

Avaliação da atividade catalítica de filmes finos de polímero conjugado e peroxidase de raiz forte para o desenvolvimento de biossensores

Cléber Gomes de Jesus
Rebeca da Rocha Rodrigues
Luciano Caseli
Laura Oliveira Péres

Universidade Federal de São Paulo - Unifesp,
Departamento de Química, Diadema, SP, Brasil

e-mail: cjesus11@unifesp.br

Hydrogen peroxide is a pivotal molecule boasting versatile applications in both industry and biology. The detection and quantification of molecules have significantly evolved thanks to advancements in material engineering science and the advent of biosensors. These innovative devices not only offer remarkable efficiency but also maintain cost-effectiveness. When coupled with the trend towards miniaturization, they introduce a captivating dimension to the field of analytical chemistry. Within the scope of this chapter, we have engineered three distinct systems of conjugated polymer and horseradish peroxidase thin films to explore the interplay between polymer characteristics and catalytic parameters. Our findings suggest a compelling correlation between the molar mass of the polymer and the efficiency of substrate-enzyme interactions, a relationship further influenced by the electrical properties of the conjugated polymer. In summary, it is evident that polymers characterized by higher molar mass and polydispersity do not serve as ideal matrices for horseradish peroxidase. In contrast, polymers sharing similar physical attributes but distinguished by superior conductivity prove to be more suitable matrices for this enzymatic system.

Lidar com compostos absolutamente puros é frequentemente um objetivo primordial para químicos e engenheiros de processos. Contudo, é amplamente reconhecido que alcançar essa pureza completa é uma meta idealizada. Portanto, a ênfase recai na busca por métodos eficazes de detecção e quantificação de compostos de interesse. Em 1962, Leland Clark e Champ Lyons revolucionaram o campo ao imobilizar a enzima glicose oxidase em um eletrodo de platina, permitindo o monitoramento dos níveis de glicose durante cirurgias cardiovasculares [1, 2]. Esse trabalho pioneiro serviu como catalisador para o desenvolvimento de biossensores, dispositivos inovadores capazes de detectar e quantificar moléculas de interesse com base na interação do analito da amostra com um componente biológico imobilizado [2].

1. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

Biossensores são comumente categorizados de acordo com o componente biológico empregado, como enzimas, vírus, ácidos genéticos, anticorpos, entre outros [3]. Entre as vantagens oferecidas pelos biossensores em comparação com as técnicas analíticas tradicionais, como a cromatografia, destacam-se a rápida resposta, portabilidade, eficiência, especificidade, custo de fabricação reduzido e a dispensa da necessidade de preparar a amostra a ser analisada. Contudo, é crucial otimizar a estabilidade do componente biológico a fim de garantir a reutilização do dispositivo e evitar perdas de desempenho [4].

Em sua estrutura básica, esses dispositivos consistem em uma matriz que tem a função de imobilizar o componente biológico e um transdutor que converte os sinais bioquímicos resultantes da reação (variações de temperatura, pH, etc.) em sinais elétricos. Esses sinais são posteriormente amplificados e processados por uma unidade de processamento de sinal, tornando a resposta inteligível [5]. O funcionamento dos biossensores enzimáticos está intrinsecamente relacionado à interação entre o analito presente na amostra e o componente biológico escolhido. Portanto, a imobilização da proteína deve manter um equilíbrio delicado: deve ser suficientemente forte para evitar a lixiviação, porém não a ponto de afetar as estruturas terciária e quaternária da enzima [6].

Entre as principais técnicas de imobilização, destacam-se a adsorção por interação eletrostáticas (física) e a imobilização por ligações covalentes (química).

Na adsorção física, a solução enzimática é depositada em uma superfície, estabelecendo ligações intermoleculares fracas, como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Um exemplo notável é o trabalho de Rodrigues et al., que empregaram a técnica de Langmuir-Blodgett para depositar filmes e a enzima fitase como componente biológico visando à detecção de ácido fítico [7]. Embora a imobilização por adsorção física seja mais simples e prática, apresenta a limitação de que as interações mais fracas podem ser facilmente rompidas, o que pode comprometer a capacidade de reutilização do biossensor [6].

