



**LARISSA SOUZA CASTRO**

**MODELAGEM E ANÁLISE DE UM BIOSSENSOR  
POTENCIOMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE GLICOSE EM  
SOLUÇÃO**

**LAVRAS – MG**

**2020**

**LARISSA SOUZA CASTRO**

**MODELAGEM E ANÁLISE DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO  
PARA DETECÇÃO DE GLICOSE EM SOLUÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Prof. Dr. Gilson Campani Junior

Orientador

Prof. Dr. Raphael Aparecido Sanches Nascimento

Coorientador

**LAVRAS – MG  
2020**

**LARISSA SOUZA CASTRO**

**MODELAGEM E ANÁLISE DE UM BIOSENSOR POTENCIOMÉTRICO  
PARA DETECÇÃO DE GLICOSE EM SOLUÇÃO**

**MODELING AND ANALYSIS OF A POTENTIOMETRIC BIOSENSOR FOR  
DETECTION OF GLUCOSE IN SOLUTION**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovada em 17 de julho de 2020  
Prof. Dra. Suellen Mendonça Nascimento UFLA  
Prof. Me. Thiago José Barbosa Mesquita UFSCar

---

Prof. Dr. Gilson Campani Junior  
Orientador

---

Prof. Dr. Raphael Aparecido Sanches Nascimento  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2020**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por toda bondade e amor incondicional pela vida e tudo que nela existe. Momentos incontáveis em que sua presença se fez fortaleza e alicerce ao meu coração.

À Universidade Federal de Lavras que com muito carinho proporcionou uma oportunidade ímpar para a base da minha formação profissional. Lugar onde guardo belas e saudosas lembranças.

Ao Departamento de Engenharia por todo apoio e suporte.

Aos professores pela dedicação, paciência, orientação e amizade. Vocês têm a minha honra e respeito. Foi um imenso privilégio ter sido aluna de vocês! Pessoas que guardo com carinho e amor no coração.

À minha família por todo amor e dedicação. Grata por serem sol em minha vida e por estarem sempre presentes. O amor de vocês é base e sustento para o meu viver. Exemplos de doação e singelo amor.

Ao Omar e Vivette pela calorosa acolhida, pessoas que se tornaram pais de coração. Grata por todo amor e bem querer. Vocês são alicerces em meu viver. Desde sempre e para sempre os amarei.

Aos amigos de Lavras pela amizade e pelos momentos de alegria que sempre preencheram o meu coração. A presença de vocês neste ciclo foi um imenso presente.

## RESUMO

A busca por biossensores para diagnósticos mais eficazes, que necessitam de amostras diminutas, tem sido pertinente às novas tecnologias. O comportamento dos biossensores pode ser descrito por equações diferenciais bem estabelecidas quanto aos fenômenos físicos, químicos e biológicos. Estas equações podem auxiliar na predição de diversas características operacionais e construtivas do dispositivo. Desta forma, o trabalho tem como objetivo realizar a modelagem matemática do funcionamento de um biossensor construído com imobilização enzimática, além de executar simulações que visem propor melhorias construtivas e operacionais do mesmo. A análise das simulações possui o foco nas possíveis alternativas de ampliação da sensibilidade do dispositivo. O modelo matemático é proposto com base na aplicação do balanço de massa e na cinética de reação enzimática catalítica condizentes ao sistema. Especificamente, o modelo se baseia na Equação Geral da Continuidade Mássica e na Equação de Michaelis-Menten aprimorada por Briggs e Haldane. Os resultados numéricos foram comparados com os resultados analíticos e a validação do modelo foi realizada estatisticamente por meio dos métodos de Coeficiente de Determinação  $R^2$  e Teste F no *software OriginPro 8*. O modelo também foi empregado em simulações que visavam a análise do comportamento da sensibilidade do biossensor através do *software Excel*. Notou-se que a sensibilidade do biossensor em relação à sua sensibilidade máxima é dependente dos seus parâmetros construtivos, cinéticos e físico-químicos como, por exemplo, a difusividade do substrato ( $D_S$ ), a difusividade do produto ( $D_P$ ), a espessura da camada enzimática ( $d$ ), a concentração de enzima ( $C_E$ ), a concentração de substrato ( $C_S$ ) e as constantes de velocidades de reações ( $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$ ). Dentre estes parâmetros observou-se que o aumento da concentração total de enzimas ( $C_E$ ) é uma forma simples e promissora de se ampliar a sensibilidade do mesmo. No entanto, foi atentado que não é válido muito esforço em aumentar esta concentração, uma vez que as respostas do dispositivo em função da concentração de enzimas segue um comportamento assintótico, ou seja, há um limite superior teórico para a sensibilidade do biossensor ( $S_{máx}$ ). Além disso, a sensibilidade mostrou-se altamente dependente da concentração de enzimas em pequenas quantidades desta. Trabalhos de modelagens matemáticas que se baseiam em fenômenos físico-químicos, como este, podem contribuir para a compreensão fenomenológica operacional do biossensor, agregando ao aprimoramento construtivo do mesmo. As limitações encontradas no desenvolvimento do trabalho foram o não conhecimento dos valores dos parâmetros construtivos do biossensor, sendo, estes, fontes de inspiração para possíveis trabalhos futuros.

**Palavras-chave:** biossensor, modelagem matemática, glicose oxidase, quitosana.

## ABSTRACT

The search for biosensors for more effective diagnostics that require small samples has been pertinent to new technologies. The behavior of biosensors can be described by well-established differential equations for physical, chemical, and biological phenomena. These equations can help in predicting the various operational and constructive characteristics of the device. This study concentrates on modeling the operation of a biosensor built with enzymatic immobilization, as well as performing simulations aiming to propose constructive and operational improvements of it. The simulations analysis focuses on the possible alternatives for increasing the sensitivity of the device. The mathematical model is proposed based on the application of mass balance and catalytic enzymatic reaction kinetics compatible with the system. Specifically, the model is based on the General Equation of Mass Continuity and the Michaelis-Menten Equation enhanced by Briggs and Haldane. The numerical results were compared with the analytical results and the validation of the model was statistically performed using the methods of the coefficient of determination  $R^2$  and F-test in the OriginPro 8 software. The model was also used in simulations of the sensitivity behavior of the biosensor by using Excel software. The sensitivity of the biosensor concerning its maximum sensitivity is dependent on its constructive, kinetic and physicochemical parameters such as diffusivity of the substrate ( $D_S$ ), the diffusivity of the product ( $D_P$ ), the thickness of the enzymatic layer ( $d$ ), enzyme concentration ( $C_E$ ), substrate concentration ( $C_S$ ), and the constants of reaction velocities ( $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$ ). Also, the increase in total enzyme concentration ( $C_E$ ) is a simple and promising way to increase its sensitivity. However, it was observed that not much effort is needed to increase this concentration since the responses of the device due to the concentration of enzymes follow an asymptotic behavior. In other words, there is a theoretical upper limit for the sensitivity of the biosensor ( $S_{m\acute{a}x}$ ). Furthermore, the sensitivity is highly dependent on the concentration of enzymes in small amounts. Mathematical modeling works based on physicochemical phenomena can contribute to the operational phenomenological understanding of the biosensor, adding the constructive improvement of it. The shortcoming observed in this work was the lack of knowledge of the values of the biosensor construction parameters, which are sources of insight for future research.

**Keywords:** biosensor, mathematical modeling, glucose oxidase, chitosan.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da enzima glicose oxidase em três dimensões. ....	7
Figura 2 – Esquematização estrutural da reação da Glicose Oxidase. ....	8
Figura 3 – Interferências iônicas no mecanismo de reação enzimática em diferentes condições de pH. ....	9
Figura 4 – Comportamento gráfico do modelo de Briggs-Haldane para uma reação enzimática genérica. ....	16
Figura 5 – Ilustração representativa do resíduo de um valor individual observado. ....	18
Figura 6 – Representação do aparato do biossensor EGFET. ....	21
Figura 7 – Sistema de referência para a modelagem matemática do biossensor potenciométrico. ....	23
Figura 8 – Representação gráfica operacional do biossensor potenciométrico. ....	27
Figura 9 – Comportamento do biossensor frente a variação de concentração de glicose. ....	28
Figura 10 – Gráfico de ajuste do modelo linear para o sinal de corrente do biossensor em função da concentração de glicose. ....	31
Figura 11 – Gráfico de resíduos dos dados experimentais obtidos. ....	32
Figura 12 – Gráfico da sensibilidade normalizada em função dos parâmetros do biossensor. ....	34
Figura 13 – Gráfico da sensibilidade normalizada em função dos parâmetros do biossensor destacando a condição hipotética da sensibilidade normalizada. ....	36
Figura 14 – Gráfico da sensibilidade normalizada do biossensor em função da concentração total de enzima. ....	37

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Classificação dos biossensores conforme o tipo físico-químico do transdutor. ....	4
Tabela 2 – Efeito da concentração de oxigênio no número de conversões enzimáticas da glicose oxidase.....	9
Tabela 3 – Dados experimentais de corrente elétrica de saída do biossensor em função da concentração de glicose. ....	30



## LISTA DE SIGLAS

DAC	Doença arterial coronariana
DAP	Doença arterial periférica
EGFET	<i>Extended Gate Field Effect Transistor</i>
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídio
FET	<i>Field Effect Transistor</i>
FTO	<i>Fluorine Tin Oxide</i>
ISFET	<i>Ion Sensitive Field Effect Transistor</i>
MOSFET	<i>Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

$GO_x$	Enzima glicose oxidase
pH	Potencial hidrogeniônico
$N_E$	Números de conversões enzimáticas
$j_{Ay}$	Fluxo mássico da espécie A relativo à velocidade mássica média na direção positiva do eixo y
$\rho$	Densidade de um sistema genérico A-B
$D_{AB}$	Difusividade do sistema A-B
$w_A$	Fração mássica de A
$v$	Velocidade mássica média de mistura
$\vartheta$	Velocidade molar média da mistura
$J_{Ay}$	Fluxo molar da espécie A relativo à velocidade molar média na direção positiva do eixo y
$C$	Concentração molar total da mistura A-B
$x_A$	Fração molar de A
$n_A$	Fluxo mássico absoluto ou total da espécie A
$n_B$	Fluxo mássico absoluto ou total da espécie B
$N_A$	Fluxo molar absoluto ou total da espécie A
$N_B$	Fluxo molar absoluto ou total da espécie B.
$C_A$	Concentração da espécie química A
$R_A$	Taxa de produção molar de A por reação química
$E$	Enzima
$S$	Substrato
$ES$	Complexo enzima-substrato
$P$	Produto
$k_1$	Constante de velocidade de formação do complexo enzima-substrato
$k_{-1}$	Constante de velocidade de decomposição do complexo
$k_2$	Constante de velocidade de formação de produto
$v_0$	Velocidade de reação enzimática
$C_S$	Concentração de substrato
$V_{máx}$	Máximo valor da velocidade molar média da mistura

$K_S$	Constante de dissociação do complexo enzima-substrato
$K_M$	Constante de Michaelis-Menten
$C_{Ei}$	Concentração inicial de enzima
$R^2$	Coefficiente de determinação do modelo
$y_i$	Valor experimental
$\bar{y}$	Média global dos valores observados
$\hat{y}_i$	Valor previsto para um determinado experimento
$SQ_T$	Soma quadrática em torno da média
$SQ_R$	Soma quadrática devida à regressão
$SQ_r$	Soma quadrática residual.
$MQ_R$	Média quadrática devido à regressão
$MQ_r$	Média quadrática residual
$F$	Distribuição da razão entre a média quadrática devido à regressão e a média quadrática residual
$n$	Número de dados experimentais
$\beta_0$	Parâmetro linear
$\beta_1$	Parâmetro angular
$X_i$	Variável independente
$\varepsilon_i$	Erro aleatório associado à determinação experimental
$SQ_R$	Soma quadrática
MQ's	Médias quadráticas
$\nu_T$	Número de graus de liberdade da soma quadrática em relação à média
$\nu_R$	Número de graus de liberdade da soma quadrática devido à regressão
$\nu_r$	Número de graus de liberdade da soma quadrática residual
$p$	Número de parâmetros de um caso geral de um modelo matemático
$V_{Ref}$	Potencial de referência
$V_{ion}$	Potencial gerado pelos íons em solução
$V_{GS}$	Potencial gerado entre o dreno e a fonte do transistor
$I_{DS}$	Corrente gerada pelo o potencial dos íons
$d$	Espessura da camada de enzima
$D_S$	Coefficiente de difusividade do substrato no meio

$C_E$	Concentração total de enzima
$D_P$	Coefficiente de difusividade do produto no meio
$C_P$	Concentração de produto
$C_{S,B}$	Concentração do substrato (glicose) na solução
$C_{P,B}$	Concentração de produto (íons $H^+$ ) na solução
$k$	Razão entre a velocidade máxima média da mistura e a constante de Michaelis-Menten
$c_1$	Constante genérica da equação diferencial ordinária
$c_2$	Constante genérica da equação diferencial ordinária
$\alpha_1$	Raiz da equação característica
$\alpha_2$	Raiz da equação característica
$z$	Posição perpendicular à camada de enzima
$\alpha$	Termo variante da equação característica
$c_3$	Constante genérica
$c_4$	Constante genérica
$I_i$	Valor previsto da corrente
$A$	Coefficiente linear
$B$	Coefficiente angular
$\Delta C_{P_i}$	Varição de concentração do ácido glucônico no volume de controle
$S_N$	Sensibilidade normalizada
$S$	Sensibilidade do biossensor
$S_{m\acute{a}x}$	Sensibilidade máxima do biossensor
$A$	Fator pré-exponencial
$E_a$	Energia de ativação
$R$	Constante universal dos gases
$T$	Temperatura absoluta
$C_{E0}$	Concentração de enzimas hipotética

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1	Biossensor potenciométrico.....	4
2.2	Enzima glicose oxidase.....	6
2.3	Imobilização enzimática.....	10
2.3.1	Quitosana.....	10
2.4	Fenômeno de transferência de massa.....	11
2.5	Modelos cinéticos de reações enzimáticas.....	15
2.6	Análise estatística.....	17
2.6.1	Coefficiente de determinação ( $R^2$ ).....	17
2.6.2	Teste F.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Biossensor de estudo.....	21
3.2	Desenvolvimento do modelo matemático do biossensor.....	23
3.2.1	Perfil de concentração do substrato.....	25
3.2.2	Perfil de concentração do produto.....	26
3.3	Ajuste do modelo e análise matemática do biossensor.....	29
3.4	Análises estatísticas.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	Ajuste do modelo matemático do biossensor.....	30
4.2	Propostas de melhorias ao biossensor.....	33
5	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39



## 1 INTRODUÇÃO

A humanidade, ao longo dos anos, passou por diversas mudanças na medicina, especialmente nas realizações em diagnósticos e tratamentos de doenças. Ainda hoje é possível perceber que este campo é desafiado, todos os dias, pela busca de soluções e melhorias nas áreas de pesquisa. A diabetes, por exemplo, é uma doença que tem crescido constantemente o número de enfermos ao redor do mundo com aproximadamente 422 milhões de adultos em 2014 (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2019) e 463 milhões no ano de 2019 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2019). A previsão do seu aumento para 2030 são de 578 milhões de pessoas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2019). Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a diabetes causou pelo menos US\$ 727 bilhões de dólares com despesas em saúde no ano de 2017, além de ter provocado 4 milhões de mortes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2017). Ademais, esta doença pode acarretar outras complicações na saúde como hipoglicemia, infecções, perda de consciência, neuropatia, doença arterial coronariana (DAC), doença arterial periférica (DAP), entre outras (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2017).

A construção de novas tecnologias que proporcionem diagnósticos mais rápidos, procedimentos menos invasivos e coletas de amostras em quantidades menores e satisfatórias são almejadas constantemente para o avanço da saúde. A grande estratégia tecnológica é o desenvolvimento de dispositivos e sensores diminutos que possuem alta sensibilidade de medição e que satisfaça as características supracitadas (NASCIMENTO; MULATO, 2019).

