

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais

PPGE3M

**Polianilina para aplicação em biossensores amperométricos de
glicose**

Betina Hansen

Porto Alegre

2017

BETINA HANSEN

**POLIANILINA PARA APLICAÇÃO EM BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS DE
GLICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Hansen, Betina
Polianilina para aplicação em biossensores
amperométricos de glicose / Betina Hansen. -- 2017.
130 f.

Orientador: Carlos Arthur Ferreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Polianilina. 2. Biossensor. 3. Glicose. I. Ferreira, Carlos Arthur, orient. II. Título.

BETINA HANSEN

**POLIANILINA PARA APLICAÇÃO EM BIOCENSORES AMPEROMÉTRICOS DE
GLICOSE**

Esta tese de doutorado foi julgada adequada para obtenção do título de Doutor em Engenharia, área de concentração de Ciência e Tecnologia dos Materiais, e aprovada em sua forma final pelo professor orientador e pela banca examinadora do Curso de Pós-Graduação.

Porto Alegre, 07 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira
Orientador

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann
Coordenador do PPGE3M/UFRGS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jarem Raul Garcia (UEPG)

Dr^a. Alessandra Fiorini Baldissera (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Jane Zoppas Ferreira (PPGEM)

*Aos meus pais, Irineu e Maria da Graça Hansen,
pelo apoio incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento.

Principalmente ao professor Dr. Carlos Arthur Ferreira, agradeço pela dedicação, orientação e amizade nestes 11 anos em que me orientou, desde a época da iniciação científica, passando pelo mestrado e doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL) da Escola de Engenharia da UFRGS, sobretudo às colegas e amigas, Marcele, Eliane, Cristiane, Larissa e Franciéli, pelo apoio e amizade. Esta longa caminhada foi muito mais divertida com vocês ao meu lado.

Às bolsistas de iniciação científica Stéphanie, Natana e Gabriela pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas da Univates, que acompanharam os dois últimos anos de doutorado e que me incentivaram a não desistir.

À minha família e em especial aos meus pais Irineu e Maria da Graça pelo apoio incondicional, incentivo, segurança e amor. Sem vocês este trabalho não seria possível. Amo vocês e agradeço imensamente por sempre acreditarem que eu iria conseguir!

À UFRGS, PPGE3M, CNPq, FINEP e FK Biotecnologia pelo suporte técnico e financeiro.

PUBLICAÇÕES

Os resultados das pesquisas obtidos durante o período do doutorado foram publicados em uma revista científica e em alguns congressos de âmbito nacional e internacional, como listado a seguir:

[1] A facile and simple polyaniline-poly(ethylene oxide) based glucose biosensor. **Hansen, B.**; Hocevar, M. A.; Ferreira, C. A. *Synthetic Metals*, v. 222, p. 224-231, 2016.

[2] Polianilina-Poli(óxido de etileno): Síntese e estudos preliminares na aplicação em biossensores. **Hansen, B.**; Hocevar, M. A.; Binotto, N.; Medeiros, N. de S.; Ferreira, C. A. Em: *XIV Latin American Symposium on Polymers, 2014, Ipojuca - Porto de Galinhas*.

[3] Synthesis of polyaniline and its application in the construction of biosensors. **Hansen, B.**; Hocevar, M. A.; Sá, S. C.; Ferreira, C. A.; Kreutz, F.T. Em: *24th Anniversary World Congress on Biosensors, 2014, Melbourne – Austrália*.

[4] Creation of an amperometric sensor prototype for detection of infectious diseases; Hocevar, M. A., **Hansen, B.**, Binotto, N., Kreutz, F. T., Ferreira, C. A. Em: *24th Anniversary World Congress on Biosensors, 2014, Melbourne*.

[5] Studies on well-dispersed DBSA doped polyaniline. **Hansen, B.**; Hocevar, M. A.; Binotto, N.; Ferreira, C. A. Em: *XIII Simposio Latinoamericano de Polimeros, 2012, Bogotá – Colômbia*.

[6] Influence of reaction time in the synthesis of PANi/DBSA soluble in organic solvent. Hocevar, M. A., **Hansen, B.**, Baldissera, A. F., Binotto, N., Ferreira, C. A. Em: *XIII Simpósio Latinoamericano de Polímeros, 2012, Bogotá*.

[7] Produção e caracterização de tinta de grafite com diferentes proporções de PANi/DBSA. **Hansen, B.**; Hocevar, M. A.; Ferreira, C. A. Em: *20^o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2012, Joinville*.

“Desistir...eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chã nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Cora Coralina

RESUMO

A pesquisa na área de biossensores de glicose tem crescido muito nos últimos anos, devido a sua grande importância no monitoramento contínuo da glicemia em pessoas com diabetes. O estudo da utilização de novos materiais nestes dispositivos, como os polímeros condutores e nanopartículas de ouro, tem sido alvo de extensas pesquisas. Neste trabalho, a polianilina (PAni), um dos polímeros condutores mais estudados, foi sintetizada quimicamente na presença de poli(óxido de etileno) (PEO) e também na presença de PEO e de ácido cloroáurico (HAuCl_4), para a formação de nanopartículas de ouro (NPAu). Estes nanocompósitos foram utilizados na fabricação de um biossensor eficiente para glicose, servindo de suporte para a imobilização da enzima glicose oxidase (GOx) e de facilitadores do transporte de elétrons. Os polímeros foram caracterizados por infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia UV-visível, voltametria cíclica e pelo método padrão de 4 pontas. Para a produção dos biossensores, parâmetros como a quantidade de polímero a ser aplicada sobre os eletrodos, a concentração da GOx, o pH do eletrólito de realização dos ensaios eletroquímicos e a quantidade de mediador no eletrólito, foram avaliadas previamente por voltametria cíclica, a fim de encontrar a máxima resposta eletroquímica do biossensor. Além dos ensaios de voltametria cíclica, os biossensores foram caracterizados por espectroscopia de impedância eletroquímica e por cronoamperometria. Através dos ensaios de cronoamperometria foi verificado que o biossensor de PAni-PEO detecta glicose em uma faixa de concentrações de 1 a 10 mM, com sensibilidade de $16,04 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, e o de PAni-PEO-NPAu, na faixa de 0,1 a 5,5 mM, com sensibilidade de 5,5 e $0,76 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, nas faixas de concentração de 0,1 a 0,5 e de 1,5 a 5,5 mM, respectivamente. Além disso, ambos os biossensores apresentaram seletividade a interferentes como ácido ascórbico e ácido úrico, confirmando que o sinal gerado nos ensaios eletroquímicos refere-se efetivamente à detecção da glicose.

Palavras-chave: Polianilina. Biossensor. Glicose.

ABSTRACT

Research in the area of glucose biosensors has grown tremendously in recent years due to their great importance in continuous glucose monitoring in patients with diabetes. The study of the use of new materials in these devices, such as conductive polymers and gold nanoparticles, has been the subject of extensive research. In this work, polyaniline (PAni), one of the most studied conductive polymers, was chemically synthesized in the presence of polyethylene oxide (PEO) and also in the presence of PEO and chloroauric acid (HAuCl_4) for the formation of gold nanoparticles (AuNP). These nanocomposites were used in the manufacture of an efficient glucose biosensor, serving as support for the immobilization of the enzyme glucose oxidase (GOx) and as electron transport facilitators. The polymers were characterized by Fourier transform infrared (FT-IR), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), UV-visible spectroscopy, cyclic voltammetry and standard 4-point probe method. For the production of the biosensors, parameters such as the amount of polymer to be applied on the electrodes, the concentration of GOx, the electrolyte's pH of the electrochemical tests and the amount of mediator in the electrolyte were previously evaluated by cyclic voltammetry to find the maximum electrochemical response of the biosensor. In addition to the cyclic voltammetry tests, the biosensors were characterized by electrochemical impedance spectroscopy and chronoamperometry. Through the chronoamperometry assays, it was verified that PAni-PEO biosensor detected glucose in a range of 1 to 10 mM, with a sensitivity of $16,04 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ and PAni-PEO-NPAu biosensor, in the range of 0,1 to 5,5 mM, with sensitivity of 5,5 and $0,76 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ in the 0,1 to 0,5 and 1,5 to 5,5 mM ranges, respectively. In addition, both biosensors presented selectivity to interferences such as ascorbic acid and uric acid, confirming that the signal generated in the electrochemical tests effectively refers to the detection of glucose.

