 2007, “A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods”, *Food Chemistry*, 103, pp. 1475-1486;

- 32 – Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Pinho, O., 2006, “Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines”, *Journal of Food Protection*, 69, nº 9, pp. 2293-2303;
- 33 –Galoppin L., Ponvert C., 1997, “L’Histamine”, *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*, 37, pp. 865-880;
- 34 –Xu Z., Chen X. and Dong S. (2006), “Electrochemical biosensors based on advanced bioimmobilization matrices”, *Trends in Analytical Chemistry*, (25), 9: 899-908;
- 35 –Thévenot, D. R., Toth K., Durst R. A. and Wilson G. S (2001), “Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification”, *Biosensors & Bioelectronics* 16: 121–131;
- 36 – B. Eggins, *Biosensors, an introduction*. 1996: John Wiley & Sons Ltd.
- 37 – Gerard M., Chaubey A. and Malhotra B.D. (2002), “Application of conducting polymers to biosensors”, *Biosensors & Bioelectronics* 17: 345–359;
- 38 – Domínguez O., Arcos M. J., (2006), “Electrochemical Biosensors”, *Encyclopedia of Sensors*, 10: 1–22;
- 39- H. Wohltjen, Chemical Microsensors and Microinstrumentation (1984) *Analytical Chemistry*, 56(1): p. A87-&.
- 40 - M. A. Tartagni, L.; Guerrieri, R, (2004) Microelectronic Chip for Molecular and Cell Biology, in *Sensor Update*, Wiley-VCH, Editor.: Weinheim. p. 156-197.
- 41 – J. M. Cooper and A. E. G. Cass, *Biosensors: a practical approach*. 2<sup>nd</sup> ed. 2004, Oxford, Oxford University Press, XVI;
- 42 - Renedo O. D. and Martínez M. J. A., (2007) “A novel method for the anodic stripping voltammetry determination of Sb(III) using silver nanoparticle-modified screen-printed electrodes”, *Electrochemistry Communications* 9: 820–826;
- 43 – Gonzalo-Ruiz J., Alonso-Lomillo M. A. and Muñoz, F. J., (2007), “Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice”, *Biosensors and Bioelectronics* 22: 1517–1521;

- 44 - Ramanavicius A., A. Ramanaviciene and A. Malinauskas, (2006) “Electrochemical sensors based on conducting polymer—polypyrrole”, *Electrochimica Acta* 51: 6025–6037;
- 45 – Azevedo A. M., Martins V. C., Prazeres D. M. F., Vojinovic V., Cabral J. M. S. and Fonseca L. P., (2003), “Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology”, *Biotechnology Annual*, 9: 199-247;
- 46 –Xiao Y., H.-X. Ju and Chen H.-Y., (1999), “A reagentless hydrogen peroxide sensor based on incorporation of horseradish peroxidase in poly(thionine) film on a monolayer modied electrode”, *Analytica Chimica Acta*, 391: 299-306
- 47 - Wang J. (2002), “Electrochemical nucleic acid biosensors”, *Analytica Chimica Acta* 469: 63–71;
- 48 - Tarushee A., Mir I. A., Kumara D. and Rajesh (2007), “Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications”, *Biomaterials* 28: 791–805;
- 49 –Mikkelsen S. R. and Eduardo Corton, *Bioanalytical Chemistry*, 2004, John Wiley & Sons;
- 50 – Cosnier S., (1999), “Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review”, *Biosensors & Bioelectronics* 14: 443–456;
- 51 - Castillo J., Gáspár S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S.A., Ryabov A.D. and Csöregi E., (2004), “Biosensors for life quality: Design, development and applications”, *Sensors and Actuators B* 102: 179–194;
- 52 - Domínguez O. R., Alonso-Lomillo M.A., Arcos Martínez M.J., (2007), “Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications”, *Talanta* 73: 202–219;
- 53 – Maccarrone M., Rossi A., Avigliano L., Agro A. F., 1991, “Activity and expression of diamine oxidase in lentil seedlings under different growth conditions”, *Plant Science*, 79, pp 51-55;

54 –Niculescu M., FreËbort I., PecË P., Galuszka P., Mattiasson B. and CsoË regi E., 2000, “Amine Oxidase Based Amperometric Biosensors for Histamine Detection”, *Electroanalysis*, 12, pp. 369-375;

55 - Wimmerova' M. , Machola'n L., 1999, “Sensitive amperometric biosensor for the determination of biogenic and synthetic amines using pea seedlings amine oxidase: a novel approach for enzyme immobilization”, *Biosensors & Bioelectronics*, 14, pp. 695–702;

56 - Alonso-Lomillo M.A., Yardimcib C., Domínguez-Renedoa O., Arcos-Martínez M.J., 2009, “CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers”, *Analytica Chimica Acta*, 633, pp 51–56.