O monitoramento dos níveis de glicose no sangue pode ser aferido por biossensores que detectam o sinal biológico e traduzem a um sinal físico proporcional à concentração de analito na reação (BHALLA et al., 2016). Dentre esses dispositivos, os biossensores eletroquímicos são os mais extensivamente utilizados, por fornecerem simplicidade de confecção, facilidade de operação, especificidade e detecção de pequenas concentrações (SAWANT, 2017). Esses dispositivos podem ainda ser classificados em biossensores amperométricos, potenciométricos ou condutométricos (REUILLARD; GOFF; COSNIER, 2014).

Para biossensores eletroquímicos empregados no monitoramento de glicemia, por exemplo, o analito da amostra de sangue de uma pessoa é a molécula de glicose e o seu bioreceptor é a enzima glicose oxidase ( $GO_x$ ). Essa enzima flavina tem sido amplamente utilizada no monitoramento dos níveis de glicose do sangue em razão da sua nobre habilidade catalítica de glicose (LIU et al., 2005). O bioreconhecimento da reação entre a glicose e a

enzima  $GO_x$  pode ser monitorado por meio da diferença de pH provocada no meio reacional em virtude da produção de ácido glucônico.

A imobilização de enzimas auxilia notoriamente o desenvolvimento de biocatalisadores robustos, que podem suportar ambientes não favoráveis com um tempo de vida útil superior (TRAN; BALKUS, 2011). O uso de enzimas livres não é adequado, por exemplo, para níveis industriais em razão da sua baixa estabilidade e atividade em meios agressivos, além da inibição parcial ou total em concentrações altas de substratos ou produtos (CACICEDO et al., 2019).

A compreensão fenomenológica do biossensor de glicose pode ser realizada por meio da realização de balanços de massa em um determinado volume de controle, juntamente com os modelos cinéticos das reações enzimáticas. A Equação Geral da Continuidade Mássica e a Equação de Michaelis-Menten aprimorada por Briggs e Haldane conseguem estabelecer a modelagem matemática e fundamental do funcionamento de um biossensor de glicose.

A modelagem matemática de biossensores e sua análise possibilitam uma melhor compreensão do seu funcionamento, auxiliando no desenvolvimento de estratégias de aprimoramento operacionais e construtivos. Mais especificamente, os modelos matemáticos alicerçados em fenômenos físicos e químicos possibilitam a identificação de variáveis limitantes e, conseqüentemente, a proposição de melhorias operacionais e construtivas no sistema. Além disso, os modelos matemáticos são simplificações da realidade, que auxiliam na compreensão dos sistemas complexos. A previsão experimental de alguns processos, por exemplo, pode ser inviável economicamente, competindo a modelagem matemática auxiliar na predição das análises variantes do mesmo. Neste campo de atuação ainda há poucas pesquisas que abordam e exploram este assunto com profundidade e clareza (ISMAIL et al., 2017; MEENA; RAJENDRAN, 2010; MORF et al., 2011).

Diante desta conjuntura o trabalho tem como objetivo realizar a modelagem, simulação e análise de um biossensor potenciométrico para a detecção de glicose em solução. Como objetivos específicos, temos: (i) proposição de modelo matemático que descreva o funcionamento do biossensor com base em equações fenomenológicas de balanço e transferência de massa e de cinética enzimática; (ii) ajuste do modelo proposto a dados experimentais referentes a um biossensor construído com imobilização enzimática por quitosana, apresentado por Nascimento e Mulato (2019); (iii) análise matemática do sistema, a partir de simulações numéricas, a fim de propor melhorias construtivas e de operação do biossensor, que visem maior sensibilidade frente às condições operacionais. Esses resultados



contribuem para a melhor compreensão do funcionamento do biossensor e para guiar a implementação prática de mudanças na sua construção e operação.

O presente trabalho está dividido em 5 seções. Na seção 2, são apresentados conceitos básicos sobre a classificação de um biossensor potenciométrico, a caracterização da enzima glicose oxidase e a sua aplicação em biossensores potenciométricos para glicose em solução. Além disso, são tratadas temáticas envolvidas no processo como a imobilização enzimática, a transferência de massa e o modelo cinético regentes ao fenômeno físico-químico do sistema. A seção 3 mostra a metodologia empregada no processo para a realização dos objetivos específicos. A seção subsequente explicita os resultados encontrados e abordados abrangendo a modelagem matemática do sistema, a validação deste modelo por meio de análises estatísticas e a simulação do mesmo apoiada por estratégias de aprimoramento e identificação dos parâmetros limitantes. Por fim, a conclusão é estabelecida.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Biossensor potenciométrico

Os biossensores são utilizados para detectar e monitorar diferentes tipos de analitos, tendo potencial de aplicação em diversas áreas como alimentícia, ambiental, análises clínicas e diagnósticos médicos (JUSTINO; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2010).

A classificação dos biossensores é realizada pelo tipo físico-químico do transdutor ou pelo bioreconhecimento do analito de interesse (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016). Desta maneira, ao considerar o tipo do transdutor, os biossensores podem ser categorizados conforme a Tabela 1 a seguir. E ao considerar o tipo de bioreconhecimento do analito de interesse, os biossensores podem ser classificados como: imunossensores (baseados na interação antígeno-anticorpo) e enzimáticos (baseados na interação enzima-analito alvo) (JUSTINO; DUARTE; ROCHA-SANTOS, 2016).

Tabela 1 – Classificação dos biossensores conforme o tipo físico-químico do transdutor.

Sensor	Operação	Fonte
Eletroquímico	<u>Amperométrico</u> : mede a corrente elétrica produzida durante a oxidação ou redução do produto ou reagente eletroativos.	(SAWANT, 2017)
	<u>Potenciométrico</u> : mede a diferença de potencial do eletrodo do biossensor em relação ao eletrodo de referência.	(SAWANT, 2017)
	<u>Conduutométrico</u> : mede a mudança da condutância resultante da reação bioquímica.	(SAWANT, 2017)
Óptico	A interação entre o analito e o transdutor se dá por meio de propriedades ópticas como absorbância, refletância, luminescência, fluorescência, índice de refração e ressonância plasmônica de superfície (SPR).	(FARRÉ et al., 2009)
Térmico	São baseados na mensuração das mudanças térmicas provindas das reações bioquímicas como a diferença de entalpia e calor.	(SAWANT, 2017)
Piezoelétrico	Medem a diferença de massa a partir da mudança na frequência de oscilação do cristal do piezoelétrico.	(SAWANT, 2017)

Fonte: Do autor.

A classe dos biossensores eletroquímicos é um dos pilares dos biossensores biomédicos, onde se pode encontrar com notoriedade os biossensores potenciométricos. Estes, por sua vez, se baseiam na interação do íon produzido, a partir de uma reação química em solução, com uma membrana ou eletrodo de camada sensível às reações eletroquímicas (VADGAMA, 2001). A configuração formada é caracterizada por uma membrana potencial que é inserida juntamente com uma referência externa estável na mesma solução (VADGAMA, 2001). Portanto, os biossensores potenciométricos medem a diferença de potencial entre dois eletrodos em condições de não fluxo de corrente elétrica externa. A medida deste potencial é empregada para determinar quantidades analíticas de um componente presente em solução (COSIO; SCAMPICCHIO; BENEDETTI, 2012). Desse modo, o biossensor potenciométrico é idealmente uma função da atividade de um único íon para que o mesmo possa ser avaliado seletivamente, mesmo na presença de outras espécies (PULLANO et al., 2018).

O sensor EGFET (*Extended Gate Field Effect Transistor*) é um tipo de sensor potenciométrico que é bastante empregado na detecção de espécies iônicas, pH e moléculas específicas como a glicose e a ureia (HIDESHIMA et al., 2011; LIN et al., 2013; PAN et al., 2010; PIJANOWSKA; TORBICZ, 1997; SCHÖNING; POGHOSSIAN, 2006; SELVANAYAGAM et al., 2002). Suas vantagens se baseiam na baixa sensibilidade à temperatura e à luz, na flexibilidade decorrente da extensão da sua base (*gate*), no método simples de passivação (deposição metálica na confecção do EGFET que auxilia a proteger a camada sensível do mesmo) (KIM, D. S. et al., 2006; KIM, T. H. et al., 2012) e na maior estabilidade a longo prazo (GUAN et al., 2013). A configuração desse sensor é basicamente formada por um transistor de efeito de campo (*Field Effect Transistor – FET*) e uma membrana biologicamente ou quimicamente sensível, separada e acoplada à base deste transistor por meio de um fio estendido (KIM D. S. et al., 2006). Já o ISFET (*Ion Sensitive Field Effect Transistor*) utiliza apenas a porta (*gate*) do transistor de efeito de campo como uma membrana sensível para a detecção de íons e requer a produção de todo o componente eletrônico, sendo esta a sua maior desvantagem na construção de um sensor potenciométrico (NASCIMENTO, 2015). A diferença, portanto, entre ambos os sistemas se encontra na parte externa adicional do EGFET, que é responsável por expor diretamente a membrana sensível à solução tampão, e isolar o FET do ambiente químico ou biológico (SLEWA; ABBAS; AHMED, 2019), proporcionando maior estabilidade e durabilidade.

A parte principal do ISFET ou EGFET é o transistor de efeito de campo (FET), o qual detecta um sinal de voltagem em sua base, o qual possibilita a passagem de corrente elétrica

entre a fonte (*source*) e o dreno (*drain*) do dispositivo. A transferência de corrente elétrica depende diretamente da diferença de potencial aplicada na base, ou seja, se a voltagem for maior, o campo elétrico irá aumentar de maneira a viabilizar a passagem de maior corrente elétrica no interior do transistor e vice-versa. O MOSFET (*Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor*), por sua vez, é um tipo específico de transistor de efeito de campo (FET), que apresenta como principal vantagem uma alta impedância de entrada, a qual é possível através do isolamento entre o semicondutor do corpo do FET e o metal externo da porta por meio de um óxido. Isso permite que o controle do fluxo de corrente elétrica entre o dreno e a fonte por meio de um sinal elétrico de pequena intensidade aplicado à sua porta (NASCIMENTO, 2015).

A aplicação do sensor EGFET na determinação de analitos em solução se fundamenta na diferença de potencial hidrogeniônico causada pela protonação ou desprotonação de moléculas em reações químicas que ocorrem na superfície da membrana sensível (PARIZI et al., 2017). A diferença de potencial entre o eletrodo de referência e a base estendida do transistor (membrana sensível) gera, então, um campo elétrico na interface do semicondutor do transistor, alterando proporcionalmente a corrente elétrica que passa pelo canal fonte-dreno (GUIDELLI; GUERRA; MULATO, 2012). Com isso, é possível obter um sinal elétrico de corrente proporcional à concentração de íons  $H^+$  na superfície da membrana.

## 2.2 Enzima glicose oxidase

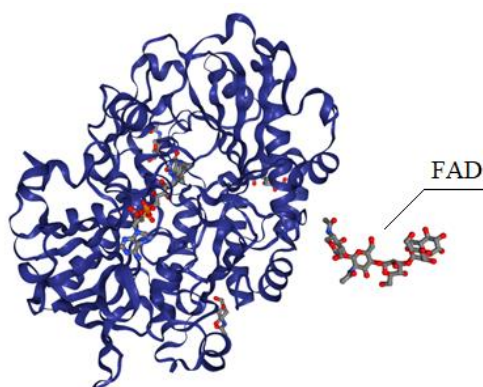
A molécula de glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ) é um carboidrato do tipo monossacarídeo (SILVA; FREITAS FILHO; FREITAS, 2018) que pode ser oxidada por quatro enzimas diferentes: quinoproteína desidrogenase, glicose desidrogenase, glicose 1-oxidase e glicose 2-oxidase. Dentre estas, a glicose 1-oxidase é amplamente utilizada na detecção eletroquímica de glicose no sangue por apresentar alta especificidade à molécula  $\beta$ -D-glicose (STAIANO et al., 2017) e estabilidade quando liofilizada, cuja conservação é mantida por dois anos a  $0^\circ C$  e por oito anos a  $-15^\circ C$  (SUMAIYA; TRIVEDI, 2015). É visto também que a  $GO_x$  (glicose 1-oxidase) é estável em diferentes condições de pH e temperatura (ROMERO; CANTERO, 1998).

A  $GO_x$  é obtida comumente de fontes microbianas, como os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium amagasakiense*, *Alternaria alternate* (CARIDIS; CHRISTAKOPOULOS; MACRIS, 1991), *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus*

*versicolor* (GUIMARÃES et al., 2006). No entanto, a cultura de fungos *Aspergillus niger* é a mais comumente empregada devido à sua maior eficiência de produção de enzima, a qual é baseada na fermentação em estado sólido (SINGH; SINGH; SHWETA, 2019).

A  $GO_x$  obtida do fungo *Aspergillus niger* é caracterizada como flavoproteína dimérica, sendo constituída por duas cadeias idênticas de polipeptídios e um cofator Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) no centro de cada um destes monômeros (SUMAIYA; TRIVEDI, 2015). Cada subunidade desta enzima possui massa molecular de aproximadamente 80 kDa (ALDRICH, 2018). A estrutura tridimensional da enzima  $GO_x$  é retratada na Figura 1:

Figura 1 – Estrutura da enzima glicose oxidase em três dimensões.

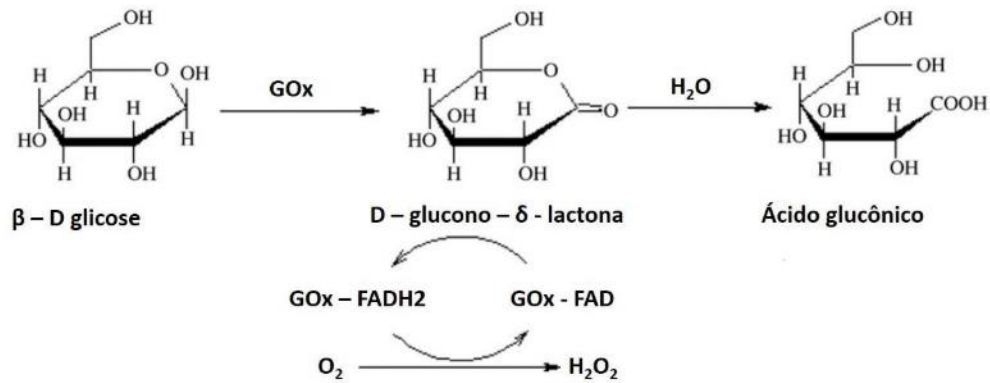


Fonte: Adaptado de PROTEIN DATA BANK (2019).

A enzima  $GO_x$  é pertencente à família oxidoreductase glicose/metanol/colina (GMC), em que os membros desta família compartilham uma estrutura básica homóloga, incluindo a adenina-dinucleotídeo-fosfato próxima ao grupo amino e cinco outros segmentos de sequências fixos dispersos por suas sequências primárias (FERRI; KOJIMA; SODE, 2011).

O cofator FAD confere à enzima a capacidade de catalisar reações de oxidação-redução. Especificamente no caso da  $GO_x$ , sua função é catalisar a reação de oxidação da  $\beta$ -D-glicose para D-glucono- $\delta$ -lactona, utilizando o oxigênio molecular comoceptor de elétrons. Durante o processo catalítico a oxidação da glicose é acompanhada da redução do cofator FAD a  $FADH_2$ . Posteriormente, a flavina ( $FADH_2$ ) é oxidada na presença de oxigênio, produzindo peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) e retornando à forma FAD (HU; LU; XU, 2008). Desta maneira, a forma oxidada da enzima é reestabelecida, possibilitando o seguimento da reação, como é ilustrada na Figura 2 a seguir:

Figura 2 – Esquemática estrutural da reação da Glicose Oxidase.



Fonte: Adaptado de SOUSA (2017).

O D-glucono-δ-lactona, por sua vez, é hidrolisado espontaneamente produzindo o ácido glucônico como produto final (FERRI; KOJIMA; SODE, 2011). A glicose oxidase apresenta atividade catalítica em uma faixa de pH entre 4 e 7, sendo o pH ótimo de 5,5 (HERMANSON, 2013). Em vista disso, a produção de ácido glucônico pode inibir a atividade enzimática em razão da redução do pH (MIRÓN et al., 2002). O acúmulo de peróxido de oxigênio também pode prejudicar a atividade enzimática devido à modificação de metioninas localizadas próximas ao local ativo da forma reduzida da glicose oxidase ( $GO_x - FADH_2$ ). Esta forma reduzida é sensível 100 vezes mais ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a forma oxidada ( $GO_x - FAD$ ) (KLEPPE, 1966).