Keywords: Polyaniline. Biosensor. Glucose.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Teste rápido de glicose	1
Figura 2 - Estrutura geral da PANi.....	5
Figura 3 - Representação esquemática das diferentes estruturas da PANi.....	5
Figura 4 - Evolução morfológica da PANi durante síntese química em HCl 1 M. A microscopia eletrônica de transmissão mostra claramente que (a) nanofibras são produzidas nos primeiros estágios de polimerização e então (b) e (c) tornam-se aglomerados maiores e com formato irregular.....	8
Figura 5 - Ilustração da síntese interfacial. (a) Uma interface é formada entre a fase orgânica e a fase aquosa, (b) nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa (superior) e (c) nanofibras se acumulam na fase aquosa.....	9
Figura 6 - Ilustração da síntese por adição rápida de reagentes. (a) A solução oxidante é rapidamente adicionada à solução contendo anilina; (b) uma solução homogênea é obtida, onde toda a anilina e oxidante estão bem distribuídos por toda a solução e (c) todos os reagentes são consumidos na formação das nanofibras.....	9
Figura 7 – Representação esquemática da síntese de nanocompósitos de PANi e Au. A PANi formada no nanocompósito está na forma de sal de esmeraldina.....	10
Figura 8 - Estrutura química do poli(óxido de etileno).	11
Figura 9 – Voltamograma cíclico típico obtido em um caso de um sistema eletroquímico reversível (rápido).....	13
Figura 10 – Dependência linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura para um sistema composto por PANi, polivinilpirrolidona, NP Au e GOx.	14
Figura 11 - Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura em um sistema composto por cisteamina, quitosana e GOx.	14
Figura 12 - Voltamograma cíclico da PANi em meio ácido no intervalo de -0,2 a +1,0 V, mostrando as cores dos diferentes estados de oxidação.	15
Figura 13 – Diagrama de Nyquist.....	16
Figura 14 - Representação da reação da GOx.	19
Figura 15 - Representação esquemática da GOx.....	20
Figura 16 - Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática sobre um suporte. (A) adsorção física, (B) ligação covalente, (C) <i>entrapment</i> e (D) confinamento.....	21
Figura 17 – Principais componentes de um biossensor.	23
Figura 18 – Representação esquemática dos biossensores de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C).	25
Figura 19 – Exemplos de biossensores de glicose disponíveis no mercado.....	28
Figura 20 – Curvas de cronoamperometria para a detecção de colesterol, em tampão fosfato (pH 6,8), mediante a aplicação de um potencial de -0,05 V (vs. Ag/AgCl).....	30

Figura 21 - Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.	31
Figura 22 – Mecanismos de detecção de glicose usando a PANi como plataforma de imobilização: A) PANi como mediador e B) oxidação do H ₂ O ₂	33
Figura 23 - Resposta amperométrica de um biosensor de glicose composto de PANi, grafeno e NP Au, após sucessivas adições de glicose em uma solução de PBS (0,1 M, pH 7). Potencial aplicado de -0,55 V.....	35
Figura 24 – Cronoamperometria do hidrogel de PAA/rGO/PANi-VS/LuPc ₂ /GOx para sucessivas adições de glicose 1 mM em PBS 0,1 M (pH 7,0). O gráfico inserido na figura corresponde à curva de calibração da [glicose] <i>versus</i> corrente elétrica.....	36
Figura 25 – (A) Voltametrias cíclicas do biossensor de glicose produzido com 4-amino tiofenol/nanopartículas de Au/glicose oxidase (GOx)–horseradish peroxidase (HRP)/ácido 6-mercapto-1-hexanol-11-mercaptoundecanóico em uma solução de PBS 0,2 M contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ , (B) Gráfico ΔI <i>versus</i> concentração de glicose.....	37
Figura 26 - Etapas da síntese da PANi-PEO. (a) Soluções de PEO com anilina e PSA, em HCl 1 M, (b) e (c) adição de uma solução sobre a outra, sob agitação, (d) adição completa das soluções.	42
Figura 27 - PANi-PEO após diálise (a) na placa de Petry, (b) armazenada há 2 dias sem precipitar.....	43
Figura 28 - Etapas da síntese da PANi-PEO-NPAu. (a) Soluções orgânica (transparente) e aquosa (amarela), (b) após 2 min de síntese, (c) após 20 min de síntese e (d) após 30 min de síntese.....	44
Figura 29 - PANi-PEO-NPAu após diálise (a) na placa de Petry, (b) armazenada há 2 dias. ..	45
Figura 30 – (a) Eletrodo de carbono indicando os eletrodos de trabalho (ET), contra eletrodo (CE) e eletrodo de referência (ER), (b) eletrodo fixado no dispositivo improvisado.	48
Figura 31 – Esquema ilustrando a produção do biossensor Pt/PANi-PEO/GOx.	49
Figura 32 – Esquema para a produção do biossensor com PANi-PEO-NPAu.....	49
Figura 33 – Célula eletroquímica para a realização dos ensaios com a PANi-PEO.	51
Figura 34 – Espectroscopia FT-IR das amostras de PANi, PEO e PANi-PEO.....	56
Figura 35 - Espectroscopia FT-IR das amostras de PANi, PEO e PANi-PEO-NPAu.....	57
Figura 36 – Micrografias MEV, a) e b) da PANi-PEO em diferentes magnificações; c) e d) da PANi-PEO/GOx em diferentes magnificações.	59
Figura 37 – Micrografias MEV a) da PANi-PEO-NPAu, b) da PANi-PEO-NPAu/GOx, c) espectroscopia de EDX da PANi-PEO-NPAu e d) porcentagem de cada elemento atômico na área avaliada.	60
Figura 38 – Micrografias MET da (a) e (b) PANi-PEO, em diferentes magnificações e (c) e (d) PANi-PEO-NPAu em diferentes magnificações. As áreas circuladas nas imagens (a) e (c) indicam onde houveram as magnificações.....	61
Figura 39 – Micrografia MET de nanofibras de PANi no início de uma síntese convencional.	

.....	62
Figura 40 – Espectroscopias no UV-Visível das amostras de PAni, PAni-PEO e PAni-PEO-NPAu, diluídas 100 vezes em água.	63
Figura 41 - Voltamograma cíclico da PAni-PEO e do eletrodo de Pt, em HCl 1 M. Potencial ciclado de -0,2 V a +0,8 V, <i>versus</i> eletrodo de Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam a direção do ciclo.	64
Figura 42 - Voltamograma cíclico da PAni-PEO-NPAu e do eletrodo de carbono (EC), em HCl 1 M. Potencial ciclado de -0,2 V a +0,8 V, <i>versus</i> eletrodo de Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam a direção do ciclo.....	65
Figura 43 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função do pH do eletrólito. Eletrólitos: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 ou pH 7, contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.....	68
Figura 44 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função do volume de PAni-PEO aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.....	69
Figura 45 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função da concentração de mediador redox K ₃ Fe(CN) ₆ no eletrólito. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 1, 5 ou 10 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	71
Figura 46 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função da concentração de GOx aplicada no biossensor. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	72
Figura 47 – Voltamogramas cíclicos da (a) Pt/PAni-PEO e (b) Pt/PAni-PEO/GOx na ausência e na presença de 1 mM de glicose no eletrólito. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	73
Figura 48 – Voltametrias cíclicas do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em velocidades de varredura variando de 30 a 150 mV/s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆ . As setas indicam o sentido das varreduras.....	74
Figura 49 - Relação entre as correntes dos picos anódicos e catódicos com (a) velocidades de varredura e (b) raiz quadrada da velocidade de varredura, com suas respectivas linhas de tendência e equações características.....	75
Figura 50 – Diagrama de Nyquist da PAni-PEO aplicada sobre o eletrodo de Pt (Pt/PAni-PEO) e do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx. A inserção representa um detalhe da região de alta frequência. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de	

$K_3Fe(CN)_6$	76
Figura 51 – Cronoamperometrias do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a escolha do potencial de detecção da glicose. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. A seta indica a primeira adição de 0,5 mM de glicose. .	78
Figura 52 – Cronoamperometria para detecção de glicose, com adições sucessivas de glicose 1 mM a cada 30 s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,2 V.	79
Figura 53 – Curva de calibração do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a detecção de glicose, com sua respectiva equação característica.....	79
Figura 54 – Cronoamperometria do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a detecção dos interferentes ácido úrico (A.U.) e ácido ascórbico (A.A.), ambos com concentração de 0,2 mM e de glicose (Gli) 1 mM. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,2 V.....	81
Figura 55 – Estabilidade do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx após armazenamento por 4 semanas.....	82
Figura 56 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-AuNP/GOx em função do pH do eletrólito. Eletrólitos: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 ou pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.....	84
Figura 57 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função do volume de PAni-PEO-NPAu aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	85
Figura 58 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função da concentração de mediador redox $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 1, 5 ou 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	86
Figura 59 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função da concentração de GOx aplicada no biossensor. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.....	87
Figura 60 - Voltamogramas cíclicos da (a) EC/PAni-PEO-NPAu e (b) EC/PAni-PEO-NPAu/GOx na ausência e na presença de 1 mM de glicose no eletrólito. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.	88
Figura 61 - Voltametrias cíclicas do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em velocidades de varredura variando de 30 a 150 mV/s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. As setas indicam o sentido das varreduras.	