Por outro lado, a imobilização por ligações covalentes envolve a ligação de grupos funcionais da cadeia proteica que não estão relacionados aos grupos químicos responsáveis pela catálise, proporcionando maior estabilidade. No entanto, tal estratégia geralmente requer o uso de reagentes para ativar a superfície e disponibilizar os grupos funcionais para a ligação, o que pode representar um desafio para a reprodutibilidade do método. Nesse contexto, Azak et al. demonstraram a imobilização covalente da enzima glicose oxidase em um eletrodo de ouro modificado com um polímero conjugado, resultando em um biossensor adequado para processos em batelada e detecção de glicose [6,8].

Quando se trata dos suportes utilizados para a imobilização de enzimas, é notável que em ambos os trabalhos mencionados anteriormente, foram empregados polímeros conjugados (PCs). Esses materiais se destacam por algumas de suas características notáveis, como condutividade e propriedades optoeletrônicas, derivadas da presença de duplas ligações alternadas em suas cadeias. Essas características promovem interações em orbitais π adjacentes, favorecendo o transporte de elétrons [9]. Embora a literatura já contenha diversos estudos associando polímeros conjugados a aplicações como células solares e diodos orgânicos emissores de luz (OLED) [10], suas propriedades podem ser estendidas para a aplicação em biossensores. Isso resulta em um aumento da estabilidade, sensibilidade e na capacidade de desempenhar simultaneamente o papel de matriz e transdutor no dispositivo de detecção [9, 11].

2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), com uma estrutura molecular semelhante a da água, é um oxidante poderoso, notável por sua conversão em radical hidro-

xila ($\cdot\text{OH}$), uma espécie altamente reativa. Devido a essas propriedades, o peróxido de hidrogênio é amplamente empregado em aplicações como o branqueamento de papel e o tratamento de efluentes devido à sua eficácia na degradação de impurezas [12].

A decomposição dessa molécula resulta na liberação de oxigênio gasoso e calor, tornando o contato com soluções altamente concentradas de H_2O_2 potencialmente perigoso. Além disso, o poder oxidativo do peróxido de hidrogênio desempenha um papel vital no metabolismo humano e é regulado por organelas denominadas peroxissomos. As reações que ocorrem nos peroxissomos envolvem uma variedade de enzimas da classe oxirredutases, incluindo a catalase e a glutational peroxidase, que catalisam reações de oxirredução. Dependendo das condições do organismo, os peroxissomos podem regular a produção ou a decomposição do H_2O_2 , convertendo-o em água e oxigênio molecular. Isso ocorre devido à alta reatividade dos radicais livres quando acumulados nas células [12, 13].

3. COMO OCORRE A INTERAÇÃO ENTRE ANALITO E COMPONENTE BIOLÓGICO?

No desenvolvimento de um biossensor é de extrema importância compreender se a reação de interesse está ocorrendo e se a sua velocidade é compatível com o método de detecção. Isso ocorre porque reações excessivamente lentas podem resultar em tempos de análise prolongados, enquanto reações excessivamente rápidas podem gerar resultados imprecisos. Em geral, uma reação catalisada por enzimas depende da interação entre o substrato e o sítio ativo da proteína, formando um complexo de transição que demanda menor energia, o que, por sua vez, reduz a barreira energética para a formação dos produtos desejados [14].

Dado que o processo catalítico é dinâmico, na criação de biossensores, a imobilização das enzimas deve manter a sua atividade catalítica, apesar da redução

intrínseca da atividade que ocorre durante o processo de imobilização [15]. Como mencionado na seção 1 deste capítulo, a técnica de imobilização usada neste estudo é a adsorção física, que tende a ser mais facilmente rompida devido às interações moleculares, que basicamente envolvem forças de van der Waals. Para avaliar a deposição da enzima no polímero, é comum utilizar técnicas de espectroscopia no UV-Vis, infravermelho e de fluorescência [16], a fim de comparar as bandas e picos registrados para o polímero em questão e o filme polímero/enzima.