Venugopal e Saviue (1993) verificaram que a enzima  $GO_x$  sofre um efeito simultâneo em relação à concentração de oxigênio ( $O_2$ ) no meio, onde maiores quantidades desta molécula elevam a taxa de conversão da reação química, porém levando também a um aumento na taxa de inativação enzimática. Para definir uma concentração ótima de  $O_2$  são avaliados os números de conversões enzimáticas ( $N_E$ ), sendo estes definidos como a razão da taxa de conversão do substrato e da taxa de inativação enzimática. Este efeito do oxigênio sobre o número de conversões enzimáticas é apresentado na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2 – Efeito da concentração de oxigênio no número de conversões enzimáticas da glicose oxidase.

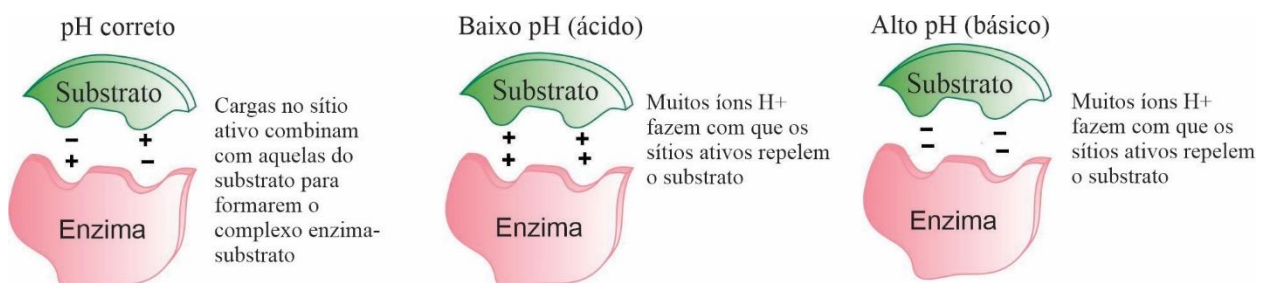
$pO_2$ (kPa)	Número de conversões enzimáticas ( $N_E$ )
10,0	$11,0 \times 10^4$
15,0	$8,61 \times 10^4$
21,0	$7,56 \times 10^4$
51,0	$6,60 \times 10^4$
76,0	$6,16 \times 10^4$
101,0	$5,68 \times 10^4$

Fonte: Adaptado de VENUGOPAL e SAVIUE (1993).

De acordo com Venugopal e Saviue (1993), o número de conversões enzimáticas da  $GO_x$  é inversamente proporcional à concentração de oxigênio dissolvido. Além disso, a maximização do valor de  $N_E$  e a menor concentração de  $O_2$  é requerida quando se deseja obter uma minimização da inativação enzimática. Em contrapartida, quando se almeja obter maiores taxas reacionais em períodos curtos de operação, emprega-se maiores concentrações de  $O_2$ .

O efeito do pH sobre a atividade enzimática da  $GO_x$  é decorrente da alteração iônica do seu sítio ativo, o que interfere na interação da enzima com o substrato (glicose) e o cofator (FAD) e, conseqüentemente, na taxa de reação (SHULER; KARGI 2002). Mais especificamente, a presença de íons livres de  $H^+$  e  $OH^-$  no meio dificultam a formação do complexo enzima-substrato, uma vez que os aminoácidos são constituídos por regiões ácidas e básicas dadas pelos seus grupos funcionais carboxila e amina. Este fenômeno é ilustrado na Figura 3 a seguir:

Figura 3 – Interferências iônicas no mecanismo de reação enzimática em diferentes condições de pH.



Fonte: Adaptado de WILLIAMS (2015).

Finalmente, ao analisar o efeito da temperatura sobre a reação enzimática, observa-se que quando ocorre o seu aumento no meio a enzima recebe energia em forma de calor e a transforma em energia cinética fazendo com que haja maior vibração intramolecular, o que

reflete na desnaturação molecular. Como a enzima muda a sua forma geométrica, o substrato não consegue interagir adequadamente com o sítio ativo da enzima, impossibilitando a formação do complexo enzima-substrato pelo mecanismo “chave-fechadura”. Se a enzima for desnaturada não há ferramentas ou processos que reverta à sua forma original, tornando-a permanente em sua forma modificada (WILLIAMS, 2015).

### **2.3 Imobilização enzimática**

A imobilização da enzima é uma técnica que tem como objetivo confinar, fisicamente, a enzima em uma dada região do espaço, além de reter as suas atividades catalíticas e proporcionar o seu reuso repetidamente e continuamente (KATCHALSKI-KATZIR, 1993), aumentando o seu tempo de vida. A sua prática é comum e efetiva na modificação enzimática, tornando oportuno o melhoramento da atividade catalítica e a sua estabilidade. Algumas vantagens em relação à enzima livre podem ser ponderadas, como por exemplo, maior facilidade nas etapas de recuperação (processo de purificação); empregabilidade contínua em longo prazo; estabilidade superior em relação à enzima livre; condições de reação controladas com maior facilidade; produtividade e qualidade do produto ampliadas por meio da eficiência catalítica de imobilização e custo de produção menor (XIN et al., 2019).

Existem diversos métodos de aplicação da imobilização enzimática como adsorção, incorporação, combinação e ligação cruzada (XIN et al., 2019). No entanto, cada método apresenta vantagens e desvantagens, cuja escolha é vinculada com a natureza da enzima (características bioquímicas e propriedades cinéticas) e a matriz de suporte (características químicas e propriedades mecânicas). Desta forma, pode-se determinar a aplicabilidade de cada processo específico (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIEIRA 2013) .

#### **2.3.1 Quitosana**

A quitosana é um material atrativo para a imobilização das enzimas, por apresentar propriedades interessantes como formação de filmes (biopolímero) com boa adesão, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta permeabilidade à água e não toxicidade. Sua composição é formada por (1 → 4) -2-amino-2-deoxi-β-d-glucano, sendo um derivativo da



quitina (segundo polissacarídeo mais abundante na natureza). A quitosana pode ser empregada na imobilização da enzima  $GO_x$ , onde a interação entre ambas é realizada fisicamente com a enzima retida na rede polissacarídica (método conhecido como confinamento em matrizes poliméricas). Além disso, os grupos amina da quitosana fornecem uma proteção à enzima, evitando a sua desprotonação em soluções eletrolíticas (pH de 7,4) pela formação de uma espécie de hidrogel no eletrodo, que mantém as suas propriedades naturais. Em contrapartida, a quitosana possui baixa condutividade, o que dificulta a transferência dos sinais elétricos para o transdutor, acarretando adversidades no desempenho do biossensor (FERNANDES et al., 2003; LUO et al., 2004; NASCIMENTO, 2015; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SUSANTO et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Susanto et. al (2013) constataram também que em altas concentrações de quitosana, os poros do biopolímero são menores, dificultando a transferência de massa dos produtos da reação enzimática ao eletrodo. Além disso, Ang, Por e Yam (2013) estudaram o comportamento da  $GO_x$  imobilizada por quitosana em função do seu peso molecular, observando que a quitosana de médio peso molecular proporciona melhores resultados na atividade enzimática específica e na estabilidade da enzima em relação a quitosana de baixo peso molecular. Em contrapartida, a quitosana de baixo peso molecular apresenta maior porcentagem de retenção na atividade enzimática (SUSANTO et al., 2013).

## 2.4 Fenômeno de transferência de massa

O estudo do fenômeno de transferência de massa é crucial para a compreensão de inúmeros sistemas de reação. A distância entre os reagentes e o local de reação afeta significativamente a taxa de transferência de massa, assim como a taxa de conversão (HIMMELBLAU; BISCHOFF, 1966).

O fenômeno da transferência de massa é decorrente do gradiente de potencial químico da espécie  $i$ , a qual provoca a migração da matéria de uma região de alto valor para uma de menor valor deste potencial. No entanto, o manuseio do conceito de potencial químico detém uma abordagem complexa por se tratar de uma tendência de escape da matéria. Desta forma, faz-se necessária a utilização do conceito de concentração de uma espécie química para o estudo do deslocamento da matéria (transferência de massa). A empregabilidade da concentração para este fenômeno encontra-se deduzida por Cremasco (2015), partindo da pressuposição de uma

solução ideal e diluída de uma determinada espécie química  $i$ . Esta espécie é denominada soluto, enquanto que a região que comporta uma população de espécies químicas distintas é o solvente.

O gradiente de concentração de soluto é a força motriz responsável pela movimentação da matéria em um meio. Consequentemente, o movimento da matéria é proporcional a essa força motriz e dependente da resistência que o meio oferece ao transporte do soluto. Essa resistência está relacionada com a interação soluto-meio ou interação soluto-meio mais a ação externa (características dinâmicas do meio e/ou geometria do local) (CREMASCO, 2015).

O fenômeno de transferência de massa pode ocorrer através dos seguintes mecanismos:

- Difusivo: transporte da matéria é realizado em razão das interações moleculares;
- Convectivo: transporte da matéria é decorrente do movimento do meio.

Para um sistema de duas espécies químicas genéricas A e B que se encontra em regime permanente e localizado em uma placa plana, verifica-se que o fluxo de massa da espécie A por unidade de área é proporcional à diferença da fração mássica entre as superfícies, dividida pela espessura da placa. Este fator de proporcionalidade é representado pela difusividade entre as espécies A e B. A aproximação descrita acima, ao considerar um elemento diferencial de volume de controle, é retratada pela Equação 1 a seguir (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004):

$$j_{Ay} = -\rho D_{AB} \frac{dw_A}{dy} \quad (1)$$

onde  $j_{Ay}$  [kg/m<sup>2</sup>s] é o fluxo mássico da espécie A relativo à velocidade mássica média na direção positiva do eixo y,  $\rho$  [kg/m<sup>3</sup>] é a densidade do sistema A-B,  $D_{AB}$  [m<sup>2</sup>/s] é a difusividade do sistema A-B,  $w_A$  é a fração mássica de A e y [m] é a coordenada do eixo.

A Equação 1 representa a Primeira Lei da Difusão de Fick, a qual é válida para qualquer mistura binária sólida, líquida ou gasosa, contanto que  $j_{Ay}$  seja o fluxo de massa relativo à velocidade mássica média de mistura  $v$  (BIRD; STEWART; LIGHTFOOT, 2004). Caso o fluxo seja na base molar a velocidade média da mistura ( $\vartheta$ ) também será nesta mesma base.

A Equação 1 anterior está representada em base mássica e ao ser analisada a sua base molar, ela toma a seguinte forma (Equação 2) (INCROPERA et al., 2008):

$$J_{Ay} = -CD_{AB} \frac{dx_A}{dy} \quad (2)$$

onde  $J_{Ay}$  [mol/m<sup>2</sup>s] é o fluxo molar da espécie A relativo à velocidade molar média na direção positiva do eixo y,  $C$  [mol/L] é concentração molar total da mistura A-B e  $x_A$  [m] é a fração molar de A.

Desta forma, a Primeira Lei da Difusão de Fick estabelece que o fluxo difusivo de uma espécie química A em um sistema binário isotérmico e isobárico é proporcional ao gradiente de concentração. O sinal negativo indica que a espécie A se move da região de maior concentração para a de menor concentração, ou seja, o decréscimo da concentração de A ocorre no sentido do fluxo (CREMASCO, 2015).

No entanto, o movimento global de transferência de massa possui geralmente ambas as contribuições difusivas e convectivas em relação a um sistema de coordenadas fixo. A contribuição difusiva é em virtude do movimento da espécie química A em relação ao movimento mássico médio da mistura, já a contribuição convectiva é devido ao movimento de A com a movimentação mássica média da mistura, como representado na Equação 3 a seguir para um sistema binário (INCROPERA et al., 2008):

$$n_A = -\rho D_{AB} \nabla w_A + w_A (n_A + n_B) \quad (3)$$

onde  $n_A$  [kg/m<sup>2</sup>s] é o fluxo mássico absoluto ou total da espécie A e  $n_B$  [kg/m<sup>2</sup>s] é o fluxo mássico absoluto ou total da espécie B.

A expressão anterior representada em coordenadas cartesianas e na base mássica, pode também ser descrita na base molar, conforme a Equação 4 a seguir (INCROPERA et al., 2008):

$$N_A = -C D_{AB} \nabla x_A + x_A (N_A + N_B) \quad (4)$$

onde  $N_A$  [mol/m<sup>2</sup>s] é o fluxo molar absoluto ou total da espécie A e  $N_B$  [mol/m<sup>2</sup>s] é o fluxo molar absoluto ou total da espécie B.

Para analisar problemas de transferência de massa é interessante que se aplique a lei da conservação de espécies. A equação da continuidade mássica de certo soluto A vem do balanço de massa aplicado em um determinado volume de controle. Este balanço material através do volume de controle é definido por (CREMASCO, 2015):

$$\begin{aligned} & \left( \begin{array}{c} \text{Taxa de massa} \\ \text{que entra no} \\ \text{volume de controle} \end{array} \right) - \left( \begin{array}{c} \text{Taxa de massa} \\ \text{que sai do} \\ \text{volume de controle} \end{array} \right) \\ & + \left( \begin{array}{c} \text{Taxa de produção} \\ \text{de massa no} \\ \text{volume de controle} \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Taxa de acúmulo} \\ \text{de massa no} \\ \text{volume de controle} \end{array} \right) \end{aligned} \quad (5)$$

Realizando-se este balanço em coordenadas cartesianas e considerando as contribuições difusivas e convectivas, além de desempenhar algumas manipulações e simplificações matemáticas, encontra-se a Equação Geral da Continuidade Mássica (Equação 6) (CREMASCO, 2015):

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} + \nabla[C_A \vartheta] = \nabla \cdot [D_{AB} \nabla C_A] + R_A \quad (6)$$

onde  $C_A$  [mol/L] é a concentração da espécie química A,  $\vartheta$  [dm/s] é a velocidade molar média da mistura e  $R_A$  [mol/L·s] é a taxa de produção molar de A por reação química.

A Equação 6 fornece a distribuição de concentração da espécie química A como resultado de diversas influências sobre o transporte do soluto. Esta equação também pode ser manuseada em termos mássicos ao realizar a multiplicação da equação pela densidade da mistura  $\rho$ .

Algumas hipóteses simplificadoras na Equação 6 podem ser aplicadas, considerando-se diferentes casos e obtendo, conseqüentemente, diferentes perfis de concentrações para a espécie química almejada. Um caso muito comum na Engenharia Química é o sistema definido pelo regime transiente, velocidade do meio nula, sistema sem reação química em condições isobáricas e isotérmicas, chegando-se à Segunda Lei de Difusão de Fick exposta na Equação 7 a seguir (CREMASCO, 2015):

$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{AB} \nabla^2 C_A \quad (7)$$

Esta Segunda Lei de Difusão de Fick possui numerosas aplicações em análises de casos como adsorção, secagem, fabricação de aço e permeação de gases em matrizes poliméricas (BARONAS; IVANAUSKAS; KULYS, 2003b; BARTLETT; PRATT, 1993; BRITZ et al., 2009; CREMASCO, 2015; ISMAIL et al., 2017).

Todas estas equações apresentadas foram desenvolvidas considerando um sistema binário genérico de mistura A-B, em coordenadas retangulares e para a espécie química A. As mesmas equações poderiam ser realizadas para a espécie química B.

As teorias cinéticas para a difusão em líquidos, gases, sólidos, suspensões coloidais, polímeros, entre outros, possuem as suas particularidades e se baseiam em diferentes desenvolvimentos e correlações empíricas que melhor configuram os procedimentos empregados para a estimativa dos parâmetros desejados.

## 2.5 Modelos cinéticos de reações enzimáticas

A cinética das reações enzimáticas é uma ciência importante para a compreensão dos mecanismos bioquímicos, pois abrange os estudos dos fatores determinantes de uma reação química assim como os aspectos que afetam a sua velocidade. No caso mais básico de uma reação catalisada por enzima com apenas um substrato, pode-se chegar a uma equação simples e geral (Equação 8) (PALMER; BONNER, 2007), que considera a ligação de apenas um substrato por enzima e representa o comportamento global dos componentes envolvidos:



onde  $E$ ,  $S$ ,  $ES$  e  $P$  são, respectivamente, enzima, substrato, complexo enzima-substrato e produto. Já as taxas de reações  $k_1$  [1/s],  $k_{-1}$  [1/s] e  $k_2$  [1/s] são referentes à constante de velocidade de formação do complexo enzima-substrato, a constante de velocidade de decomposição deste complexo e constante de velocidade de formação de produto, nesta ordem.