A inserção representa a relação entre as correntes dos picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) com as velocidades de varredura, além das suas respectivas linhas de tendência e equações características.....	89
Figura 62 - Diagrama de Nyquist da PANi-PEO-NPAu aplicada sobre o eletrodo de carbono (EC/PAni-PEO-NPAu) e do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx. A inserção representa o gráfico em outra escala. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$	90
Figura 63 – (a) Cronoamperometrias do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a escolha do potencial de detecção da glicose. A seta indica a primeira adição de 0,5 mM de glicose, (b) Cronoamperometria do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx aplicando-se o potencial de +0,3 V. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$	92
Figura 64 - Cronoamperometria para detecção de glicose, com adições sucessivas de glicose 0,1 mM e 1 mM a cada 30 s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,3 V.....	93
Figura 65 - Curva de calibração do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a detecção de glicose, com as respectivas equações características.....	94
Figura 66 - Cronoamperometria do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a detecção dos interferentes ácido úrico (A.U.) e ácido ascórbico (A.A.), ambos com concentração de 0,2 mM e de glicose (Gli) 1 mM. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,3 V.....	96
Figura 67 - Estabilidade do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx após armazenamento por 4 semanas.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de caracterização de biossensores e suas definições.	29
Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados neste trabalho.	39
Tabela 3 - Diferentes sínteses de PANi realizadas.	41
Tabela 4 – Estudos realizados na otimização da produção do biossensor Pt/PAni-PEO/GOx, estabelecendo os parâmetros variados e os parâmetros fixados em cada análise.....	51
Tabela 5 - Estudos realizados na otimização da produção do biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, estabelecendo os parâmetros variados e os parâmetros fixados em cada análise.	52
Tabela 6 – Parâmetros otimizados para a produção do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx e para realização dos ensaios eletroquímicos.	73
Tabela 7 - Parâmetros otimizados para a produção do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx e para realização dos ensaios eletroquímicos.	88
Tabela 8 – Desempenho de diferentes biossensores amperométricos de glicose.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EC	Eletrodo de carbono
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
GOx	Glicose oxidase
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LOD	Limite de detecção
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPAu	Nanopartículas de ouro
PAni	Polianilina
PBS	Tampão fosfato salino
PEO	Poli(óxido de etileno)
PIC	Polímero intrinsecamente condutor
Pt	Platina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Polianilina (PAni)	4
3.1.1 Síntese	6
3.1.2 Processabilidade.....	10
3.1.3 Caracterização eletroquímica.....	12
3.1.3.1 Voltametria cíclica	12
3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	15
3.2 Enzimas	17
3.2.1 Glicose oxidase (GOx).....	18
3.2.2 Métodos de imobilização enzimática	20
3.3 Biossensores.....	22
3.3.1 Biossensor amperométrico enzimático de glicose	25
3.3.2 Parâmetros e desempenho.....	28
3.3.3 A PAni em biossensores de glicose	32
4 EXPERIMENTAL	39
4.1 Materiais.....	39
4.2 Síntese das polianilinas	40
4.2.1 Síntese da PAni-PEO.....	41
4.2.2 Síntese da PAni-PEO-NPAu	43
4.3 Caracterização dos polímeros	45
4.3.1 Condutividade elétrica.....	45
4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)	46
4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
4.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	46
4.3.5 Espectroscopia no UV-Visível.....	47
4.3.6 Voltametria cíclica	47
4.4 Produção dos biossensores	48
4.5 Caracterização dos biossensores.....	50
4.5.1 Voltametria cíclica	50
4.5.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica	53

4.5.3	<i>Cronoamperometria</i>	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Caracterização dos polímeros	55
5.1.1	<i>Condutividade elétrica</i>	55
5.1.2	<i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)</i>	56
5.1.3	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	58
5.1.4	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	60
5.1.5	<i>Espectroscopia no UV-Visível</i>	62
5.1.6	<i>Voltametria cíclica</i>	64
5.2	Produção e caracterização dos biossensores	66
5.2.1	<i>Biossensor Pt/PAni-PEO/GOx</i>	66
5.2.1.1	<i>Voltametria cíclica</i>	66
5.2.1.2	<i>Espectroscopia de impedância eletroquímica</i>	75
5.2.1.3	<i>Cronoamperometrias</i>	76
5.2.2	<i>Biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx</i>	83
5.2.2.1	<i>Voltametria cíclica</i>	83
5.2.2.2	<i>Espectroscopia de impedância eletroquímica</i>	90
5.2.2.3	<i>Cronoamperometria</i>	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
7	CONCLUSÃO	101
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
	REFERÊNCIAS	104

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Saúde, o diabetes atinge 7,4% da população adulta no Brasil¹ e, mundialmente, há cerca de 422 milhões de diabéticos, com expectativa de que este número chegue a 592 milhões de pessoas em 2035 (LAI et al., 2016). Considerando estes números, há a necessidade de se desenvolver tecnologias nacionais que permitam ao portador de diabetes a auto monitoração glicêmica em casa, de forma eficiente e com baixo custo, garantindo uma vida saudável e com qualidade.

O teste de glicemia capilar é o método mais simples e rápido de auto monitorar os níveis de glicose no sangue. Este é um teste rápido onde, com o auxílio de uma lanceta, uma gota de sangue é gerada e colocada na extremidade de uma tira teste (chamada cientificamente de biossensor de glicose), a qual é encaixada no equipamento de detecção. Após poucos segundos, o nível de glicemia no sangue é determinado, geralmente em mg/dL. (Figura 1).

Figura 1 - Teste rápido de glicose



Fonte: Google Imagens.

Apesar da intensa pesquisa e publicação de artigos para aprimorar os biossensores de glicose, poucos realmente são produzidos, permanecendo no mercado aqueles fabricados por grandes empresas multinacionais. No Brasil, cada tira teste custa aproximadamente R\$ 1,50², o que gera um grande investimento mensal, principalmente para uma pessoa portadora de diabetes do tipo I, que necessita monitorar o nível de glicose no mínimo 3 vezes por dia.

¹ Dados da pesquisa Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), de 2015, disponível no site do Ministério da Saúde.

² Pesquisa informal realizada pela autora, em 5 farmácias de Porto Alegre/RS.

Com a descoberta dos polímeros condutores em 1977, surgiu uma nova e ampla área de pesquisa, aplicando esta classe de polímeros nas mais diversas áreas da ciência, inclusive no aprimoramento de biossensores. Os polímeros condutores, por serem biocompatíveis, auxiliam tanto na imobilização do elemento sensível na superfície do biossensor quanto na conversão do sinal biológico em sinal elétrico, a partir das suas propriedades condutoras.

Dentro desta classe de polímeros, destaca-se a polianilina (PAni), a qual apresenta baixo custo, fácil síntese, inclusive com morfologia em escala nanométrica, além de biocompatibilidade, tornando-se uma excelente alternativa para atuar como matriz de imobilização de biocomponentes e como facilitadora dos processos de transferência de cargas que ocorrem em biossensores. No entanto, a PAni apresenta como desvantagem a difícil processabilidade, o que dificulta a sua aplicação nas tiras teste.

Uma das formas de melhorar a processabilidade da PAni é através da formação de nanocompósitos com polímeros convencionais como, por exemplo, o poli(óxido de etileno) (PEO). Desta forma, é possível obter uma dispersão homogênea e viscosa, facilitando a aplicação do polímero sobre a superfície da tira teste.

Nos últimos anos, as pesquisas relativas a biossensores com PAni foram se tornando cada vez mais complexas, envolvendo também diferentes materiais para melhorar a sensibilidade e seletividade, como grafeno, nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de ouro (NPAu) ou até mesmo uma combinação destes e outros materiais. Como resultado, os biossensores pesquisados são complexos, de alto custo e difíceis de serem produzidos industrialmente. Além disso, em muitos destes trabalhos a PAni é sintetizada eletroquimicamente, o que também dificulta a produção em escala industrial.

Desta forma, neste trabalho, diferentes sínteses químicas de PAni foram estudadas com o objetivo de produzir um biossensor de glicose simples, de fácil fabricação e reprodutível. Para melhorar a processabilidade da PAni, as sínteses foram realizadas em presença do PEO, com ou sem a formação de NPAu, produzindo a PAni no estado condutor, nanoestruturado, disperso em um meio viscoso, para ser aplicada sobre a superfície dos eletrodos. Diversos parâmetros de produção do biossensor foram avaliados com o intuito de otimizar a faixa linear, o limite de detecção, o tempo de resposta e a estabilidade.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é a produção de um biossensor amperométrico de glicose que seja simples, eficiente e de fácil produção, utilizando a PANi sintetizada quimicamente na presença de PEO, com ou sem a formação de NPAu, como suporte de imobilização da enzima glicose oxidase e como facilitadora do transporte de elétrons entre a enzima, glicose oxidase (GOx), e o transdutor.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polianilina (PAni)

Desde a sua descoberta acidental em 1977 por Hideki Shirakawa, através da exposição do poliacetileno a agentes dopantes, os polímeros intrinsecamente condutores (PICs) tem sido extensivamente estudados (CHIANG *et al.*, 1977; MATTOSO, 1996). Estes materiais combinam as vantagens dos polímeros (leves e baratos) com a habilidade de conduzir cargas elétricas. Esta combinação única de propriedades físicas, ópticas e elétricas tem permitido sua aplicação em diversas áreas (CREAN *et al.*, 2011).