A classe de polímeros conjugados é ampla, mas considerando três materiais como exemplo, conforme ilustrado na Figura 1, é possível observar a presença de anéis aromáticos, o que confere a eles características optoeletrônicas, como condutividade elétrica, absorção e emissão de luz [17]. Como indicado na Figura 2a, a presença de uma banda com máximo em 380 nm no espectro de absorção provavelmente está relacionada ao polímero, uma vez que materiais com grupos aromáticos, pertencentes a essa classe de materiais, geralmente absorvem na região azul [18]. Além disso, no espectro de emissão, o desdobramento da banda em quatro regiões indica a presença da enzima no filme, o que pode ser confirmado pelo espectro de infravermelho, conforme ilustrado na Figura 2b. Os picos nas regiões destacadas em 1640 , 1539 e 1263 cm^{-1} indicam a presença de bandas de amida, características de proteínas [19].

Em termos gerais, na maioria das reações enzimáticas é possível considerar o estabelecimento do equilíbrio termodinâmico. Nesse contexto, o equilíbrio entre enzima e substrato é atingido mais rapidamente do que a quebra do complexo enzima-substrato, uma condição na qual o modelo de Michaelis-Menten pode ser aplicado com sucesso [20]. No referido modelo é viável estabelecer uma relação entre a velocidade da reação catalítica e a concentração do substrato, como representado na Equação 1. Nessa equação, “ v ” representa a velocidade de formação do produto, “ V ”

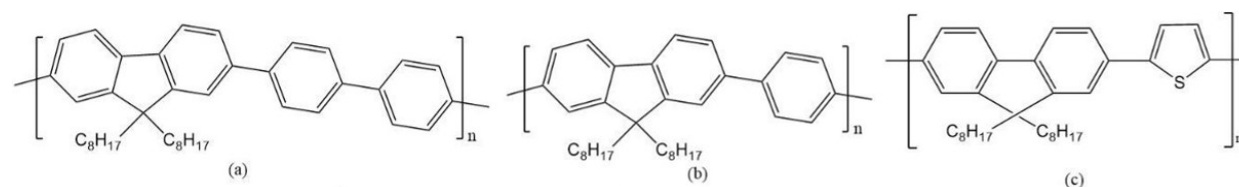


Figura 1. Exemplos de polímeros conjugados utilizados para a imobilização da enzima, (a) poli (9,9-dioctilfluoreno-co-bifenileno) (PFB), (b) poli (9,9-dioctilfluoreno-co-fenileno) (PFPh) e (c) poli (9,9-dioctilfluoreno-co-tiofeno) (PTh).