A cinética é geralmente modelada por um conjunto de equações diferenciais sob a consideração de algumas premissas simplificadoras. Um modelo amplamente utilizado é o de Michaelis-Menten (MM), o qual considera a aproximação de estado estacionário, assumindo a concentração aproximadamente constante do complexo enzima-substrato ( $ES$ ) após um curto período transiente (DHATT; BHATTACHARYYA, 2013). O equilíbrio entre a enzima, o substrato e o complexo enzima-substrato é quase instantaneamente estabelecido. E a decomposição deste complexo para a formação do produto é muito lenta, o que não causa distúrbio significativo no equilíbrio. A partir dessas considerações, chega-se a uma relação hiperbólica entre os valores de velocidade de reação enzimática  $v_0$  e a concentração do substrato  $C_S$  (PALMER; BONNER, 2007), como evidenciado na Equação 9 a seguir:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} C_S}{C_S + K_S} \quad (9)$$

onde  $v_0$  [mol/L·s] é a velocidade de reação enzimática,  $V_{m\acute{a}x}$  [mol/L·s] é o máximo valor de  $v_0$ ,  $C_S$  [mol/L] é a concentração de substrato e  $K_S$  [mol/L] é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato, a qual é definida como  $k_{-1}/k_1$ .

Michaelis e Menten assumiram que a concentração de substrato é muito maior que a de enzima no início da reação, sendo esta asserção geralmente verdadeira para as reações enzimáticas. Essa consideração acarreta em uma mudança insignificativa da concentração do

complexo enzima-substrato, resultando num estado quase-estacionário. Entretanto, esse conceito proposto por Michaelis e Menten não pode ser empregado para casos em que haja a perturbação do equilíbrio, como por exemplo, em reações enzimáticas que possuem taxas muito rápidas de reação (PALMER; BONNER, 2007).

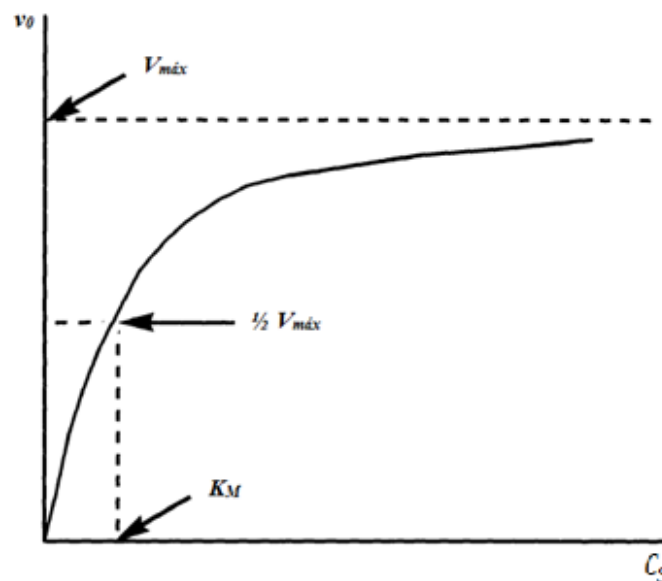
Briggs e Haldane não assumem equilíbrio rápido entre a enzima, o substrato e o complexo enzima-substrato, além de considerarem que a variação de concentração do complexo enzima-substrato é desprezível. Desta forma, este complexo é mantido em estado quase-estacionário em razão da sua concentração constante após um período inicial da reação (PALMER; BONNER, 2007). A definição matemática deste modelo é semelhante à equação de Michaelis-Menten (Equação 9), diferenciando apenas na definição da constante  $K_M$ , como se segue abaixo na Equação 10:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}C_S}{C_S + K_M} \quad (10)$$

onde  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten descrita por  $(k_{-1} + k_2)/k_1$ .

A condição de equilíbrio proposta por Michaelis-Menten pode ser obtida, como observado na Equação 10, assumindo que  $k_{-1} \gg k_2$ . Para o modelo de Briggs-Haldane o nome da equação é mantida de Michaelis-Menten e a constante  $K_M$  recebe o nome de constante de Michaelis-Menten. O gráfico de  $v_0$  versus  $C_S$  fornece uma hipérbole retangular, a qual é esboçada na Figura 4 a seguir:

Figura 4 – Comportamento gráfico do modelo de Briggs-Haldane para uma reação enzimática genérica.



Fonte: Adaptado de PALMER e BONNER (2007).

Quando a concentração inicial de substrato  $C_S$  é igual ao valor de  $K_M$ , tem-se que  $v_0$  corresponde a  $V_{m\acute{a}x}/2$ . Portanto, o valor da constante  $K_M$  equivalente à concentração do substrato para a qual taxa de reação é metade da velocidade máxima para a enzima.

Para Laidler (1995) o estado quase-estacionário pode ser alcançado se houver o cumprimento de qualquer um dos seguintes aspectos:

- i.  $C_S \gg C_{Ei}$  ;
- ii.  $k_{-1} + k_2 \gg k_1 C_{Si}$ ;
- iii.  $k_{-1} + k_2 \gg k_1 C_{Ei}$ .

onde  $C_{Ei}$  é a concentração inicial de enzima.

A desigualdade “i” é comumente encontrada na maioria dos casos de sistemas enzimáticos. Caso as magnitudes das concentrações de  $C_S$  e  $C_{Ei}$  forem equiparáveis, as condições “ii” e “iii” levam também o sistema ao estado quase estacionário (LAIDLER, 1955). Diversas pesquisas atribuíram e aplicaram este conceito em diferentes metodologias e situações pertinentes (BURKE, 2019; GOEKE; WALCHER; ZERZ, 2017; JITHINRAJ; ROY; GOPALAKRISHNAN, 2014).

## 2.6 Análise estatística

### 2.6.1 Coeficiente de determinação ( $R^2$ )

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) é um parâmetro que caracteriza numericamente a variância dos resíduos provenientes da regressão linear. O resíduo, por sua vez, é uma medida que exprime o quão próximo ou distante o valor observado está do valor previsto. Desta maneira, consegue-se expressá-lo por meio da seguinte Equação 11 (BARROS NETO et al., 2001):

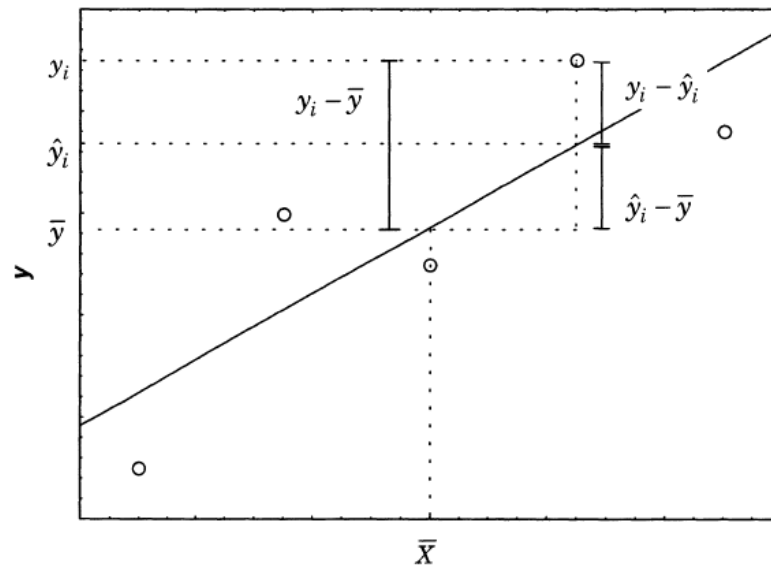
$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i) \quad (11)$$

onde  $y_i$  é o valor observado,  $\bar{y}$  é a média global dos valores observados,  $\hat{y}_i$  é o valor previsto e o subíndice  $i$  indica a observação realizada.

Por meio da Equação 11 pode-se notar que o resíduo de um dado valor individual é a soma do desvio do valor previsto em relação à média global ( $\hat{y}_i - \bar{y}$ ) e do desvio do valor observado em relação ao valor previsto. Esta mesma análise pode ser verificada por meio da

Figura 5 a seguir, onde há um sistema amostral genérico acompanhado da sua função de modelagem:

Figura 5 – Ilustração representativa do resíduo de um valor individual observado.



Fonte: (BARROS NETO et al., 2001).

Para expressar esta comparação em termos quantitativos é necessário elevar todos os termos ao quadrado e realizar o somatório sobre todos os pontos:

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum [(\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i)]^2 \quad (12)$$

Ao decompor a segunda parcela da equação e sabendo que o somatório do produto  $(\hat{y}_i - \bar{y})(y_i - \hat{y}_i)$  é igual a zero, chega-se à seguinte resolução:

$$\sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (13)$$

Numa notação mais sucinta pode-se escrever que

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (14)$$

onde  $SQ_T$  é a soma quadrática em torno da média,  $SQ_R$  é a soma quadrática devido à regressão e  $SQ_r$  é a soma quadrática residual.

Esta equação mostra que a variação total dos valores observados  $y_i$  em relação à média  $\bar{y}$  é expressa pela a equação de regressão e os resíduos. Com base neste desenvolvimento, pode-se afirmar que o ajuste do modelo é tanto melhor quanto menor for a soma quadrática residual, uma vez que assim o valor observado  $y_i$  está mais próximo do valor previsto  $\hat{y}_i$ . Esta análise pode ser quantificada por meio da seguinte razão:



$$R^2 = \frac{SQ_R}{SQ_T} = \frac{\sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum(y_i - \bar{y})^2} \quad (15)$$

O  $R^2$  é, portanto, nomeado de coeficiente de determinação do modelo. O seu valor máximo é 1, quando a parcela de resíduos é nula, e desta forma a variação dos valores observados em torno da média é explicada pela regressão. O modelo terá o melhor ajuste em relação aos valores observados quando este tiver o valor do  $R^2$  mais próximo de 1 (BARROS NETO et al., 2001)

### 2.6.2 Teste F

O teste F é aplicado para avaliar a significância estatística da regressão linear. Este teste parte do pressuposto (hipótese nula) que os erros (resíduos) seguem uma distribuição normal e que, quando não há relação entre a variável dependente e a variável independente do sistema (coeficiente angular igual a zero) a razão entre a média quadrática devido à regressão ( $MQ_R$ ) e a média quadrática residual ( $MQ_r$ ) segue uma distribuição  $F$ . Portanto, caso o valor calculado de  $F$  não se enquadre na distribuição  $F$ , podemos descartar a hipótese nula e afirmar que o modelo matemático é estatisticamente significativo.

A razão entre as médias quadráticas pode ser demonstrada pela Equação 16 a seguir para um modelo genérico de dois parâmetros:

$$\frac{MQ_R}{MQ_r} \approx F_{1,n-2} \quad (16)$$

onde 1 e  $n - 2$  são os números de graus de liberdade da média quadrática devida à regressão e da média quadrática residual, respectivamente.  $n$  é o número de dados experimentais (observações).

Este modelo genérico possui a seguinte forma:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (17)$$

onde  $y_i$  são os valores observados,  $\beta_0$  e  $\beta_1$  os parâmetros do modelo linear,  $X_i$  a variável independente e  $\varepsilon_i$  o erro aleatório associado à determinação experimental.

As médias quadráticas (MQ's) correspondem à divisão das somas quadráticas ( $SQ_R$ ) pelos seus respectivos números de graus de liberdade, os quais dizem quantos valores independentes de  $n$  observações ( $y_1, y_2, \dots, y_n$ ) são necessários para determinar a soma

quadrática. As médias quadráticas para  $MQ_R$  e  $MQ_r$  podem ser representadas pelas seguintes equações:

$$MQ_R = SQ_R \quad (18)$$

$$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-2} \quad (19)$$

Os graus de liberdade 1 e  $n - 2$  descritos na Equação 16 possuem uma razão de ser. O número de graus de liberdade para uma soma quadrática de  $n$  desvios em relação à média é expresso por  $n - 1$ , uma vez que a soma dos desvios  $\sum(y_i - \bar{y})$  é nula e consome um grau de liberdade. Já o número de graus de liberdade para a soma quadrática devido à regressão é igual a um, pois esta soma depende apenas de uma variável aleatória, o coeficiente angular  $\beta_1$  do modelo. Para a soma quadrática residual cabe  $n - 2$  graus de liberdade, para que a Equação 13 possa ser satisfeita:

$$\nu_T = \nu_R + \nu_r \quad (20)$$

$$(n - 1) = 1 + (n - 2) \quad (21)$$

onde  $\nu_T$  é o número de graus de liberdade da soma quadrática em relação à média,  $\nu_R$  é o número de graus de liberdade da soma quadrática devido à regressão e  $\nu_r$  é o número de graus de liberdade da soma quadrática residual.

Para um caso geral de um modelo com  $p$  parâmetros, o número de graus de liberdade da soma quadrática residual é dado pela diferença do número de observações e o número de parâmetros, isto é,  $\nu_r = (n - p)$ . Para atender à igualdade  $\nu_T = (n - 1)$  é necessário que o número de graus de liberdade da soma quadrática devida à regressão seja  $\nu_R = (p - 1)$ .

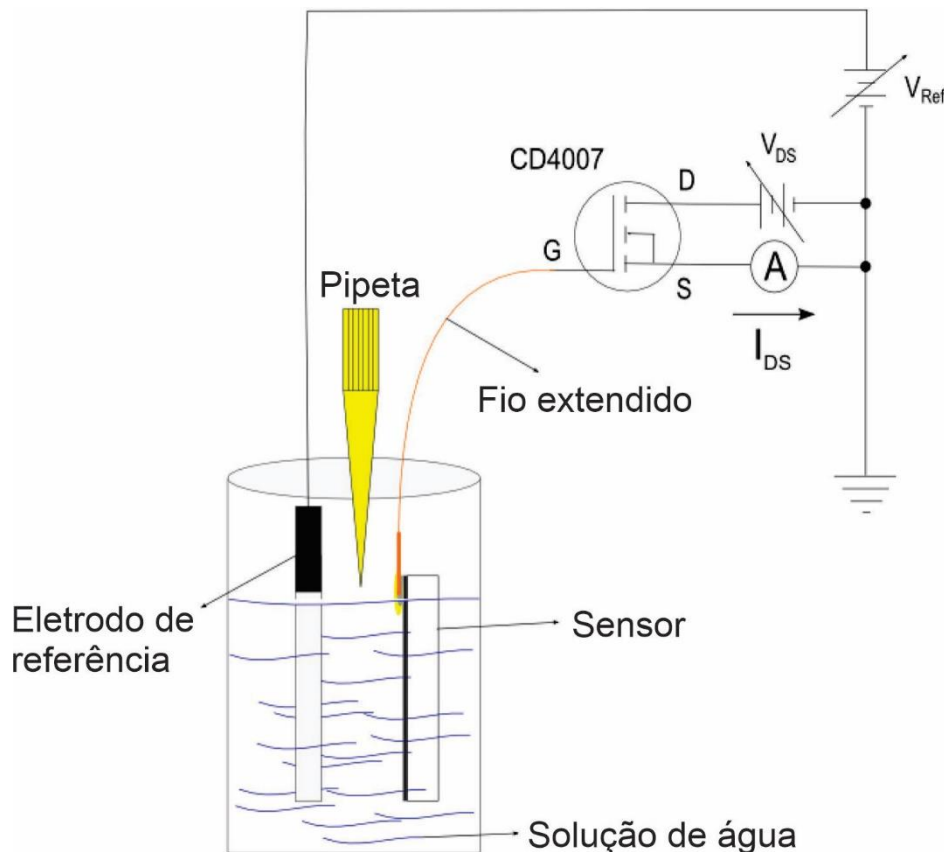
Os valores de  $F_{1,n-2}$  são tabelados considerando o nível de confiança desejado, assim como os graus de liberdade da distribuição  $F$ . Se o valor calculado da razão  $MQ_R/MQ_r$  for maior que o valor de  $F_{1,n-2}$  tabelado, podemos descartar a hipótese de que  $\beta_1 = 0$ , ou seja, existe evidência estatística da relação linear entre as variáveis  $y_i$  e  $X_i$ . No entanto, uma regressão dada significativa pelo teste F pode não ser suficiente para explicar se de fato o modelo segue um padrão linear. Há a possibilidade de a coleta dos valores observados pertencer a uma pequena faixa de fatores estudados, o que leva a respostas camufladas pelo erro experimental. Para contornar este pressuposto é interessante que se realize observações experimentais em uma faixa mais abrangente de fatores estudados, além de observar se os resíduos seguem uma distribuição normal (BARROS NETO et al., 2001).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Biossensor de estudo

A estrutura do biossensor EGFET é composta por dois eletrodos em uma solução eletrolítica e um circuito elétrico exterior a esta solução. Os íons  $H^+$  liberados pela reação entre a glicose e a  $GO_x$  alteram o potencial na superfície do eletrodo (sensor). O potencial elétrico é então transmitido ao canal-N do MOSFET através do fio de cobre (NASCIMENTO; MULATO, 2019). A esquematização deste sistema pode ser visualizada na Figura 6 a seguir:

Figura 6 – Representação do aparato do biossensor EGFET.