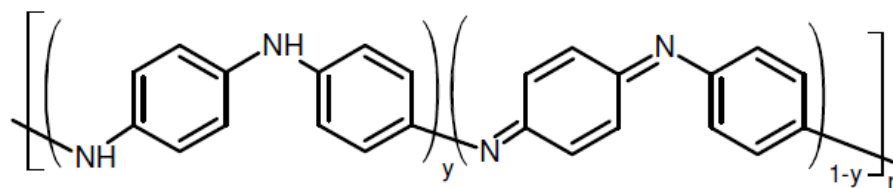
Os PICs são condutores por natureza devido à presença de ligações insaturadas conjugadas, ou seja, uma alternância de ligações duplas e simples ao longo da cadeia, formando uma estrutura ressonante com deslocalização dos elétrons π , a qual forma um “caminho” para a mobilidade de cargas ao longo da cadeia (HEEGER, 2002; SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016). No entanto, segundo Bhadra *et al.* (2009), altas condutividades são atingidas somente através de processos de oxidação, redução ou dopagem da cadeia polimérica.

Dentre os PICs, destaca-se a PAni, a qual é o produto da polimerização oxidativa da anilina em meio ácido e que foi primeiramente relatada em 1862, como negro de anilina. A partir de então, diversos estudos foram conduzidos quanto à sua composição e polimerização com diferentes ácidos minerais e oxidantes, como persulfato e dicromato. Porém, as propriedades condutoras da PAni só foram descobertas quando se aplicou o conceito de dopagem, aplicado aos semicondutores (RODRIGUES, 2004; TRIVEDI, 1997), e então o interesse neste polímero aumentou.

O termo polianilina se refere a uma classe de polímeros com 1000 ou mais unidades repetitivas, cuja forma básica (não dopada) é dada pela fórmula geral representada na Figura 2, possuindo y e $(1-y)$ unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas, correspondendo aos anéis benzenoides e quinoides, respectivamente (RAY *et al.*, 1989).

A PAni está no estado leucoesmeraldina, esmeraldina e pernigranilina quando y é igual a 1, 0,5 e 0, respectivamente.

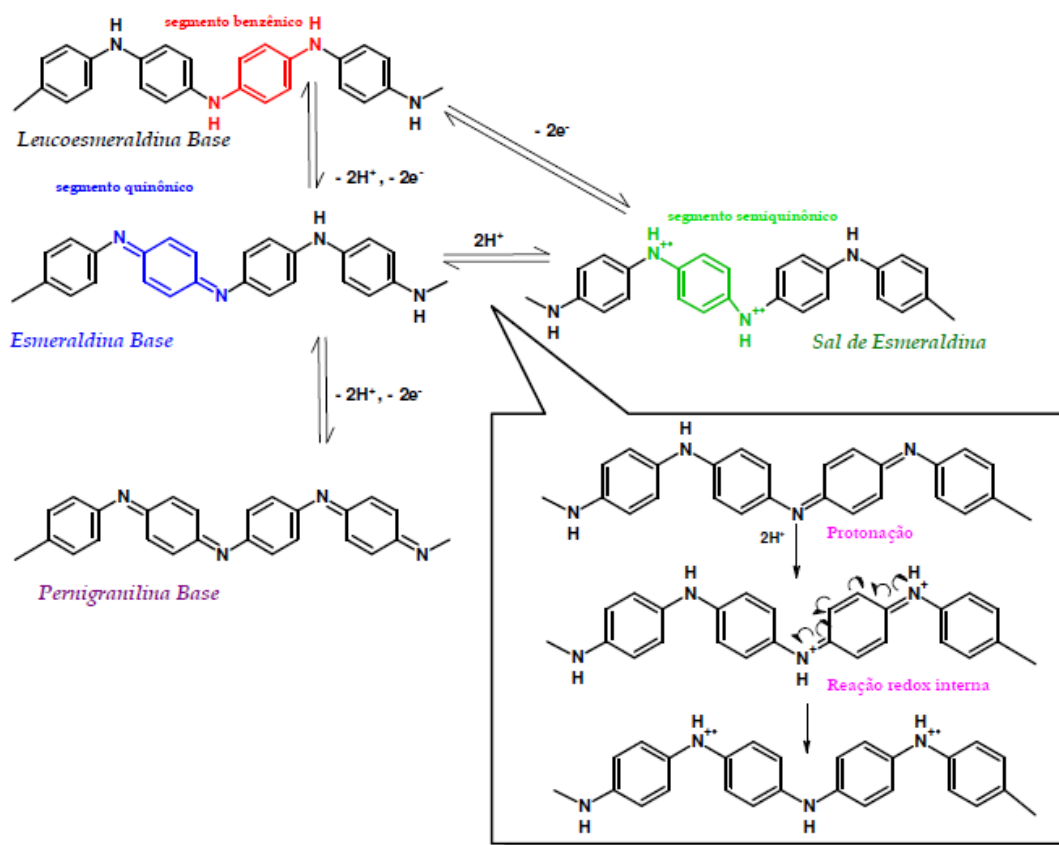
Figura 2 - Estrutura geral da PANi.



Fonte: Adaptado de Ray *et al.* (1989).

A PANi é o único polímero condutor que pode ser dopado tanto por reações redox, quanto por protonação, através de reações ácido-base, sem alteração do número de elétrons associado ao polímero (SILVA, 2000). A Figura 3 ilustra os diferentes estados de oxidação da PANi.

Figura 3 - Representação esquemática das diferentes estruturas da PANi.



Fonte: Izumi (2006).

Na Figura 3 observa-se que a forma esmeraldina base da PANi pode reagir com ácidos protônicos resultando na forma condutora da PANi, sal de esmeraldina, com um aumento na condutividade de até 10 ordens de grandeza. A protonação é realizada preferencialmente nos nitrogênios imínicos, gerando defeitos catiônicos (polarons e bipolarons), os quais são

responsáveis pela condutividade e comportamento redox da PANi (DHAND *et al.*, 2015; IZUMI, 2006).

Na dopagem ocorre inserção de contra-íons na cadeia polimérica e, desta forma, a PANi condutora pode ser caracterizada como um sal (polication com um ânion por unidade repetitiva) (HEEGER, 2002). Esta facilidade de conversão entre as formas básicas torna a PANi um grande potencial em aplicações tecnológicas.

Do ponto de vista econômico, a PANi é bastante superior aos outros PICs, já que seu monômero é de baixo custo, a síntese é bastante simples, pode ser obtida facilmente com morfologia em escala nanométrica, suas propriedades podem ser alteradas facilmente, possui estabilidade química em condições ambientais e habilidade única de ser dopada por ácidos protônicos (BHADRA *et al.*, 2009; MATTOSO, 1996; SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016). Além disso, a PANi é reconhecida como o único polímero condutor que é estável ao ar (LAI *et al.*, 2016). No entanto, o que limita a aplicação deste polímero é a sua baixa processabilidade, a qual será discutida na Seção 3.1.2 deste trabalho.

3.1.1 Síntese

Existem diversos métodos para sintetizar a PANi, como polimerização química, eletroquímica, fotoinduzida e catalisada por enzimas (BHADRA *et al.*, 2009). No entanto, os dois primeiros métodos são os mais utilizados.

Utilizando-se um agente oxidante químico apropriado, a PANi pode ser sintetizada quimicamente na forma de pó ou então, na forma de filmes finos pela oxidação eletroquímica do monômero sobre eletrodos de diferentes materiais inertes (MATTOSO, 1996).

A síntese eletroquímica é realizada em meio ácido contendo altas concentrações de anilina e pode ser feita mediante um potencial estático, em geral com um valor entre +0,7 V e +1,2 V (*versus* ECS) ou por voltametria cíclica, com o potencial sendo ciclado entre -0,2 V e +1,2 V (*versus* ECS) com velocidades de varredura variando entre 10 e 100 mV.s⁻¹ (MATTOSO, 1996; SALVATIERRA, 2010). Este método possui a vantagem de não necessitar de agente oxidante ou iniciador e, além disto, permite a formação de filmes finos com um polímero com maior grau de pureza. Por outro lado, é um método difícil de ser reproduzido e utilizado em grande escala (BHADRA *et al.*, 2009; MATTOSO, 1996).