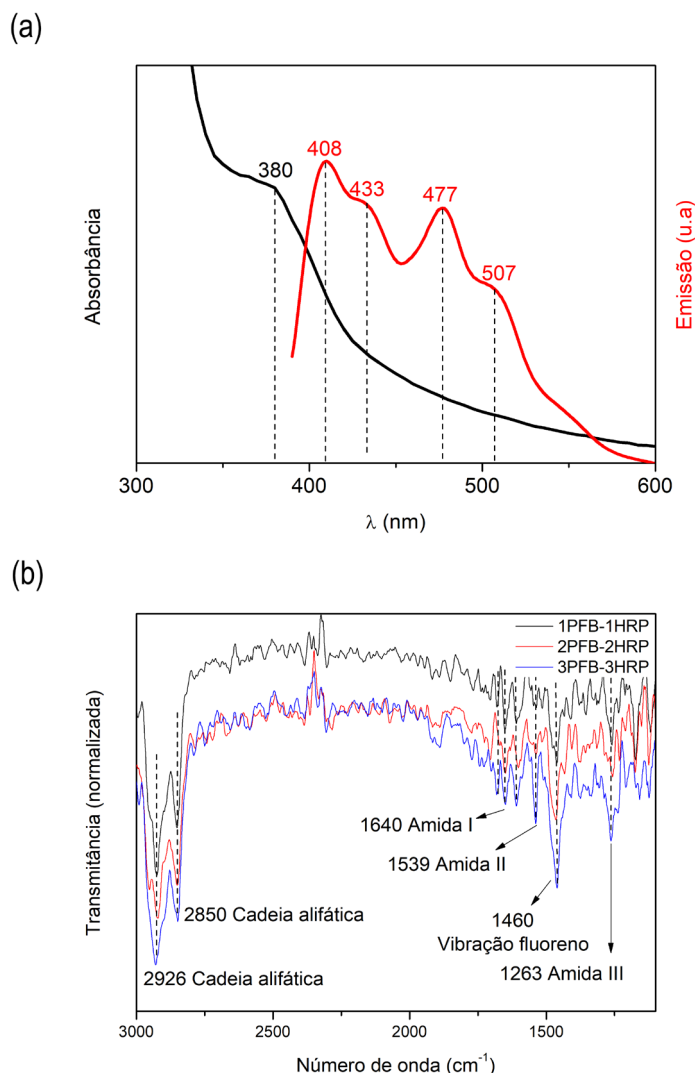


Figura 2. Espectros de absorção e emissão (a) e de infravermelho (b) para filmes contendo PFB e horseradish peroxidase (HRP).

é a velocidade máxima de formação, “[S]” denota a concentração do substrato, e “ K_M ” é a concentração na qual metade da velocidade máxima é alcançada [14]. Para reações que se ajustam a esse modelo, é esperado que a velocidade aumente com o tempo até que o equilíbrio seja alcançado. Um exemplo ilustrativo pode ser observado na Figura 3. Dado que a reação em estudo foi realizada no espectrofotômetro UV-Vis, a absorbância do produto guarda uma relação proporcional com a velocidade de formação [11].

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Uma das maneiras de representar as reações de cinética michaeliana é através da representação gráfi-

ca de Lineweaver-Burk [21], que envolve uma simples transformação da Equação (1) em uma forma inversa, resultando na Equação (2). Com essa abordagem, é possível obter, a partir de uma representação gráfica linear, os valores de K_M e V , como ilustrado na Figura 4. Do ponto de vista matemático, o valor da constante de Michaelis-Menten (K_M) é um indicativo da eficiência da interação entre a enzima e o substrato, sendo que valores menores de K_M correspondem a concentrações menores de substrato necessárias para atingir a metade da velocidade máxima, o que reflete uma interação mais eficaz [16]. Para fins de comparação dos sistemas estudados, a Figura 5 sintetiza as principais propriedades discutidas ao longo deste capítulo, incluindo a constante de Michaelis-Menten

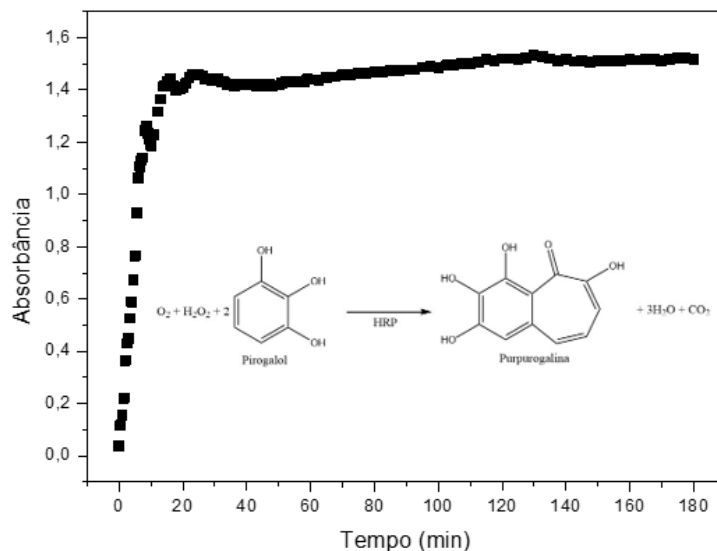


Figura 3. Absorbância em função do tempo (a curva obtida é característica de uma reação enzimática). A reação de formação do composto luminescente é indicada no interior da Figura.