Fonte: Adaptado de NASCIMENTO e MULATO (2019).

O sensor é composto por uma fina camada de Óxido de Estanho dopado com Flúor (do inglês *fluorine tin oxide* ou FTO) (*Sigma-Aldrich*). A glicose e a enzima  $GO_x$  (proveniente do fungo *Aspergillus niger*) foram adquiridas respectivamente das empresas *Synth* e *Sigma*. O

MOSFET comercial de canal-N é do modelo CD4007 (*Texas Instruments*) (NASCIMENTO; MULATO, 2019).

A camada de FTO é depositada em placas de vidro de dimensões 26 mm x 10 mm mediante a técnica de pirólise por pulverização. Esta técnica, por sua vez, oferece melhor controle da resistividade das placas de filmes, assim como uma distribuição uniforme dos grãos e produção cristalina e heterogênea destes (NASCIMENTO; MULATO, 2019).

As placas recobertas de FTO (adquiridas da Sigma Aldrich) apresentam resistência de  $10 \Omega/\square$ , sendo as suas superfícies conectadas posteriormente por um fio de cobre ao *gate* do MOSFET. O fio de cobre é colado à superfície da placa de FTO por meio de resina cola epóxi condutora de prata, e o contato do fio com o *gate* do MOSFET é encapsulado por resina epóxi, ocupando a área da amostra de 3 mm x 10 mm (NASCIMENTO; MULATO, 2019)

A solução da enzima  $GO_x$  é preparada através de uma solução de 100 mM de tampão de fosfato com 100 mM de cloreto de potássio (KCl) a um pH de 7. Já a preparação da solução de  $\beta$ -D-glicose ocorre por meio da água deionizada (resistividade  $\geq 1 M\Omega.cm$ ) e 100 mM de KCl.

A enzima  $GO_x$  é imobilizada por quitosana em razão da facilidade de obtenção, menor toxicidade e custo inferior (NASCIMENTO; MULATO, 2019). O processo tem seu início na limpeza das placas de FTO com o auxílio de um cotonete saturado de acetona, a fim de remover qualquer resíduo orgânico que porventura estiver presente. Posteriormente enxagua-se estas placas com 50 mL de água deionizada e 75  $\mu$ L de solução de quitosana para cada 1  $cm^2$  das placas. A preparação da solução de quitosana se dá por meio da dissolução de 50 mg de quitosana para 5 mL de 2% V/V de ácido acético (*Sigma*). Logo após, os biossensores são secados em uma capela de laboratório à temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ C$ ). A solução da enzima contém 4 mg/mL de  $GO_x$  e 50  $\mu$ L de 100 mM KCl e é espalhada uniformemente em toda a área do sensor, sendo este secado posteriormente em uma capela de laboratório à temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ C$ ). Ao finalizar o procedimento, o biossensor é enxaguado com 10 mL de água deionizada e secado, logo após, por um gás inerte (nitrogênio).

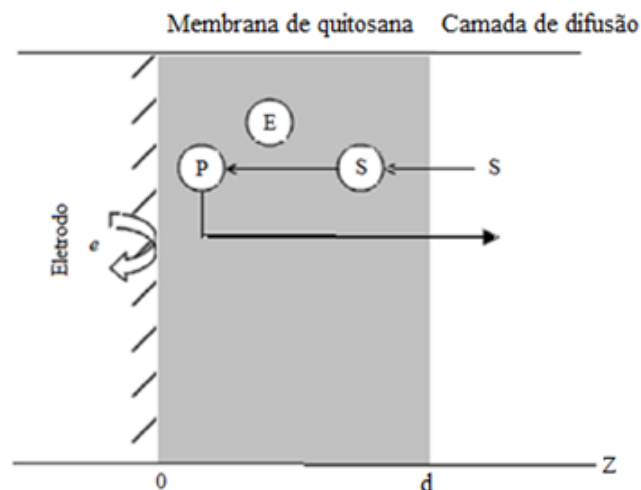
O eletrodo de referência aplica um potencial constante na solução eletrolítica  $V_{Ref}$  e os íons na solução geram um potencial  $V_{ion}$ , que depende da quantidade dos íons e dos seus tipos. Portanto, o potencial aplicado ao *gate* do transistor CD4007 é dado por  $V_{GS} = V_{Ref} + V_{ion}$ , o qual é responsável pela intensidade da corrente gerada entre o dreno e a fonte do transistor ( $I_{DS}$ ). Em outras palavras, a  $I_{DS}$  é determinada pelo potencial elétrico gerado pelos íons em contato com o sensor (NASCIMENTO; MULATO, 2019).

Os dados experimentais de corrente  $I_{DS}$  foram obtidos para diferentes concentrações de glicose (0 a 5,22 mM) em solução eletrolítica (100 mM de KCl) em um pH de 5,6, a fim de analisar o biossensor quanto à sua sensibilidade e eficácia. A aquisição de dados foi feita a partir de um módulo conversor analógico-digital (modelo 34970, HP). O fornecimento de potencial e corrente foi feito a partir de uma fonte de alimentação DC (modelo E3646A, Agilent) de saída dupla. Um software desenvolvido em *LabView* (*National Instruments*) foi empregado para controlar a fonte de alimentação e registrar os dados, sendo estes analisados estaticamente através do *OriginPro 8* (NASCIMENTO; MULATO, 2019). Os dados experimentais usados neste trabalho para o ajuste do modelo matemático proposto, bem como a descrição detalhada da construção e operação do biossensor, foram obtidos do trabalho de Nascimento e Mulato (2019).

### 3.2 Desenvolvimento do modelo matemático do biossensor

O desenvolvimento do modelo matemático do biossensor de glicose foi realizado por meio da aplicação do balanço de massa em um volume de controle definido pela membrana contendo a enzima glicose oxidase. Este sistema é baseado em uma membrana de espessura  $d$ , composta de uma matriz de quitosana, que contém a enzima ( $0 \leq z \leq d$ ) imobilizada, sendo que um de seus lados está em contato com a solução aquosa de substrato  $S$  ( $z \geq d$ ), como pode ser visualizado na Figura 7 a seguir:

Figura 7 – Sistema de referência para a modelagem matemática do biossensor potenciométrico.



Fonte: (MEENA; RAJENDRAN, 2010).

A molécula de substrato  $S$  (glicose) entra na membrana e reage, sob a ação catalisadora da enzima  $E$  (glicose oxidase), para formar os produtos  $P$  (ácido glucônico e peróxido de oxigênio), seguindo a cinética de reação enzimática catalítica de Michaelis-Menten. Como o biossensor EGFET é sensível ao íon  $H^+$ , considera-se que o produto da reação enzimática é representado por esse íon, proveniente da dissociação do ácido glucônico.

Ao aplicar a Equação 6 (Equação Geral da Continuidade Mássica) no sistema descrito anteriormente para as moléculas de substrato  $S$  e produto  $P$ , considerando que este sistema esteja em estado estacionário e que não haja transferência de massa por convecção, chega-se a:

$$D_S \frac{d^2 C_S}{dz^2} = \frac{V_{m\acute{a}x} C_S}{C_S + K_M} \quad (22)$$

$$D_P \frac{d^2 C_P}{dz^2} = \frac{-V_{m\acute{a}x} C_S}{C_S + K_M} \quad (23)$$

onde  $D_S$  [m<sup>2</sup>/s] é o coeficiente de difusividade do substrato (glicose) no meio de quitosana,  $D_P$  [m<sup>2</sup>/s] é o coeficiente de difusividade do produto ( $H^+$ ) no meio de quitosana,  $C_S$  [mol/L] é a concentração de substrato,  $C_P$  [mol/L] é a concentração de produto,  $V_{m\acute{a}x}$  [mol/L·s] é a velocidade máxima de reação e  $K_M$  é a constante de Michaelis-Menten para esta reação e  $z$  é coordenada cartesiana considerada no sistema.

As condições de contorno adotadas para este sistema de equações são: a não transferência de massa por difusão na superfície do eletrodo (sensor) tanto para o substrato quanto para o produto (Equações 24 e 25 nesta ordem), além das concentrações de substrato e produto no limiar entre a membrana e a solução eletrolítica serem as concentrações de substrato e produto presentes nesta solução (Equações 26 e 27 nesta ordem).

$$D_S \left. \frac{dC_S}{dz} \right|_{z=0} = 0 \quad (24)$$

$$D_P \left. \frac{dC_P}{dz} \right|_{z=0} = 0 \quad (25)$$

$$C_S(d) = C_{S,B} \quad (26)$$

$$C_P(d) = C_{P,B} \quad (27)$$

onde  $C_{S,B}$  [mol/L] é a concentração do substrato (glicose) na solução e  $C_{P,B}$  [mol/L] é a concentração de produto (íons  $H^+$ ) na solução.

As Equações 22 e 23 podem ser resolvidas analiticamente em alguns casos específicos (MORF et al., 2011). Um destes casos é quando  $C_S \ll K_M$ , resultando em uma cinética de

primeira ordem da reação catalítica em relação à concentração de glicose, como pode ser observado nas Equações 28 e 29, respectivamente, a seguir:

$$\frac{d^2 C_S}{dz^2} = \frac{1}{D_S} \times \frac{V_{m\acute{a}x} C_S}{K_M} \xrightarrow{k = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_M}} \frac{d^2 C_S}{dz^2} = \frac{k}{D_S} \times C_S \quad (28)$$

$$\frac{d^2 C_P}{dz^2} = -\frac{1}{D_P} \times \frac{V_{m\acute{a}x} C_S}{K_M} \xrightarrow{k = \frac{V_{m\acute{a}x}}{K_M}} \frac{d^2 C_P}{dz^2} = \frac{-k}{D_P} \times C_S \quad (29)$$

### 3.2.1 Perfil de concentração do substrato

A Equação 28 é uma simplificação para descrever o comportamento da concentração de glicose neste sistema, além de ser classificada como uma Equação Diferencial Ordinária (EDO) homogênea, linear e de segunda ordem. A sua solução geral é dada pela Equação 30 (BOYCE; DIPRIMA, 2015):

$$C_S(z) = c_1 e^{\alpha_1 z} + c_2 e^{\alpha_2 z} \quad (30)$$

onde  $C_S$  [mol/L] é a concentração de substrato em função da distância  $z$ ,  $c_1$  e  $c_2$  são constantes e  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  são raízes da Equação Característica.

A Equação Característica da Equação 28 é dada pela Equação 31:

$$1\alpha^2 - \frac{k}{D_S} = 0 \quad (31)$$

onde  $\alpha$  é o termo variante da equação.

Aplicando a Fórmula de Bhaskara (ENCONTRO NACIONAL DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 2013) na Equação 31 encontram-se as seguintes raízes (Equação 32):

$$\alpha = \pm \sqrt{k/D_S} \quad (32)$$

Desta forma, a solução da Equação 28 toma a seguinte forma (Equação 33):

$$C_S(z) = c_1 e^{z(\sqrt{k/D_S})} + c_2 e^{z(-\sqrt{k/D_S})} \quad (33)$$

Para encontrar as constantes  $c_1$  e  $c_2$  aplicam-se as condições de contorno (Equação 24 e 26) na Equação 33, obtendo-se a Equação 34:

$$c_1 = c_2 = \frac{C_{S,B}}{2 \cosh\left(d\sqrt{k/D_S}\right)} \quad (34)$$

Ao substituir as constantes  $c_1$  e  $c_2$  na Equação 33 chega-se na solução desta equação e conseqüentemente no perfil de concentração do substrato, como pode ser visto na Equação 35 a seguir:

$$C_s(z) = C_{S,B} \times \frac{\cosh\left(z\sqrt{k/D_S}\right)}{\cosh\left(d\sqrt{k/D_S}\right)} \quad (35)$$

### 3.2.2 Perfil de concentração do produto

A equação que descreve o comportamento da concentração de produto é dada pela Equação 29, a qual depende da concentração do substrato (Equação 35). Desta forma, o primeiro passo foi substituir a função da Equação 35 na Equação 29, obtendo-se a Equação 36:

$$\frac{d^2 C_P}{dz^2} = \frac{-k}{D_P} \times \frac{\cosh\left(z\sqrt{k/D_S}\right)}{\cosh\left(d\sqrt{k/D_S}\right)} \quad (36)$$

onde  $z$  [m] é uma posição qualquer na espessura da camada de enzima entre 0 e  $d$ , já o parâmetro  $d$  [m] é a espessura da camada de quitosana com a enzima imobilizada.

Para resolver a Equação 36 foi preciso realizar a integração desta equação por duas vezes em razão do termo da derivada de segunda ordem. Ao final da segunda integração, chega-se na Equação 37 a seguir:

$$C_P(z) = \frac{-C_{S,B}D_S}{D_P} \times \frac{\cosh\left(z\sqrt{k/D_S}\right)}{\cosh\left(d\sqrt{k/D_S}\right)} + c_3z + c_4 \quad (37)$$

Para encontrar as constantes  $c_3$  e  $c_4$  aplicam-se as condições de contorno (Equação 25 e 27) na Equação 37, obtendo-se as Equação 38 e 39:

$$c_3 = 0 \quad (38)$$



$$c_4 = C_{P,B} + \frac{C_{S,B}D_S}{D_P} \quad (39)$$

Ao substituir as equações das constantes  $c_3$  e  $c_4$  na Equação 37 é possível obter a solução desta equação, assim como o perfil de concentração do produto no sistema. A solução final recebe a seguinte forma (Equação 40):

$$C_P(z) = \frac{C_{S,B}D_S}{D_P} \times \left[ 1 - \frac{\cosh\left(z\sqrt{k/D_S}\right)}{\cosh\left(d\sqrt{k/D_S}\right)} \right] + C_{P,B} \quad (40)$$

Os dados experimentais foram coletados em função da variação de concentração do substrato na solução ( $C_{S,B}$ ) (NASCIMENTO; MULATO, 2019), que se encontra presente na Equação 40. A concentração de enzima está intimamente ligada ao  $k$ , pois este fator de razão igual a  $\frac{V_{m\acute{a}x}}{K_M}$  expressa que a velocidade máxima ocorre quando toda a enzima está ligada ao substrato, ou seja, quando está saturada. Nesta condição há a maior formação de produto no processo. Em outras palavras e expressão, o  $V_{m\acute{a}x}$  pode ser descrito pela seguinte Equação 41:

$$V_{m\acute{a}x} = k_2 C_E \quad (41)$$

onde  $C_E$  [mol/L] é a concentração total de enzima.

Os perfis de concentração de substrato e produto para um biossensor potenciométrico, deduzidos pelas Equações 35 e 40, podem ser visualizados por meio da Figura 8 abaixo. Ela retrata que o substrato, à medida que penetra no ambiente em que a enzima está presente (membrana enzimática), é consumido e sua concentração atenuada. No plano  $z = 0$ , por sua vez, encontra-se a superfície do eletrodo, onde não há a transferência de massa por difusão. Já a formação de produto é dada em função do consumo do substrato na membrana enzimática e detectada pela superfície do eletrodo ( $z = 0$ ), onde se encontra a maior concentração de íons  $H^+$ .