A síntese química também ocorre em meio ácido, porém sob a ação de um agente

oxidante, ocorrendo precipitação da PANi na forma de um pó verde, dopado com o ácido utilizado na síntese. Este método tem a grande vantagem de produzir um polímero de alto peso molecular e com rendimento maior em relação à síntese eletroquímica. Além disso, possibilita a produção em larga escala e, portanto a industrialização (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007; MATTOSO, 1996).

Uma grande variedade de agentes oxidantes e ácidos dopantes podem ser utilizados, sendo os sistemas mais comuns compostos de persulfato de amônio ou cloreto férrico como agentes oxidantes, e soluções de ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄, HClO₄) como dopantes. O grupo funcional presente no ácido dopante (inorgânico, orgânico ou poliácido), tem grande influência sobre a solubilidade, dispersão, condutividade elétrica, etc. da PANi sintetizada (TRIVEDI, 1997).

Devido à facilidade e diversidade dos métodos de síntese, a PANi pode ser preparada para apresentar determinadas características, dependendo do dopante e das condições de síntese utilizadas. Por exemplo, um polímero de elevada estabilidade térmica pode ser obtido quando sintetizado na presença de ácido fosfórico ou então, quando se utiliza poliácidos como dopantes, a PANi pode se manter dopada inclusive em valores de pH básicos (MATTOSO, 1996).

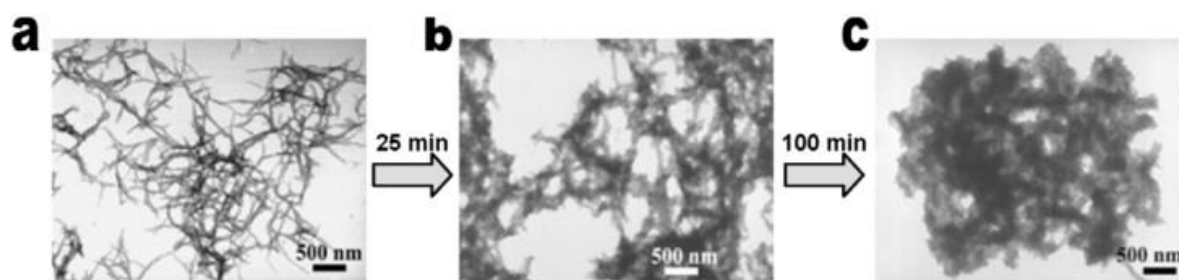
Outros métodos de síntese que vem sendo extensivamente estudados são aqueles que permitem a obtenção da PANi com morfologia em escala nanométrica, resultando em relativo aumento da área superficial (alta razão superfície/volume), maiores interações do polímero com o meio e, portanto, desempenho superior quando comparado a polímeros obtidos por síntese convencional, principalmente em aplicações como sensores químicos, nanocompósitos, entre outras que exigem maior sensibilidade e interação com o meio-ambiente (HUANG *et al.*, 2004).

A PANi em nanoestruturas possui maior organização, apresenta valores de condutividade mais altos e é mais facilmente dispersa em solventes (LI; HUANG; KANER, 2009; SALVATIERRA, 2010). Dentre as principais aplicações destacam-se os sensores químicos (HUANG *et al.*, 2003), colóides (LI; KANER, 2005) e biossensores (XIA; WEI; WAN, 2010). Principalmente em relação à sua utilização em biossensores enzimáticos, a PANi nanoestruturada apresenta maior porosidade e excelentes propriedades eletroquímicas, permitindo altas taxas de imobilização enzimática e difusão rápida das moléculas de analito (LAI *et al.*, 2016).

Através da síntese convencional da PANi são obtidos particulados de tamanhos irregulares, como mostrado na Figura 4, onde observa-se que nanofibras de PANi se formam

espontaneamente no início da reação, comprovando que esta estrutura é intrínseca ao polímero, ou seja, forma-se naturalmente nos primeiros minutos de reação. Portanto, basta controlar as condições de síntese, como tempo de reação, agitação e concentração de reagentes, para que seja possível obter a PANi com morfologia em escala nanométrica.

Figura 4 - Evolução morfológica da PANi durante síntese química em HCl 1 M. A microscopia eletrônica de transmissão mostra claramente que (a) nanofibras são produzidas nos primeiros estágios de polimerização e então (b) e (c) tornam-se aglomerados maiores e com formato irregular.

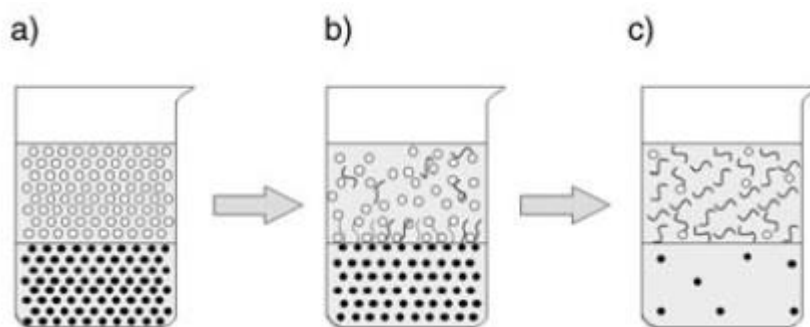


Fonte: Huang (2006).

Diferentes métodos de síntese foram propostos tendo como objetivo suprimir o crescimento secundário das nanofibras formadas no início da reação. Um destes métodos é conhecido como síntese interfacial (Figura 5) (HUANG; KANER, 2004a). Nesta síntese, a polimerização ocorre na interface de um sistema bifásico composto de água (contendo o agente oxidante) e solvente orgânico (contendo o monômero). As nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa por serem hidrofílicas e, com a ausência de monômero, não crescem, mantendo-se em escala nanométrica.

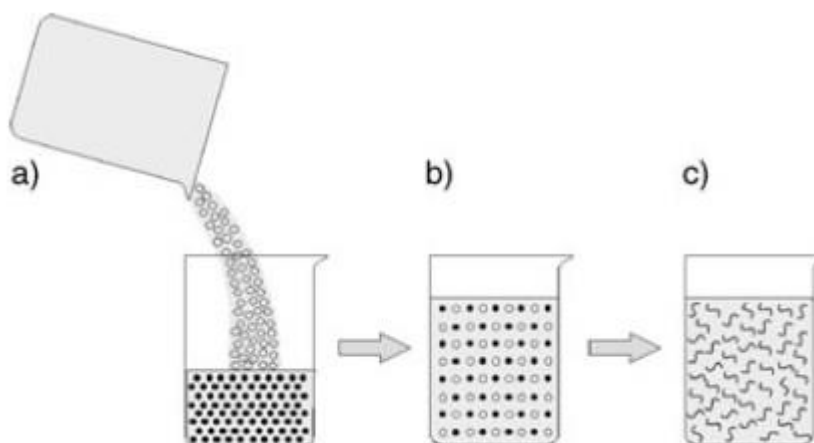
Outra maneira de prevenir o crescimento secundário é parar a polimerização assim que todas as nanofibras se formam. Isto é possível através da agitação rápida das soluções de monômero e oxidante, já que todas as moléculas são consumidas rapidamente, evitando excesso de reagentes para crescimento posterior das nanofibras, como ilustrado na Figura 6. Este método é chamado de *rapidly mixed reaction* ou síntese por adição rápida de reagentes (HUANG, 2006; HUANG; KANER, 2004a).

Figura 5 - Ilustração da síntese interfacial. (a) Uma interface é formada entre a fase orgânica e a fase aquosa, (b) nanofibras se formam na interface e migram para a fase aquosa (superior) e (c) nanofibras se acumulam na fase aquosa



Fonte: Huang; Kaner (2004a).

Figura 6 - Ilustração da síntese por adição rápida de reagentes. (a) A solução oxidante é rapidamente adicionada à solução contendo anilina; (b) uma solução homogênea é obtida, onde toda a anilina e oxidante estão bem distribuídos por toda a solução e (c) todos os reagentes são consumidos na formação das nanofibras.



Fonte: Huang; Kaner (2004a).

A PANi sintetizada pelos métodos citados tem excelente dispersibilidade em água devido a sua morfologia nanofibrilar e, quando forma-se um filme por solução (*casting*) desta dispersão sobre um substrato, uma rede de nanofibras é obtida (HUANG, 2006). No entanto, suas pobres propriedades físicas e mecânicas dificultam a aplicação industrial.