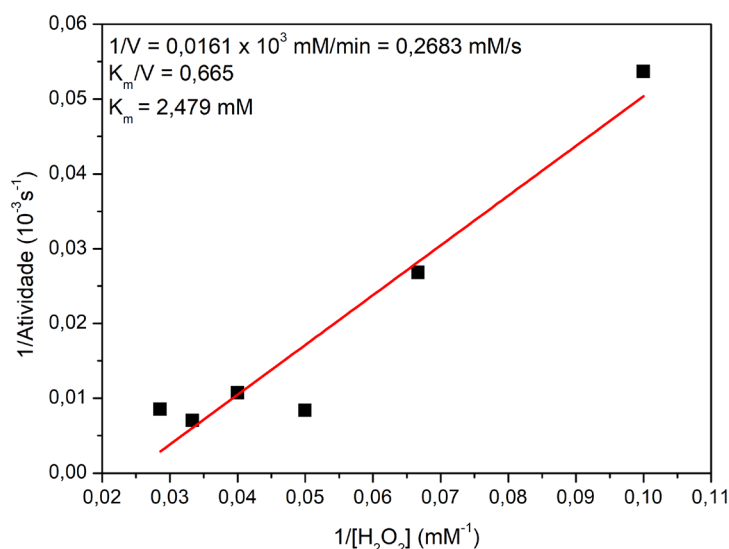


Figura 4. Gráfico de Lineweaver-Burk e cálculo de K_M e V para o sistema PFB/HRP.

(K_M) e as propriedades dos polímeros, tais como massa molar (M_n), energia entre as bandas de valência e de condução (E_{gap}) e polidispersividade.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V} \quad (2)$$

Em um trabalho realizado com a enzima urease [16], observou-se que polímeros de maior massa molar e polidispersividade tendem a estabelecer forças intermoleculares mais intensas. Isso pode afetar a estru-

tura proteica e, conseqüentemente, dificultar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. No entanto, apesar do PFB apresentar maiores valores de massa e polidispersividade em comparação ao PFPh, este último revelou um valor menor de K_M . Essa diferença pode estar relacionada à estrutura da enzima e ao tipo de reação. Como a HRP é uma enzima que contém o grupo heme, um complexo de ferriprotoporfirina IX, a interação com um polímero de maior condutividade (e me-

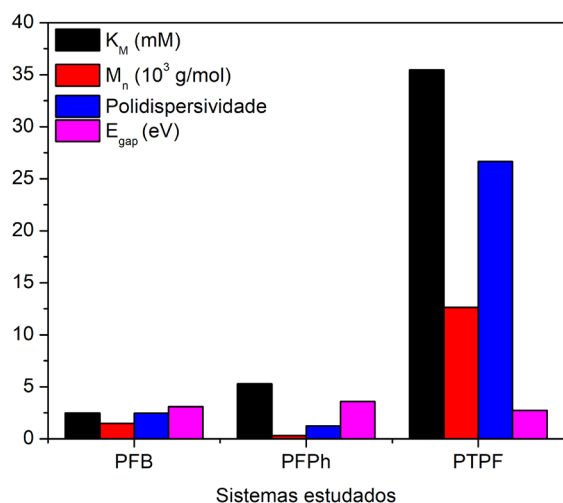


Figura 5. Principais propriedades dos sistemas estudados: constante de Michaelis-Menten (K_M), massa molar do polímero (M_n), energia entre as bandas de valência e condução (E_{gap}) e polidispersividade.

nor E_{gap}) demonstrou ser mais eficiente. Esses resultados sugerem descobertas promissoras que abrem novas perspectivas para futuras investigações nesta área [22].

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a enzima peroxidase de raiz forte (HRP) imobilizada em diferentes polímeros conjugados, visando ao desenvolvimento de biossensores. Ao comparar os resultados com trabalhos anteriores na literatura, observamos que as propriedades dos polímeros podem influenciar os parâmetros catalíticos, com ênfase na massa molar e polidispersividade. Além disso, para enzimas de classes diferentes, o tipo de reação catalítica sugere interações distintas com o polímero conjugado utilizado como matriz, abrindo diversas oportunidades de aprimoramento no desenvolvimento de dispositivos com base no par polímero/enzima escolhido.

AGRADECIMENTOS

Os autores do trabalho agradecem a CAPES (88887.608793/2021-00) e FAPESP (2020/04427-2; 22/13938-6; 2014/50869-6).

REFERÊNCIAS

[1] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery,” Ann.