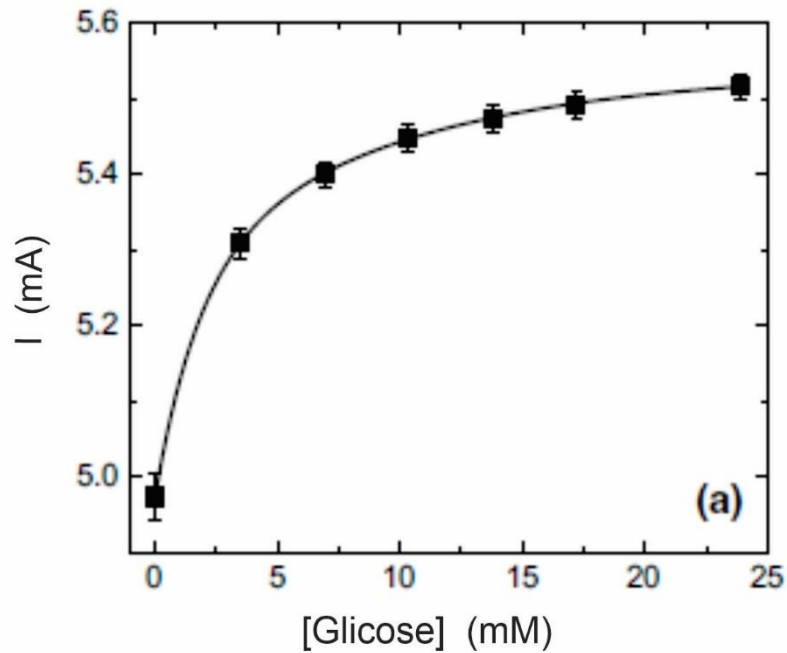
Figura 8 – Representação gráfica operacional do biossensor potenciométrico.



Fonte: Do autor.

O biossensor construído com imobilização enzimática por quitosana (NASCIMENTO; MULATO, 2019) possui um comportamento linear dentro de uma faixa de concentração de glicose de aproximadamente até 5 mM. Após esta faixa de concentração a corrente elétrica tende à estabilização, conforme ilustra a Figura 9.

Figura 9 – Comportamento do biossensor frente a variação de concentração de glicose.



Fonte: Adaptado de NASCIMENTO e MULATO (2019).

Diante deste comportamento, o modelo matemático proposto foi baseado nesta consideração para descrever o comportamento linear da corrente elétrica de saída do biossensor para concentrações de glicose de até 5 mM:

$$I_i = A * \Delta C_{P_i} + B \quad (42)$$

onde  $I_i$  [mA] é o sinal de corrente elétrica de saída do biossensor,  $A$  e  $B$  são os parâmetros empíricos,  $\Delta C_{P_i}$  [mol/L] é a diferença de concentração do íon  $H^+$  nas fronteiras da membrana enzimática e o subíndice  $i$  indica as observações realizadas.

Por meio da Equação 42 tem-se que a corrente elétrica é proporcional a diferença de concentração de  $H^+$  em  $z = 0$  e  $z = d$ , ou seja, nos limites do volume de controle. A equação que define a  $\Delta C_{P_i}$  é então definida por:

$$\Delta C_p = C_p(z = 0) - C_p(z = d) = \frac{C_{S,B} D_S}{D_P} \times \left[ 1 - \frac{1}{\cosh\left(d \sqrt{k/D_S}\right)} \right] \quad (43)$$

### 3.3 Ajuste do modelo e análise matemática do biossensor

O biossensor em análise foi modelado matematicamente aplicando-se conceitos fenomenológicos de transferência de massa e cinética de reações químicas enzimáticas, conforme descrito na seção 4.1, a fim de investigar os fenômenos físicos e químicos que ocorrem no meio. O ajuste do modelo matemático proposto foi realizado através do método dos mínimos quadrados (Equação 44) (BARROS NETO et al., 2001), também conhecido como regressão linear, por meio do *software OriginPro 8*. Além disso, foi realizada a análise da sensibilidade do biossensor, variando, de forma conjunta, os parâmetros construtivos do sistema, como a espessura da camada de enzima imobilizada ( $d$ ), a velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ), a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), a difusividade do substrato ( $D_S$ ), a constante da reação de formação de produto ( $k_2$ ) e a concentração total de enzimas ( $C_E$ ). Para esta análise, foram realizadas simulações numéricas do sistema utilizando o *software Excel*.

$$\min_{\beta_0, \beta_1} \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 = \min_{\beta_0, \beta_1} \sum_i [y_i - (\beta_0 + \beta_1 X_i)]^2 \quad (44)$$

onde  $y_i$  é o valor experimental,  $\hat{y}_i$  é o valor previsto para um determinado experimento,  $X_i$  é a variável independente e  $\beta_0$  e  $\beta_1$  são os parâmetros do modelo linear.

### 3.4 Análises estatísticas

Para avaliar a qualidade do modelo matemático do biossensor, foram considerados parâmetros estatísticos que visem a análise da variância dos resíduos e que expressem a significância estatística de ajuste do modelo frente aos dados experimentais. Para tais análises são aplicados o Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ) e o Teste F, conforme descrito na seção 2.5.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ajuste do modelo matemático do biossensor

O modelo matemático proposto para o biossensor (Equação 42) foi ajustado aos dados experimentais por meio do *software OriginPro 8*. Os valores experimentais considerados para o ajuste foram obtidos por Nascimento e Mulato (2019) e são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Dados experimentais de corrente elétrica de saída do biossensor em função da concentração de glicose.

Concentração de glicose (mM)	Corrente (mA)	Desvio padrão
0	0,00520	$3,10529 \times 10^{-4}$
0,870	0,00503	$3,08802 \times 10^{-4}$
1,74	0,00532	$1,98543 \times 10^{-4}$
2,61	0,00561	$1,84269 \times 10^{-4}$
3,48	0,00560	$1,41539 \times 10^{-4}$
4,35	0,00581	$4,0930 \times 10^{-5}$
5,22	0,00585	$3,1675 \times 10^{-5}$

Fonte: Do autor.

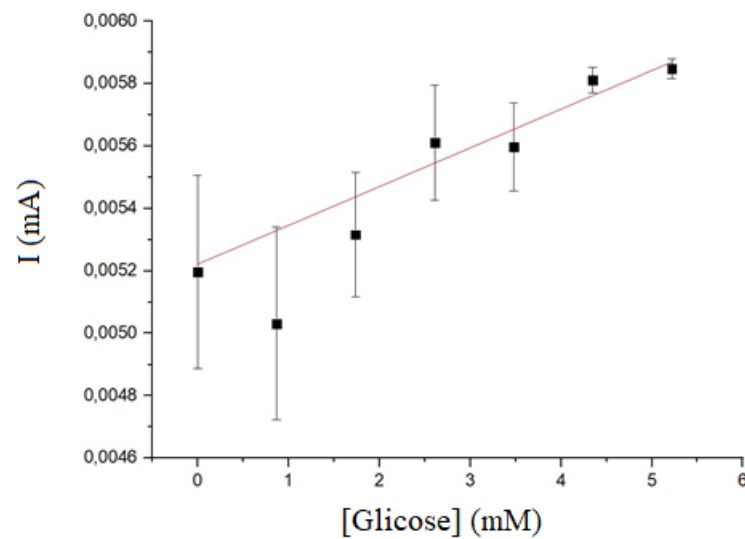
Por meio da regressão linear foi obtido o modelo linear da Equação 45:

$$I = (1,2 \pm 0,3) * C_{S,B} + (0,0052 \pm 0,0001) \quad (45)$$

onde  $I$  [mA] é o valor previsto da corrente e  $C_{S,B}$  [mmol/L] é o valor da concentração de glicose.

O ajuste realizado pode ser observado pela Figura 10 a seguir:

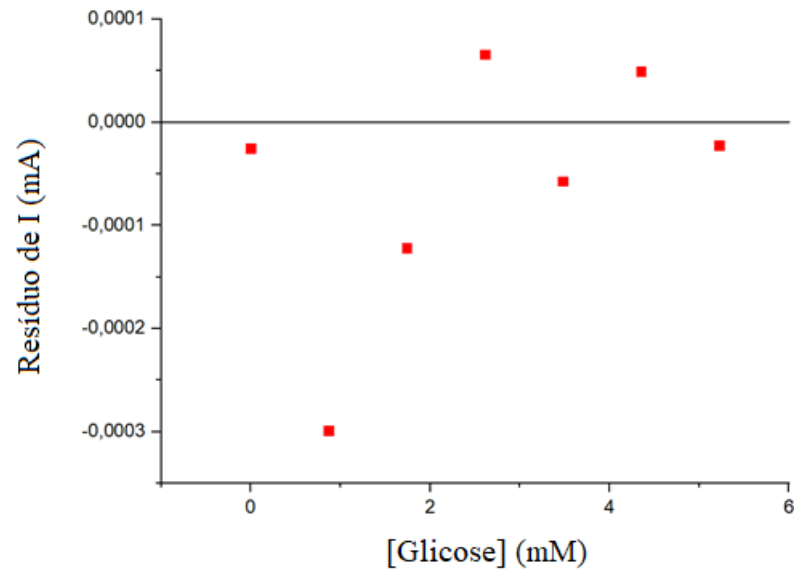
Figura 10 – Gráfico de ajuste do modelo linear para o sinal de corrente do biossensor em função da concentração de glicose.



Fonte: Do autor.

Para avaliar a qualidade do modelo matemático, foi examinado o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e realizado o teste F. Os valores para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e para o  $F$  calculado foram 0,79999 e 24,999, respectivamente. Como o coeficiente de determinação foi relativamente próximo de 1, pode-se dizer que o ajuste foi satisfatório quanto à capacidade do modelo em descrever a variação dos valores da corrente em função da concentração de glicose, mesmo com as imprecisões elevadas nas concentrações inferiores de glicose. Já para analisar a significância estatística do modelo linear proposto, comparou-se o valor de  $F$  calculado com o valor de  $F$  tabelado assumindo o nível de confiança de 95 %, o que resultou em 24,999 diante de 6,61, respectivamente (BARROS NETO et al., 2001). Este resultado nos permite descartar a hipótese nula e, conseqüentemente, afirmar que existe evidência estatística da relação linear entre a corrente elétrica gerada  $I$  e a concentração de glicose  $C_g$ . No entanto, foi necessário avaliar a distribuição dos resíduos para aferir se esta seguia uma distribuição normal ou se havia algum viés. Para os resíduos a observação foi realizada por meio da Figura 11 a seguir:

Figura 11 – Gráfico de resíduos dos dados experimentais obtidos.



Fonte: Do autor.

Por meio do gráfico de resíduos pode-se verificar que os desvios positivos foram tão frequentes quanto os desvios negativos, corroborando com as médias dos resíduos estarem próximas de zero. Além disso, por meio da análise subjetiva da Figura 11 observou-se que a distribuição dos erros seguiu um comportamento aleatório e não tendencioso, proporcionando um resultado confiável de ajuste para o modelo matemático proposto.

Desta forma o modelo matemático desenvolvido (Equação 42) apresentou resultados satisfatórios e com significância estatística. Com isso, substituindo a Equação 43 na Equação 42, temos como resultado a seguinte Equação 46:

$$I = A \frac{D_S}{D_P} \times \left[ 1 - \frac{1}{\cosh\left(d \sqrt{k/D_S}\right)} \right] \times C_{S,B} + B \quad (46)$$

Diante desta equação observou-se que o coeficiente angular do modelo empírico (Equação 42) corresponde aos parâmetros físicos e químicos do biossensor, sendo estes os termos que multiplicam a variável independente  $C_{S,B}$ .

## 4.2 Propostas de melhorias ao biossensor

Com base no modelo matemático desenvolvido é possível propor melhorias para o biossensor ao analisar os parâmetros representados na Equação 46. Mais especificamente, podemos avaliar o impacto de mudanças práticas na construção e operação do dispositivo em seu desempenho.

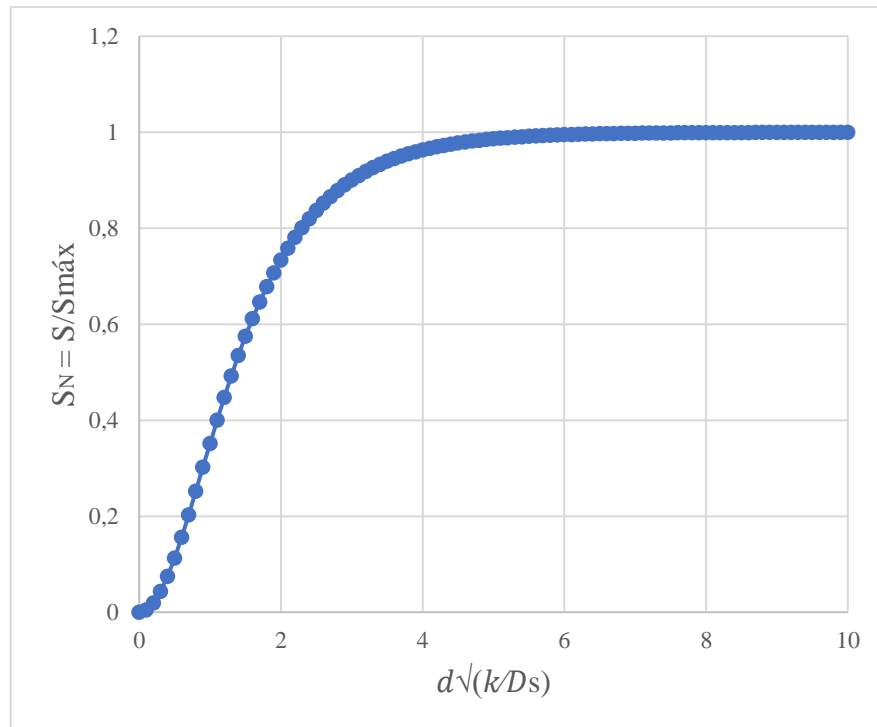
Para um dispositivo médico é interessante que os diagnósticos sejam rápidos e sensíveis a quantidades pequenas de amostras. Para se analisar o biossensor, optou-se por simular a sua sensibilidade normalizada ( $S_N$ ), definida como a razão entre a sensibilidade do dispositivo e a sua sensibilidade máxima (Equação 47). A sensibilidade, propriamente dita, é o ganho do dispositivo, ou seja, a variação do sinal de saída (corrente elétrica) frente a uma variação na variável de entrada (concentração de glicose). Portanto, a sensibilidade é a derivada da corrente elétrica de saída do biossensor em relação à concentração de substrato (glicose). Já a sensibilidade máxima é quando esta derivada tem o seu valor máximo. A função  $S_N$ , então, possui a seguinte forma:

$$S_N = \frac{S}{S_{m\acute{a}x}} = \frac{\frac{\partial I}{\partial C_{S,B}}}{\left. \frac{\partial I}{\partial C_{S,B}} \right|_{m\acute{a}x}} = \frac{\frac{C_{S,B} D_S}{D_P} \times \left[ 1 - \frac{1}{\cosh\left(d \sqrt{k/D_S}\right)} \right]}{\frac{C_{S,B} D_S}{D_P}} = 1 - \frac{1}{\cosh\left(d \sqrt{k/D_S}\right)} \quad (47)$$

onde  $S$  é a sensibilidade do biossensor e  $S_{m\acute{a}x}$  é a sensibilidade máxima do biossensor.

Por meio da Equação 47 nota-se que  $S_N$  é dependente dos parâmetros construtivos do biossensor e da cinética enzimática, sendo estes a espessura da camada de enzima imobilizada ( $d$ ), a constante  $k$  - razão da velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ) - e o coeficiente de difusividade do substrato ( $D_S$ ). A velocidade máxima, por sua vez, depende da constante de velocidade de formação de produto ( $k_2$ ) e da concentração total de enzimas ( $C_E$ ). Ao simular esta função no *software* Excel tem-se o seguinte comportamento:

Figura 12 – Gráfico da sensibilidade normalizada em função dos parâmetros do biossensor.



Fonte: Do autor.

Por meio da Figura 12, pode-se observar o comportamento da sensibilidade normalizada de 0 até o seu valor máximo de 1, variando o parâmetro global do biossensor ( $d\sqrt{k/D_S}$ ) de 0 a 10. Verifica-se que a sensibilidade do biossensor atinge ~ 95% do valor máximo quando  $d\sqrt{k/D_S} = 4$ , de modo que valores superiores para esse parâmetro global não impactam no desempenho do biossensor.