Nos últimos anos, a introdução de um segundo componente na PANi, como nanomateriais por exemplo, tem sido muito estudada. Este segundo componente pode ser nanopartículas metálicas ou de óxidos metálicos, nanotubos de carbono, grafeno, outros polímeros, etc. A adição destes componentes amplia a funcionalidade da PANi, resultando em melhor desempenho do polímero na sua determinada aplicação (SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016). A utilização de outros polímeros como componente secundário será discutida na Seção 3.1.2 deste

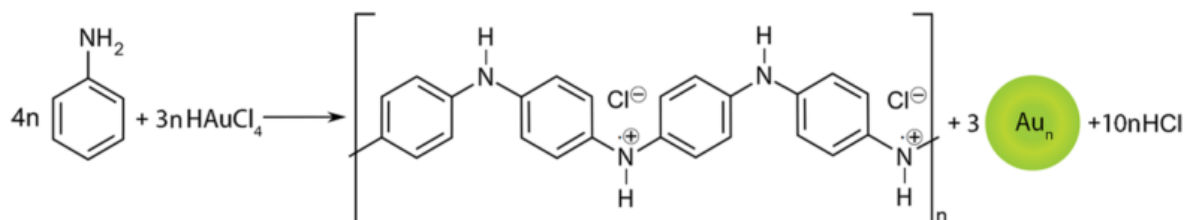
trabalho.

Nanocompósitos de PANi com nanopartículas metálicas tem sido muito pesquisados. Há basicamente duas rotas para sintetizá-los: (i) uma reação redox em uma etapa, onde ocorre simultaneamente a polimerização da anilina e a formação das nanopartículas ou (ii) polimerização *in situ*, onde nanopartículas pré-sintetizadas são misturadas à solução de monômero, seguido de polimerização química ou eletroquímica (SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016).

A fácil reversibilidade de dopagem e desdopagem da PANi facilita a síntese de nanocompósitos conforme a rota (i). Segundo Sen, Mishra e Shimpi (2016), como o potencial de redução padrão da maioria dos sais de metais nobres é maior que o da anilina, uma reação redox de uma etapa pode ser realizada para oxidar a anilina com redução simultânea dos sais de metais nobres, originando nanopartículas de metal nobre com valência zero. O nanocompósito resultante tem as nanopartículas de metal incorporadas na matriz de PANi. Este método tem sido utilizado para preparar nanocompósitos de PANi com Ag, Au, Pt, Cu, etc.

Chowdhury, Gangopadhyay e De (2014) e Gangopadhyay, Chowdhury e De (2012) produziram nanocompósitos de PANi e NPAu em uma única etapa, conforme a rota (i), através de uma síntese interfacial utilizando o ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) como precursor para a formação de NPAu. Bogdanović *et al.* (2015) também utilizou a síntese interfacial para produzir compósitos de PANi e Au, e propôs o mecanismo de síntese apresentado na Figura 7 para estes compósitos. Os autores também verificaram que variando a razão entre a anilina e o agente oxidante (AuCl_4^-) é possível controlar a morfologia e dimensão das estruturas formadas.

Figura 7 – Representação esquemática da síntese de nanocompósitos de PANi e Au. A PANi formada no nanocompósito está na forma de sal de esmeraldina.



Fonte: Bogdanović *et al.* (2015).

3.1.2 Processabilidade

Como já citado, potenciais aplicações da PANi tem sido limitadas devido à sua inerente

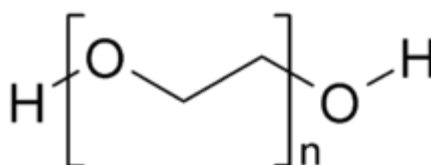
intratabilidade, já que este polímero se decompõe sem fundir e possui baixa solubilidade na maioria dos solventes disponíveis (BHADRA *et al.*, 2009; KURAMOTO; TOMITA, 1997).

Para superar estas desvantagens, muitas pesquisas tem sido realizadas em relação ao método de síntese, estudando a substituição da cadeia alquílica no anel aromático ou no átomo de nitrogênio, a dopagem com ácidos protônicos funcionalizados (ácido canforsulfônico ou p-toluenossulfônico), a copolimerização com monômeros alifáticos, a formação de blendas ou compósitos com polímeros convencionais e a incorporação, na cadeia da PANi, de grupos polares funcionais, cadeias poliméricas ou cadeias alquílicas longas e flexíveis, formando PANi que é solúvel em água e/ou em solventes orgânicos comuns (HAN *et al.*, 2002; JAYMAND, 2013).

Outra forma de melhorar a processabilidade da PANi é sintetizá-la em forma de dispersão. Geralmente são realizadas em meio orgânico, no entanto a síntese em meio aquoso, utilizando um polímero solúvel em água, também é possível (STEJSKAL, 1993). Estes polímeros atuam como estabilizadores, impedindo a aglomeração das partículas de PANi, através da formação de um filme em sua superfície. São exemplos de polímeros utilizados nestas sínteses e que atuam como estabilizadores estéricos o ácido poliestirenosulfônico, o poli(vinil álcool), o poli(vinil metil éter), o PEO, etc. (HAN *et al.*, 2002; HANSEN, B., 2009).

Dentre estes polímeros, destaca-se o PEO, o qual permite a síntese da PANi em um meio aquoso homogêneo e viscoso, combinando as propriedades elétricas da PANi com as propriedades mecânicas do PEO. A estrutura química do PEO está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química do poli(óxido de etileno).



Fonte: Google Imagens.

É possível realizar a polimerização da anilina em uma solução ácida aquosa, contendo o PEO solubilizado e, dependendo da metodologia de síntese, poderão ser formadas nanofibras de PANi, resultando em um nanocompósito de PANi e PEO, como realizado por Li e Jing (2009).

Há estudos da produção de outros compósitos de PANi e PEO através da mistura destes

polímeros em diferentes proporções (AMIN; BILAL; SHAH, 2016; BARTHET; GUGLIELMI; BAUDRY, 1997), sendo que as principais aplicações destes compósitos são para processos de *electrospinning* (KAHOL; PINTO, 2004; PINTO *et al.*, 2003; SUNDARAY; CHOI; PARK, 2010) e para a produção de eletrólitos poliméricos a serem utilizados em baterias e outros dispositivos eletrônicos (DEVENDRAPPÀ; RAO; PRASAD, 2006; KUNTEPPA *et al.*, 2011). Até onde foi pesquisado para a elaboração deste trabalho, não há estudos publicados sobre a aplicação de misturas de PANi e PEO em biossensores de glicose, além da publicação deste trabalho (HANSEN; HOCEVAR; FERREIRA, 2016).

3.1.3 Caracterização eletroquímica

Como já discutido na Seção 3.1, a PANi é um polímero condutor eletroativo que apresenta características redox, ou seja, pode ser oxidado (perda de elétrons) e reduzido (ganho de elétrons). É esta característica que favorece a aplicação deste polímero em dispositivos como os biossensores amperométricos enzimáticos desenvolvidos neste trabalho.

Para efetiva caracterização e entendimento da relação entre estrutura e propriedades dos polímeros condutores, é necessário caracterizá-los corretamente. Além das técnicas convencionais de caracterização físico-química, as propriedades redox devem ser determinadas por métodos eletroquímicos. Dentre estes, destacam-se a voltametria cíclica e a espectroscopia de impedância eletroquímica. Nestes e nos demais ensaios eletroquímicos, fatores externos como a condição da amostra, natureza do eletrólito, temperatura do experimento e tipo de célula eletroquímica devem ser levados em consideração (CASADO *et al.*, 2016).

3.1.3.1 Voltametria cíclica

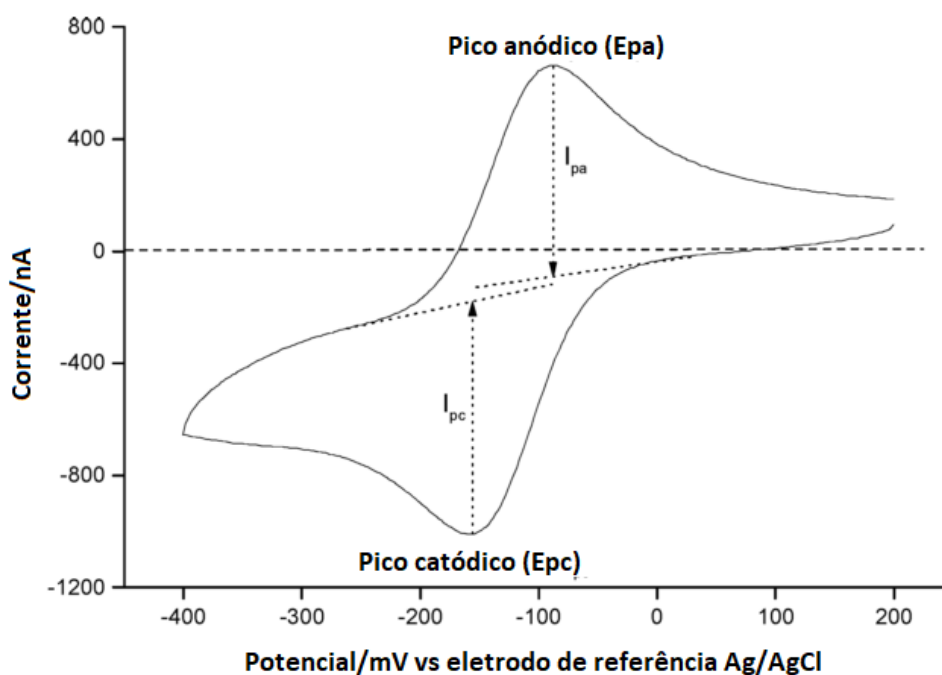
A voltametria cíclica é uma técnica utilizada para caracterizar as propriedades redox de um material, fornecendo informações quanto à estabilidade, reversibilidade do sistema e potenciais de oxidação e redução (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