N. Y. Acad. Sci. 102(1) (1962) 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.

- [2] A.E.F. Oliveira, A.C. Pereira, Biossensores e a indústria alimentar - revisão, Rev. Virtual Quim. 8(5) (2016) 1311–1333. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160094>.
- [3] A.D. Teklemariam, M. Samaddar, M.G. Alharbi, R.R. Al-Hindi, A.K., 2020. Bhunia, Biosensor and molecular-based methods for the detection of human coronaviruses: a review, Mol. Cell. Probes. 54, 101662. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101662>.
- [4] M. Zandi, S. Zandi, R. Mohammadi, P. Hosseini, S. Teymouri, S. Soltani, A. Rasouli, Biosensor as an alternative diagnostic method for rabies virus detection: A literature review, Biotechnol. Appl. Biochem. 69 (2022) 1348–1353. <https://doi.org/10.1002/bab.2207>.
- [5] V. Perumal, U. Hashim, Advances in biosensors: principle, architecture and applications, J. Appl. Biomed. 12 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>.
- [6] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, Biotechnol. Adv. 30(3) (2012) 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.
- [7] R.R. Rodrigues, L. Caseli, L. O. Péres, Langmuir and Langmuir-Blodgett films of poly[(9,9-dioctylfluorene)-co-(3-hexylthiophene)] for immobilization of phytase: possible application as a phytic acid sensor, Langmuir 36(35) (2020) 10587–10596. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01941>.
- [8] H. Azak, H.B. Yildiz, B.B. Carbas, Synthesis and characterization of a new poly(dithieno (3,2-b:2',3'-d) pyrrole) derivative conjugated polymer: its electrochromic and biosensing applications, Polymer (Guildf) 134 (2018) 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.11.044>.
- [9] B.D. Malhotra, A. Chaudhary, S.P. Singh, Prospects of conducting polymers in biosensors, Anal. Chim. Acta 578(1) (2006) 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.055>.
- [10] R. Ismail, V.L.P. Guerra, P. Kovaříček, 2023. Sequential in-situ growth of layered conjugated polymers for optoelectronics under electrochemical control. Chempluschem 88(9), e2023002. <https://doi.org/10.1002/cplu.202300280>.
- [11] R. R. Rodrigues, T.P. Aquino, L. Caseli, L.O. Péres, 2020. Enzyme activity of thiophene-fluorene based-copolymer blended with urease in thin films, Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 603, 125139. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125139>.
- [12] I. L. Mattos, K.A. Shiraishi, A.D. Braz, J.R. Fernandes, Peróxido de hidrogênio: importância e determinação, Quim. Nova 26(6) (2003) 373–380. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300015>.

- [13] M. Fransen, C. Lismont, Redox signaling from and to peroxisomes: progress, challenges, and prospects, *Antioxid. Redox Signal* 30(1) 2019 95–112. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7515>.
- [14] S. Schnell, Validity of the Michaelis-Menten equation - steady-state or reactant stationary assumption: that is the question, *FEBS J.* 281(2) 2014 464–472. <https://doi.org/10.1111/febs.12564>.
- [15] S.V. Rao, K.W. Anderson, L.G. Bachas, Oriented immobilization of proteins, *Mikrochim. Acta* 128(3) (1998) 127–143. <https://doi.org/10.1007/bf01243043>.
- [16] C.G. Jesus, R. R. Rodrigues, L. Caseli, L.O. Péres, 2022. Conducting polymers modulating the catalytic activity of urease in thin composite films. *Colloid. Surf: A Physicochem. Eng. Asp.* 654, 130136. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.130136>.
- [17] C. G. Barbosa, L. Caseli, L. O. Péres, Conjugated polymers nanostructured as smart interfaces for controlling the catalytic properties of enzymes, *J. Colloid Interface Sci.* 476 (2016) 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.05.033>.
- [18] L.O. Péres, M.R. Fernandes, J.R. Garcia, S.H. Wang, F.C. Nart, Synthesis and characterization of chloro and bromo substituted p-phenylene vinylene homopolymers and alternating copolymers, *Synth. Met.* 156(7–8) (2006) 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2006.01.014>.
- [19] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39(8) (2007) 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.
- [20] F. A. Leone, *Fundamentos de cinética enzimática*, Appris, Curitiba, 2021.
- [21] H. Lineweaver, D. Burk, The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56(3) (1934) 658–666. <https://doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- [22] P.J.O. Brien, Peroxidases, *Chem.-Biol. Interact.* 129 (2000) 113–139. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00201-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00201-5)