Com relação às contribuições individuais dos parâmetros construtivos do biossensor sobre a sensibilidade do mesmo, podemos analisar primeiramente o efeito da velocidade máxima de reação  $V_{máx}$ , a qual é o produto da constante da reação de formação de produto ( $k_2$ ) e com a concentração total de enzimas ( $C_E$ ) (Equação 41). A manipulação da temperatura tem efeito sobre  $k_2$ , segundo a Lei de Arrhenius (Equação 48). Pela equação de Arrhenius,  $k_2$  depende da temperatura, enquanto que o fator pré-exponencial ( $A$ ) e a energia de ativação ( $E_a$ ) são independentes da mesma (SMITH, 2008). Com o aumento da temperatura, a parte exponencial da equação aumenta e, conseqüentemente, o valor de  $k_2$  e a taxa de reação (KRISTIN; JOHNSON; KROA, 2002; ODEBUNMI; OWALUDE, 2007), elevando a sensibilidade do biossensor. No entanto, é importante considerar que a enzima pode se desnaturar a temperaturas elevadas. Por outro lado, pode-se também aumentar  $V_{máx}$  elevando a concentração de enzimas. Fazendo isso, haverá uma maior disponibilidade de sítios ativos,



levando a uma maior taxa de reação e, conseqüentemente, a um maior gradiente de íons  $H^+$ . Este gradiente reflete na Equação 43 de forma a ampliar o valor de  $\Delta C_p$  que, por conseguinte, aumentará o sinal de corrente gerado pelo biossensor, aumentando a sua sensibilidade.

$$k_2(T) = A \exp(-E_a/RT) \quad (48)$$

onde  $k_2$  [1/s] é a constante de velocidade,  $A$  é o fator pré-exponencial,  $E_a$  [mol·m<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>] é a energia de ativação,  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$  [K] a temperatura absoluta.

Mudanças no pH também podem interferir na forma geométrica do sítio ativo e por conseguinte da molécula enzimática, uma vez que os aminoácidos atraídos podem não o serem mais. Além disso, como a enzima  $GO_x$  possui um índice extremamente alto de seletividade para a glicose, uma pequena alteração da sua geometria pode acarretar numa diminuição significativa da taxa de reação. Portanto, em condições extremas de pH a enzima perde a sua forma geométrica original e então se desnatura (PICKERING, 2000), reduzindo a sensibilidade do biossensor. Vale ressaltar que o biossensor foi operado em uma solução tamponada objetivando a constância do valor de pH no meio, para que a atividade enzimática fosse preservada.

Ao analisar a espessura da camada de enzima imobilizada ( $d$ ), verifica-se que a sua redução facilita a transferência de massa, reduzindo o gradiente  $\Delta C_p$ . Kirthiga e Rajendran (2015) constataram que ao aumentar a espessura da camada enzimática o sinal de corrente cresce lentamente até atingir o seu pico e logo depois diminuía para todos os outros valores de parâmetros construtivos. Baronas, Ivanauskas e Kulys (2003a) também verificaram que a espessura da membrana enzimática é um fator limitante na sensibilidade do biossensor.

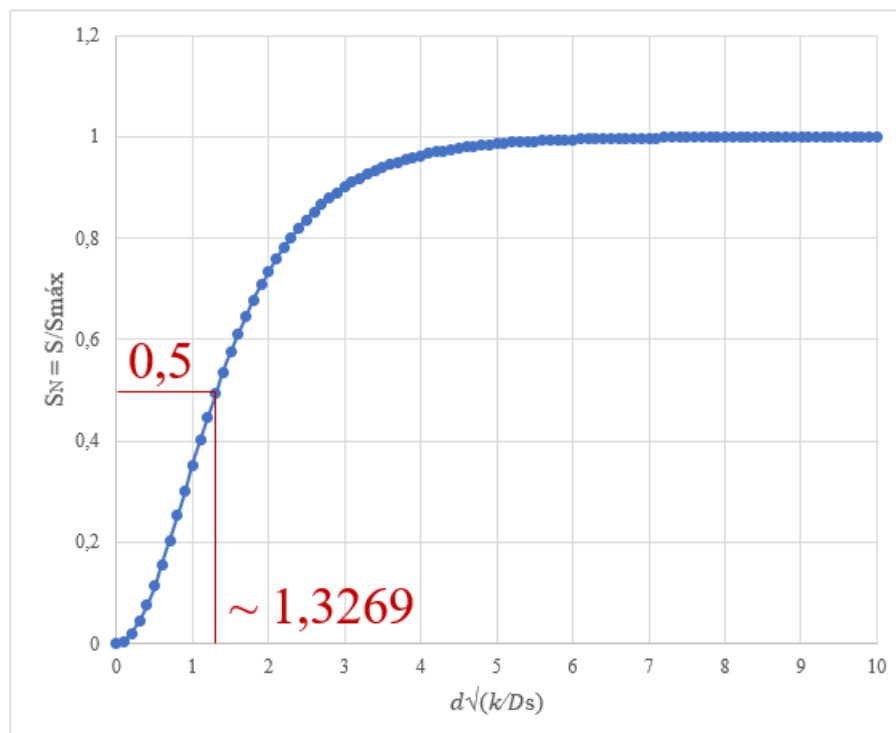
Dentre os parâmetros construtivos do biossensor representados na Equação 47, a concentração de enzimas ( $C_E$ ) foi o fator escolhido para ser analisado em mais detalhes neste trabalho, uma vez que  $C_E$  é facilmente alterada modificando a quantidade de enzimas imobilizadas durante a construção do biossensor (vide seção 3.1). Para essa análise, assumiu-se uma concentração de enzima  $C_{E0}$  hipotética tal que a sensibilidade do biossensor seja metade do seu valor máximo. Reescrevendo a Equação 47 para a Equação 49, pode-se então prever a sensibilidade normalizada  $S_N$  do biossensor em função da concentração de enzima  $C_E$ . A Equação 49 foi calculada para diferentes condições de  $C_E$  utilizando o *software* Excel.

$$S_N = \frac{S}{S_{máx}} = 1 - \frac{1}{\cosh\left(d \sqrt{\frac{k_2 C_{E0} \left(\frac{C_E}{C_{E0}}\right)}{K_M D_S}}\right)} \quad (49)$$

onde  $C_E$  é a concentração de enzimas que pode ser alterada na construção do biossensor e  $C_{E0}$  é a concentração de enzimas hipotética tal que a relação  $S/S_{m\acute{a}x}$  é igual a 0,5.

Ao considerar  $S/S_{m\acute{a}x}$  igual a 0,5 na Equação 47, tem-se que o parâmetro global  $d\sqrt{(k_2 C_{E0})/(K_M D_S)}$  equivale a aproximadamente 1,3269. Esta condição hipotética com  $S/S_{m\acute{a}x} = 0,5$  foi definida de maneira que o gráfico referente à Equação 49 percorresse os valores abaixo de 0,5, até o valor mínimo de 0, e os valores acima, de 0,5 até o valor máximo de 1, conforme ilustra a Figura 13 a seguir.

Figura 13 – Gráfico da sensibilidade normalizada em função dos parâmetros do biossensor destacando a condição hipotética da sensibilidade normalizada.



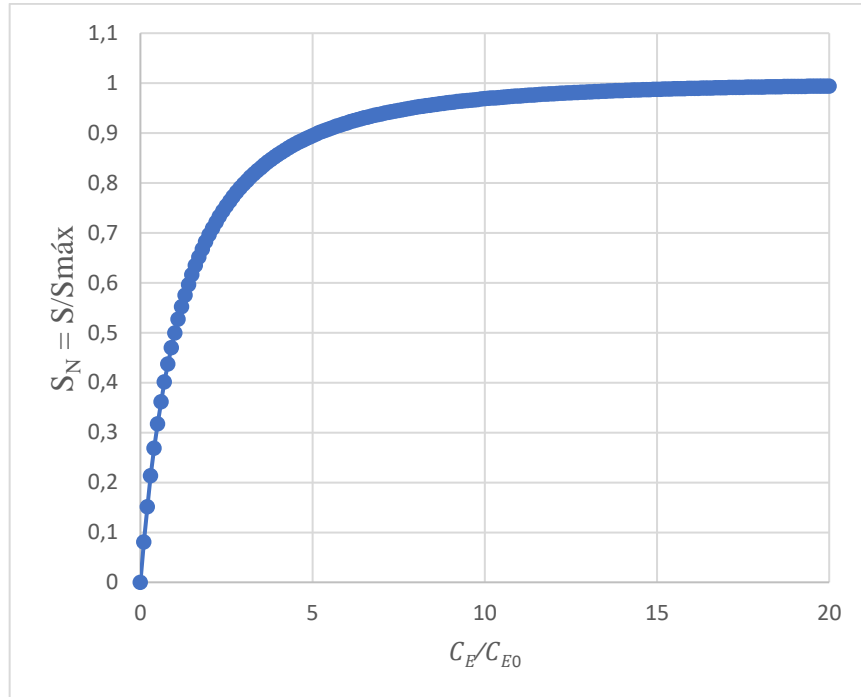
Fonte: Do autor.

Esta hipótese foi levantada a fim de analisar o comportamento do biossensor frente às diferentes concentrações de enzima. A relação entre a sensibilidade normalizada e as concentrações de enzimas pode ser visualizada ao substituir o valor de 1,3269 na Equação 49, obtendo a seguinte equação:

$$S_N = \frac{S}{S_{m\acute{a}x}} = 1 - \frac{1}{\cosh\left(1,3269\sqrt{\frac{C_E}{C_{E0}}}\right)} \quad (50)$$

O comportamento do gráfico relativo à Equação 50 é apresentado na Figura 14 a seguir:

Figura 14 – Gráfico da sensibilidade normalizada do biossensor em função da concentração total de enzima.



Fonte: Do autor.

Por meio do gráfico acima, verifica-se que para  $S_N = 0,99$  (ou seja 99 % da sensibilidade máxima) a razão  $C_E/C_{E0}$  corresponde a 4,0232. Desta forma, pode-se dizer que, aumentando a concentração de enzima  $C_E$  em aproximadamente 4 vezes, o biossensor atinge 99% da sua sensibilidade máxima. É interessante ainda observar na Figura 14 que a sensibilidade normalizada do biossensor  $S_N$  é drasticamente reduzida com valores de  $C_E/C_{E0}$  próximos a zero. Por outro lado,  $S_N$  se aproxima assintoticamente de 1 para  $C_E/C_{E0}$  elevado. Portanto, verifica-se que há um limite superior para a concentração de enzimas imobilizadas na membrana do biossensor, uma vez que valores superiores de  $C_E$  não tem efeito sobre o desempenho do dispositivo, ou seja, não há a necessidade de imobilizar quantidades excessivas da enzima na superfície do biossensor.

## 5 CONCLUSÃO

A modelagem matemática realizada com base nos fenômenos físicos e químicos relativos ao biossensor potenciométrico revelaram que existe uma relação linear entre as concentrações de substrato (glicose) em solução e de produto (íons  $H^+$ ) na superfície do detector, gerando um sinal elétrico correspondente pelo biossensor. Essa modelagem matemática foi possível assumindo que a concentração de substrato ( $C_S$ ) era muito menor que a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ).

Por meio do delineamento matemático do gradiente de concentração de produtos dos íons  $H^+$  ( $\Delta C_P$ ) observou-se que a sensibilidade do biossensor em relação à sua sensibilidade máxima depende diretamente dos parâmetros construtivos e cinéticos enzimáticos. Dentre estes parâmetros, a concentração de enzima  $C_E$  imobilizada se apresentou como uma opção promissora para alterar a sensibilidade do biossensor, uma vez que ela é de fácil manipulação durante a construção do dispositivo. No entanto, verificou-se que há limite superior teórico para sensibilidade do biossensor ( $S_{m\acute{a}x}$ ), para o qual a sensibilidade tende assintoticamente com o aumento de  $C_E$ . Além disso, verificou-se pelas simulações que a sensibilidade do biossensor é altamente dependente de  $C_E$  em pequenas quantidades de enzima imobilizada.

Na literatura há poucos trabalhos referentes aos estudos de modelagem e simulação que visem a compreensão fenomenológica dos biossensores com enzima imobilizada. Este trabalho, portanto, contribui para uma melhor compreensão do funcionamento do dispositivo, de maneira a esclarecer os parâmetros determinantes e manipuláveis do mesmo, auxiliando na proposição de alterações que possam aprimorar a construção e operação do biossensor.

No desenvolvimento do trabalho foram identificadas algumas limitações, tais como: não conhecimento dos valores da difusividade de substrato ( $D_S$ ), difusividade do produto ( $D_P$ ) no sistema, da espessura da camada enzimática ( $d$ ) e as constantes de velocidades de reações ( $k_1$ ,  $k_{-1}$  e  $k_2$ ). O conhecimento do valor desses parâmetros possibilitaria um estudo mais detalhado do biossensor. Portanto, para estudos complementares, seria interessante realizar experimentos que pudessem determinar tais variáveis.

Apesar das limitações encontradas, o trabalho atendeu aos objetivos propostos em analisar alternativas práticas de melhorias construtivas do biossensor, que viabilizem maior sensibilidade ao mesmo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, S. **Product Information**. Missouri: Sigma - Aldrich Co. Llc., 2018.
- BARONAS, R.; IVANAUSKAS, F.; KULYS, J. Computer Simulation of the Response of Amperometric Biosensors in Stirred and non Stirred Solution. **Nonlinear Analysis: Modelling and Control**, Vilnius, v. 8, n. 1, p. 3–18, 2003. b. Disponível em: < <https://www.journals.vu.lt/nonlinear-analysis/article/view/15174> >. Acesso em: 16 mai 2020.
- BARONAS, R.; IVANAUSKAS, F.; KULYS, J. The influence of the enzyme membrane thickness on the response of amperometric biosensors. **Sensors**, Vilnius, v. 3, n. 7, p. 248–262, 2003. a. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1424-8220/3/7/248> >. Acesso em: 16 mai 2020.
- BARROS NETO, B. de et al. **Como fazer experimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2001. 412 p.
- BARTLETT, P. N.; PRATT, K. F. E. Modelling of processes in enzyme electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, Batch, v. 8, n. 9–10, p. 451–462, 1993. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/095656639380030S> >. Acesso em: 16 mai 2020.
- BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, London, v. 60, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: < <https://portlandpress.com/essaysbiochem/article/60/1/1/78203/Introduction-to-biosensors> >. Acesso em: 16 mai 2020.
- BOYCE, W. E.; DIPRIMA, R. C. **Equações diferenciais elementares e problemas de valores de contorno**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015, 663 p.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey Beatriz. In: GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2013. Cap. 2. p. 15-31. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-550-7>. Acesso em: 16 maio 2020.
- BRITZ, D. et al. Further Comparisons of Finite Difference Schemes for Computational Modelling of Biosensors. **Nonlinear Analysis: Modelling and Control**, Vilnius, v. 14, n. 4, p. 419–433, 2009. Disponível em: < <http://www.journals.vu.lt/nonlinear-analysis/article/view/14467> >. Acesso em: 16 mai 2020.

BURKE, M. A. Maini's many contributions to mathematical enzyme kinetics: A review. **Journal of Theoretical Biology**, Kennesaw, v. 481, p. 24–27, 2019. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519318305939> >. Acesso em: 16 mai 2020.

CACICEDO, M. L. et al. Immobilized Enzymes and Their Applications. In: SINGH, Ram Sarup et al. **Advances in Enzyme Technology**. Hyderabad: Elsevier, 2019. Cap. 7. p. 169-200. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444641144000078?via%3Dihub>. Acesso em: 16 maio 2020.

CARIDIS, K. A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; MACRIS, B. J. Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternata*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Athens, v. 34, n. 6, p. 794–797, 1991. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1007/BF00169352> >. Acesso em: 16 mai 2020.

COSIO, M. S.; SCAMPICCHIO, M.; BENEDETTI, S. Electronic Noses and Tongues. In: **Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications**. Totowa: Elsevier, 2012. p. 219–247. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012384862800008X>. Acesso em: 16 mai 2020.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de transferência de massa**. 3. ed. São Paulo: Luche, 2015. 460 p.