O método consiste na ciclagem do potencial de um eletrodo (eletrodo de trabalho) imerso em uma solução eletrolítica sem agitação a partir de um valor inicial até um limite pré-determinado, onde a direção da varredura se inverte. Durante a ciclagem, valores de corrente são medidos e o resultado é expresso na forma de um gráfico de corrente ou densidade de corrente (eixo vertical) *versus* potencial (eixo horizontal). Esta medida é realizada a uma taxa constante, chamada velocidade de varredura, dada em mV/s (LOJOU; BIANCO, 2006) A

Figura 9 apresenta um voltamograma cíclico típico de um sistema eletroquímica reversível (rápido).

Ainda segundo Lojou e Bianco (2006), parâmetros importantes a serem determinados a partir desta curva são a magnitude dos picos de corrente (I_{pc} - catódico e I_{pa} - anódico) e a localização dos picos em relação aos valores de potencial (E_{pc} e E_{pa}), os quais determinarão se o sistema é reversível ou não.

Figura 9 – Voltamograma cíclico típico obtido em um caso de um sistema eletroquímico reversível (rápido).

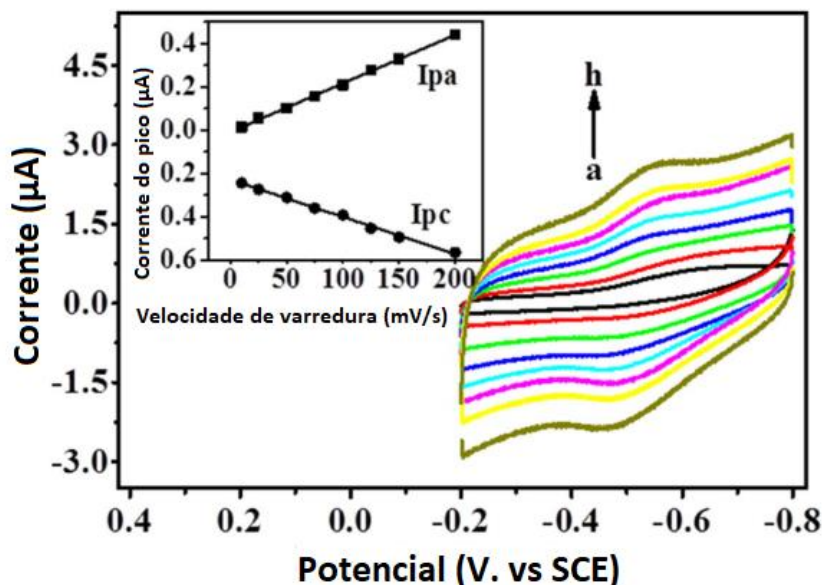


Fonte: Adaptado de Lojou e Bianco (2006).

Segundo Casado *et al.* (2016), a resposta de corrente dos polímeros redox pode ser limitada por dois diferentes processos competitivos: (i) transferência de elétrons na superfície do eletrodo e (ii) difusão. A maioria dos polímeros redox apresenta um comportamento intermediário entre estes dois casos limitantes, o qual é referido como "difusão finita". O conhecimento destes processos limitantes é importante no estudo de biossensores para compreender os fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo e como está havendo o transporte de cargas no sistema.

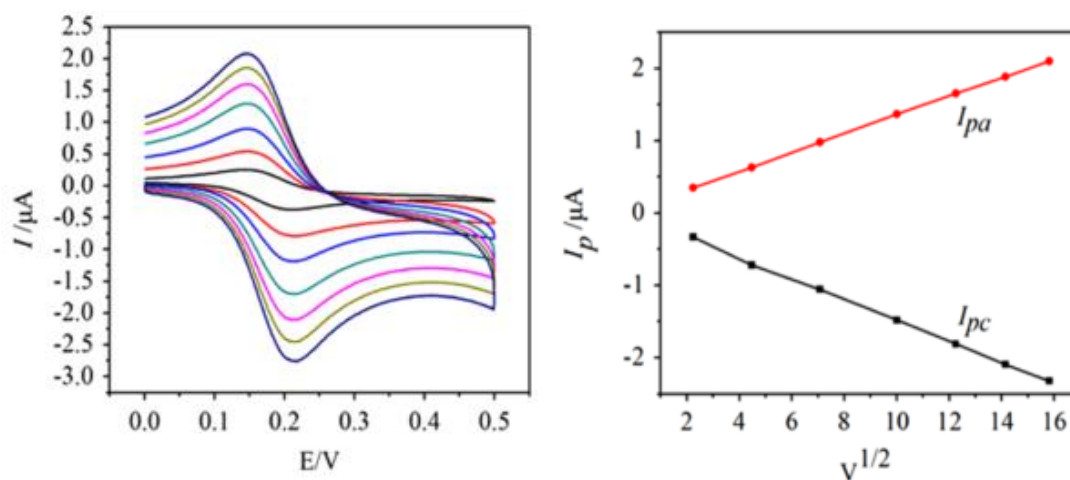
Para determinar o processo de limitação, geralmente são realizadas medidas com diferentes velocidades de varredura, como ilustrado nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 – Dependência linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura para um sistema composto por PANi, polivinilpirrolidona, NPAu e GOx.



Fonte: Adaptado de Miao *et al.* (2015).

Figura 11 - Dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade de varredura em um sistema composto por cisteamina, quitosana e GOx.



Fonte: Zhang *et al.* (2014).

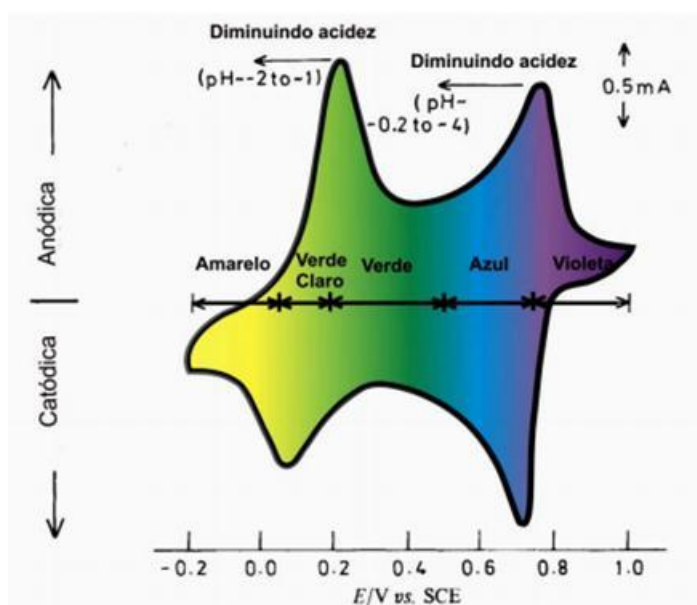
Uma dependência linear da corrente de pico com a velocidade de varredura mostra que o processo não é limitado pela difusão, mas sim pela transferência de elétrons, inferindo também que o polímero está bem aderido à superfície do eletrodo (CASADO *et al.*, 2016). Esta situação está exemplificada na Figura 10. Neste caso, há apenas um aumento do pico de corrente, com o aumento da velocidade de varredura, não havendo deslocamento dos picos de corrente em relação ao potencial.

No entanto, se há uma dependência da corrente de pico com a raiz quadrada da velocidade

de varredura, o processo é limitado por difusão. Esta dependência pode ser visualizada na Figura 11.

Em relação ao comportamento redox da PANi, sabe-se que este polímero apresenta dois pares característicos de picos redox, correspondentes aos seus diferentes estados de oxidação. O primeiro corresponde à conversão entre os estados leucoesmeraldina e esmeraldina e o segundo, entre os estados esmeraldina e pernigranilina (MATTOSO, 1996; TRIVEDI, 1997). A Figura 12 ilustra um voltamograma cíclico típico da PANi, em meio ácido.

Figura 12 - Voltamograma cíclico da PANi em meio ácido no intervalo de -0,2 a +1,0 V, mostrando as cores dos diferentes estados de oxidação.



Fonte: Salvatierra, 2010.

3.1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma excelente ferramenta para investigar a taxa e os processos de transferência de carga que estão ocorrendo em filmes de polímeros condutores ou em membranas.