DHATT, S.; BHATTACHARYYA, K. Single-substrate enzyme kinetics: the quasi-steady-state approximation and beyond. **Journal of Mathematical Chemistry**, New York, v. 51, n. 5, p. 1467–1477, 2013. Disponível em: < <http://link.springer.com/10.1007/s10910-013-0160-9> >. Acesso em: 16 mai 2020.

ENCONTRO NACIONAL DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 2013, Curitiba. **História da equação do segundo grau em livros didáticos**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Educação Matemática, 2013.

FARRÉ, M. et al. Sensors and biosensors in support of EU Directives. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Barcelona, v. 28, n. 2, p. 170–185, 2009. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599360800263X> >. Acesso em: 16 mai 2020.

FERNANDES, R. et al. Electrochemically Induced Deposition of a Polysaccharide Hydrogel onto a Patterned Surface. **Langmuir**, Mayland, v. 19, n. 10, p. 4058–4062, 2003. Disponível:

< <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la027052h> >. Acesso em: 16 mai 2020.

FERRI, S.; KOJIMA, K.; SODE, K. Review of glucose oxidases and glucose dehydrogenases: A bird's eye view of glucose sensing enzymes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, Thousand Oaks, v. 5, n. 5, p. 1068–1076, 2011. a. DOI: 10.1177/193229681100500507.

GOEKE, A.; WALCHER, S.; ZERZ, E. Classical quasi-steady state reduction—A mathematical characterization. **Physica D: Nonlinear Phenomena**, Aachen, v. 345, p. 11–26, 2017. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167278916300677> >. Acesso em: 16 mai 2020.

GUAN, W. et al. Quantitative probing of surface charges at dielectric-electrolyte interfaces. **Lab on a Chip**, New Haven, v. 13, n. 7, p. 1431–1436, 2013. Acesso em: < <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3lc41351a> >. Acesso em: 16 mai 2020.

GUIDELLI, E. J.; GUERRA, E. M.; MULATO, M. V2O5/WO3 mixed oxide films as pH-EGFET sensor: Sequential re-usage and fabrication volume analysis. **ECS Journal of Solid State Science and Technology**, Pennington, v. 1, n. 3, p. 39–44, 2012. Acesso em: < <https://iopscience.iop.org/article/10.1149/2.007203jss> >. Acesso em: 16 mai 2020.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, Araraquara, v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822006000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=en) >. Acesso em: 16 mai 2020.

HERMANSON, G. T. et al. Enzyme Modification and Conjugation. In: HERMANSON, G. T. et al. **Bioconjugate Techniques**. Rockford: Academic Press, 2013. Cap. 22. p. 951-957. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822390000224?via%3Dihub>. Acesso em: 16 maio 2020.

HIDESHIMA, S. et al. Fabrication of stable antibody-modified field effect transistors using electrical activation of Schiff base cross-linkages for tumor marker detection. **Biosensors and Bioelectronics**, Tokyo, v. 26, n. 5, p. 2419–2425, 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566310007086>. Acesso em: 16 mai 2020.

HIMMELBLAU, D. M.; BISCHOFF, K. B. Mass Transfer. **Industrial & Engineering Chemistry**, Washington, v. 58, n. 12, p. 32–41, 1966. Disponível em: <

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie50684a007> >. Acesso em: 16 mai 2020.

HU, S.; LU, Q.; XU, Y. Biosensors based on direct electron transfer of protein. In: ZHANG, X., Huangxian J., Joseph W. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**. Cambridge: Academic Press, 2008. Cap. 17. p. 531-581. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/279428933\\_Biosensors\\_based\\_on\\_direct\\_electron\\_transfer\\_of\\_protein](https://www.researchgate.net/publication/279428933_Biosensors_based_on_direct_electron_transfer_of_protein) >. Acesso em: 16 maio 2020.

INCROPERA, F. P. et al. **Fundamentos de transferência de calor e de massa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008, 643 p.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. Brussels, 2017. 150 p.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). **IDF Diabetes Atlas**. Brussels, 2019. 176 p

ISMAIL, I. et al. Mathematical Modelling of an Enzyme-Based Biosensor. **International Journal of Biosensors & Bioelectronics**, Budapest, v. 3, n. 2, 2017. DOI: 10.15406/ijbsbe.2017.03.00062. Disponível em: <http://medcraveonline.com/IJBSBE/IJBSBE-03-00062.php>.

JITHINRAJ, P. K.; ROY, U.; GOPALAKRISHNAN, M. Zero-order ultrasensitivity: A study of criticality and fluctuations under the total quasi-steady state approximation in the linear noise regime. **Journal of Theoretical Biology**, Tamil Nadu, v. 344, p. 1–11, 2014. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022519313005419> >. Acesso em: 16 mai 2020.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Critical overview on the application of sensors and biosensors for clinical analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Aveiro, v. 85, p. 36–60, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993616300085?via%3Dihub> >. Acesso em: 16 mai 2020.

JUSTINO, C. I. L.; ROCHA-SANTOS, T. A.; DUARTE, A. C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Aveiro, v. 29, n. 10, p. 1172–1183, 2010. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993610002141?via%3Dihub> >. Acesso em: 16 mai 2020.



KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. **Trends in Biotechnology**, Rehovot, v. 11, n. 11, p. 471–478, 1993. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016777999390080S> >. Acesso em: 16 mai 2020.

KIM, D. S. et al. An extended gate FET-based biosensor integrated with a Si microfluidic channel for detection of protein complexes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, Daegu, v. 117, n. 2, p. 488–494, 2006. Acesso em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400506000189> >. Acesso em: 16 mai 2020.

KIM, T. H. et al. **Computer applications for security, control and system engineering**. 5. ed. Jeju Island: Springer, 2012, 400 p.

KIRTHIGA, O. M.; RAJENDRAN, L. Approximate analytical solution for non-linear reaction diffusion equations in a mono-enzymatic biosensor involving Michaelis-Menten kinetics. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Tamil Nadu, v. 751, p. 119–127, 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572665715002738?via%3Dihub> >. Acesso em: 16 mai 2020.

KLEPPE, K. The Effect of Hydrogen Peroxide on Glucose Oxidase from *Aspergillus niger*. **Biochemistry**, New York, v. 5, n. 1, p. 139–143, 1966. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00865a018> >. Acesso em: 16 mai 2020.

KRISTIN A.; JOHNSON, B. A.; KROA, T. Y. Factors affecting reaction kinetics of glucose oxidase. **Journal of Chemical Education**, Madison, v. 79, n. 1, p. 74, 2002. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ed079p74> >. Acesso em: 16 mai 2020.

LAILER, K. J. Theory of the transient phase in kinetics, with special reference to enzyme systems. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 33, n. 10, p. 1614–1624, 1955. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/237847581\\_Theory\\_of\\_the\\_transient\\_phase\\_in\\_kinetics\\_with\\_special\\_reference\\_to\\_enzyme\\_systems](https://www.researchgate.net/publication/237847581_Theory_of_the_transient_phase_in_kinetics_with_special_reference_to_enzyme_systems) >. Acesso em: 16 mai 2020. Acesso em: 16 mai 2020.

LIN, Y. H. et al. Integrating solid-state sensor and microfluidic devices for glucose, urea and creatinine detection based on enzyme-carrying alginate microbeads. **Biosensors and Bioelectronics**, Taoyuan, v. 43, p. 328–335, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566312009098>. Acesso em: 16 mai 2020.

LIU, Y. et al. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. **Biosensors and Bioelectronics**, Changchun, v. 21, n. 6, p. 984–988, 2005. Disponível em: < [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566305000813?via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566305000813?via%3Dihub) >. Acesso em: 16 mai 2020.

LUO, X. L. et al. A glucose biosensor based on chitosan–glucose oxidase–gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. **Analytical Biochemistry**, Nanjing, v. 334, n. 2, p. 284–289, 2004. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269704005998> >. Acesso em: 16 mai 2020.

MEENA, A.; RAJENDRAN, L. Mathematical modeling of amperometric and potentiometric biosensors and system of non-linear equations - Homotopy perturbation approach. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Tamilnadu, v. 644, n. 1, p. 50–59, 2010. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572665710001451> >. Acesso em: 16 mai 2020.

MIRÓN, J. et al. Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, Galicia, v. 31, n. 5, p. 615–620, 2002. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022902001436> >. Acesso em: 16 mai 2020.

MORF, W. E. et al. Theoretical treatment and numerical simulation of potentiometric and amperometric enzyme electrodes and of enzyme reactors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Zürich, v. 657, n. 1–2, p. 1–12, 2011. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157266571100083X> >. Acesso em: 16 mai 2020.

NASCIMENTO, R. A. S. **Quantificação de glicose intra e extra-celular por meio de biossensores micro e nanoestruturados**. 2015. 95 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

NASCIMENTO, R. A. S.; MULATO, M. Microelectronic sensor for continuous glucose monitoring. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, Germany, v. 125, n. 3, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00339-019-2455-6>>. Acesso em: 16 mai 2020.

ODEBUNMI, E. O.; OWALUDE, S. O. Kinetic and thermodynamic studies of glucose oxidase catalysed oxidation reaction of glucose. **J. Appl. Sci. Environ. Manage. December**, Ilorin, v. 11, n. 4, p. 95–100, 2007. Disponível em: <

[https://www.researchgate.net/publication/27796843\\_Kinetic\\_And\\_Thermodynamic\\_Studies\\_Of\\_Glucose\\_Oxidase\\_Catalysed\\_Oxidation\\_Reaction\\_of\\_Glucose](https://www.researchgate.net/publication/27796843_Kinetic_And_Thermodynamic_Studies_Of_Glucose_Oxidase_Catalysed_Oxidation_Reaction_of_Glucose) >. Acesso em: 16 mai 2020.

PALMER, T.; BONNER, P. **Enzymes: Biochemistry, biotechnology, clinical chemistry**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2007. 416 p.

PAN, T. M. et al. Development of high- $\kappa$  HoTiO<sub>3</sub> sensing membrane for pH detection and glucose biosensing. *In: Sensors and Actuators B: Chemical*. Taiwan, v. 144, n. 1, p. 139–145, 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400509008272>. Acesso em: 16 mai 2020.

PARIZI, K. B. et al. ISFET pH Sensitivity: Counter-Ions Play a Key Role. **Scientific Reports**, Starford, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2017. Disponível em: < <http://www.nature.com/articles/srep41305> >. Acesso em: 16 mai 2020.

PICKERING, W. R. **Complete Biology**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000, 337 p.

PIJANOWSKA, D. G.; TORBICZ, W. pH-ISFET based urea biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, Warsaw, v. 44, n. 1–3, p. 370–376, 1997. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400597001949>. Acesso em: 16 mai 2020.

PROTEIN DATA BANK. **Glucose Oxidase vinda de *Apergillus Niger***. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/3d-view/1CF3/1>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

PULLANO, S. A. et al. EGFET-based sensors for bioanalytical applications: A review. **Sensors**, Zürichf, v. 18, n. 11, 2018. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1424-8220/18/11/4042> >. Acesso em: 16 mai 2020.

REUILLARD, B.; GOFF, A. L.; COSNIER, S. Non-covalent double functionalization of carbon nanotubes with a NADH oxidation Ru(II)-based molecular catalyst and a NAD-dependent glucose dehydrogenase. **Chemical Communications**, Grenoble, v. 50, n. 79, p. 11731–11734, 2014. Disponível em: < <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/CC/C4CC04758C#!divAbstract> >. Acesso: 16 mai 2020.

ROMERO, L. E.; CANTERO, D. Study of the deactivation process of the glucose oxidase-catalase enzymatic system by means of simulation. **Progress in Biotechnology**, Cadiz, v. 15, n. C, p. 107-112 1998 Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092104239880018X?via%3Dihub> >.

Acesso em: 16 mai 2020.

SAWANT, S. N. Development of Biosensors from Biopolymer Composites. In: SADASIVUNI, K.; KIM, J.; ALMAADEED, M.; PONNAMMA, D.; CABIBIHAN, J. **Biopolymer Composites in Electronics**. Maharashtra: Elsevier, 2017. Cap. 13. p. 353-383.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128092613000139?via%3Dihub>.

Acesso em: 16 mai 2020.

SCHÖNING, M. J.; POGHOSSIAN, A. Bio FEDs (Field-Effect Devices): State-of-the-Art and New Directions. **Electroanalysis**, Jülich, v. 18, n. 19–20, p. 1893–1900, 2006. Disponível em: < <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.200603609> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SELVANAYAGAM, Z. et al. An ISFET-based immunosensor for the detection of  $\beta$ -Bungarotoxin. **Biosensors and Bioelectronics**, Singapore, v. 17, n. 9, p. 821–826, 2002.

Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566302000751> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SHULER, M. L.; KARGI F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. Upper Saddle River: Prentice Hall PTR, 2002. v. 22

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R. dos; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006. Disponível em: < [https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422006000400026&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422006000400026&script=sci_abstract&tlng=pt) >. Acesso em: 17 jun 2020.

SILVA, R. O.; FREITAS FILHO, J. R.; FREITAS, J. C. R. D-glucose, a fascinating biomolecule: History, properties, production and application. **Revista Virtual de Química**, Nitetói, v. 10, n. 4, p. 875–891, 2018. Disponível em: < [http://rvq.sbq.org.br/audiencia\\_pdf.asp?aid2=953&nomeArquivo=v10n4a11.pdf](http://rvq.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=953&nomeArquivo=v10n4a11.pdf) >. Acesso em: 16 mai 2020.

SINGH, R.; SINGH, A.; SHWETA, S. Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? In: KUDDUS, M. **Enzymes in Food Biotechnology**. Lucknow: Academic Press, 2019. Cap. 48. p. 827-843. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128132807000487?via%3Dihub>.

Acesso em: 16 maio 2020.

SLEWA, L. H.; ABBAS, T. A.; AHMED, N. M. Synthesis of quantum dot porous silicon as extended gate field effect transistor (EGFET) for a pH sensor application. **Materials Science in Semiconductor Processing**, Erbil, v. 100, n. February, p. 167–174, 2019. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369800119302823> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SMITH, I. W. M. The temperature-dependence of elementary reaction rates: Beyond Arrhenius. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 37, n. 4, p. 812–826, 2008. Disponível em: < <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/CS/B704257B#!divAbstract> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SOUSA, D. R. T. de. **Produção de Glicose Oxidase (E.C. 1.1.3.4) por fungos isolados da Floresta Amazônica**. 2017. 133 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.

STAIANO, M. et al. Enzymes as Sensors. *In: Methods in Enzymology*. Avellino, v. 589, n. 1, p. 115–131, 2017. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687917300411> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SUMAIYA, S.; TRIVEDI, R. A Review on Glucose Oxidase. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, Athwalines, v. 4, n. 8, p. 636–642, 2015. Disponível em: < <https://www.ijcmas.com/vol-4-8/Shaiikh%20Sumaiya%20A%20and%20Ratna%20Trivedi.pdf> >. Acesso em: 16 mai 2020.

SUSANTO, H. et al. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. **Enzyme and Microbial Technology**, Semarang, v. 52, n. 6–7, p. 386–392, 2013. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022913000276> >. Acesso em: 16 mai 2020.

TRAN, D. N.; BALKUS, K. J. Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. **ACS Catalysis**, Texas, v. 1, n. 8, p. 956–968, 2011. Disponível em: < <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cs200124a> >. Acesso em: 16 mai 2020.

VADGAMA, P. Biomedical Sensors: Materials. **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, Dublin, n. 2, p. 592–595, 2001. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0080431526001133?via%3Dihub> >. Acesso em: 16 mai 2020.

VENUGOPAL, R.; SAVIUE, B. A. The effect of oxygen upon the kinetics of glucose oxidase inactivation. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, Toronto, v. 71, n. 6, p. 917–

924, 1993. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cjce.5450710613> >. Acesso em: 16 mai 2020.

WILLIAMS, G. **Advanced biology for you**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015, 505 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Classification of diabetes mellitus**. Geneva, 2019. 40 p.

XIN, F. et al. Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. In: LARROCHE, Christian et al. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Londres: Elsevier, 2019. Cap. 9. p. 207-232. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640857000095>. Acesso em: 16 maio 2020.

ZHANG, Y. et al. Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, Changsha, v. 60, p. 271–276, 2014. Disponível em: < <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314003029> >. Acesso em: 16 mai 2020.