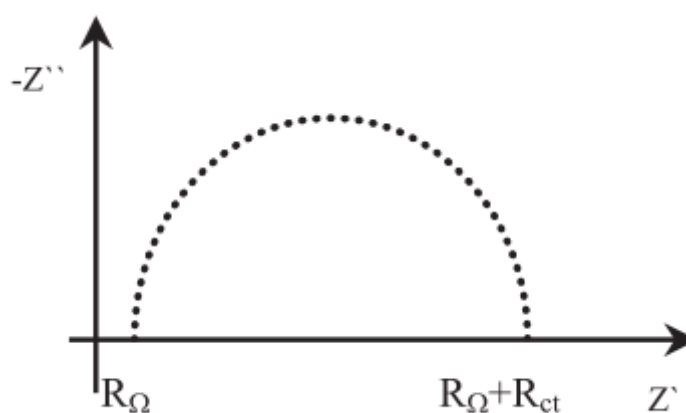
Segundo Damos, Mendes e Kubota (2004), o ensaio consiste em aplicar uma perturbação no sistema mediante a aplicação de um potencial contínuo, sobre o qual é superposta uma variação senoidal de potencial com pequena amplitude (< 5 mV). Como resultado, surge uma corrente de forma senoidal, com um deslocamento de fase em relação ao potencial (INZELT, 2008). Monitorando a relação entre o potencial e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado).

Assim, a partir das medidas da impedância e ângulo de fase é possível avaliar processos como transporte de carga (incluindo estimativa de velocidade de transferência), condutividade de filmes, capacitância redox e de dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, entre outros (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004, p. 972).

Uma das formas de se interpretar a variação da impedância em função da frequência é através da representação de um circuito elétrico equivalente, composto por resistências, capacitâncias e indutâncias, devido à semelhança da célula eletroquímica com um circuito elétrico. Cada sistema eletroquímico deve ser modelado com o circuito apropriado e cada gráfico de Nyquist é característico de um sistema (INZELT, 2008).

Uma das representações da impedância se dá pelo diagrama de Nyquist, que relaciona a parte real Z' (resistiva) com a parte imaginária Z'' (capacitiva). Este diagrama está ilustrado na Figura 13.

Figura 13 – Diagrama de Nyquist.



Fonte: Damos, Mendes e Kubota (2004).

Na Figura 13, R_{Ω} representa a resistência da solução (eletrólito) e R_{ct} representa a resistência à transferência de carga. O conhecimento destas resistências torna esta técnica interessante também para o estudo de biossensores (CASADO *et al.*, 2016). Para a detecção eletroquímica, técnicas de impedância são úteis para monitorar mudanças nas propriedades elétricas decorrentes de eventos de bioreconhecimento nas superfícies de eletrodos modificados. Por exemplo, as alterações na resistência do eletrodo podem ser medidas como resultado da imobilização da biomolécula (GRIESHABER *et al.*, 2008).

3.2 Enzimas

As enzimas são, por definição, proteínas com extraordinária capacidade de catalisar reações biológicas com um alto grau de especificidade. São constituídas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas que determinam a sua estrutura. A sequência e organização desses aminoácidos resultam na estrutura tridimensional que por sua vez, é responsável pela especificidade e atividade da enzima como catalisador (PATACAS, 2007).

A característica principal das enzimas que as diferem dos catalisadores sintéticos é a sua alta especificidade pelos seus substratos, de forma que em uma reação catalisada por enzimas não há formação de produtos laterais. Além disto, as reações catalisadas por enzimas podem ocorrer em condições suaves de temperatura, pH e pressão, ao contrário daquelas reações catalisadas por catalisadores sintéticos (SILVA, 2000).

A característica de uma reação catalisada enzimaticamente é que ela ocorre no interior dos limites de uma cavidade, ou fenda, na estrutura molecular da enzima, chamada centro ativo. A molécula que se liga ao centro ativo e que sofre a ação da enzima é chamada de substrato e a habilidade com que a enzima se liga ao substrato se denomina atividade biológica. Para ser reconhecida como substrato, a molécula deve possuir a forma apropriada para acomodar-se no centro ativo e grupos químicos capazes de se ligarem aos grupos químicos ali presentes. Daí vem a alta especificidade das enzimas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; MARTINS, 2006).

A atividade biológica das enzimas é fortemente afetada por alguns fatores externos, como a temperatura e o pH do meio. Para cada enzima existe uma faixa de temperatura e de pH onde observa-se a máxima atividade enzimática. De acordo com Lehninger, Nelson e Cox (1995), em temperaturas altas (acima de 50°C) a enzima pode desnaturar e, com a sua utilização em um pH fora da faixa ótima, poderá ocorrer variação da conformação dos seus aminoácidos constituintes, levando também à desnaturação.

As enzimas podem ser produzidas, industrialmente, a partir de diversas fontes, podendo ser extraídas de animais ou plantas, porém, as principais fontes são os microorganismos. A produção a partir de fungos e bactérias permite a redução de custos de produção, por serem uma fonte de mais fácil reposição através de uma origem segura e por oferecerem enzimas de alta pureza (MARTINS, 2006). Atualmente, muitas indústrias utilizam enzimas como catalisadores, como por exemplo, no setor alimentício, tratamento de couro, produção de detergentes, análises químicas e clínicas, etc.

Em relação à classificação, as enzimas são agrupadas de acordo com as reações que catalisam, como por exemplo, o grupo das transferases catalisam reações de transferência de grupos entre moléculas, as hidrolases catalisam reações de hidrólise, e as oxidoredutases catalisam reações de oxirredução, transferência de hidrogênio, oxigênio ou elétrons. A este último grupo que pertence a enzima glicose oxidase (GOx), utilizada neste trabalho (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; VIEIRA, 2006) .

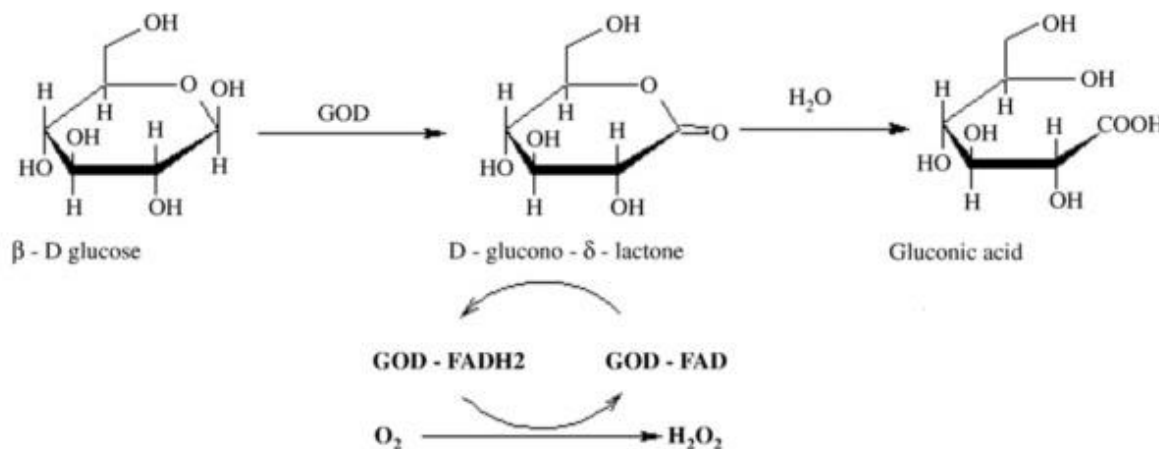
3.2.1 *Glicose oxidase (GOx)*

A GOx (β -D-glicose:oxigênio 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4.) é a enzima mais estudada e utilizada nos biossensores comerciais de glicose. Além desta aplicação, ainda é utilizada para melhorar a cor, o sabor e o tempo de prateleira de alguns alimentos e na remoção de oxigênio de sucos de frutas e bebidas enlatadas (BANKAR et al., 2009). Esta enzima apresenta como vantagens sua facilidade de obtenção e é resistente a uma maior faixa de pH, força iônica e temperatura, em comparação com outras enzimas, o que permite menores restrições durante o seu processamento e armazenamento (YOO; LEE, 2010).

A GOx é obtida pela purificação do extrato de diferentes fungos, principalmente do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, dos quais o *Aspergillus niger* é o mais utilizado. Esta enzima é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose para D-glucono- δ -lactona e H_2O_2 utilizando o oxigênio molecular como receptor de elétrons. Esta reação pode ser dividida em duas etapas, sendo uma de redução e outra de oxidação (Figura 14).

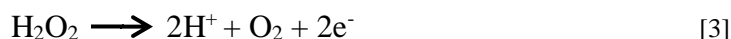
Na parte referente à redução, a GOx catalisa a oxidação da β -D-glicose a D-glucono- δ -lactona, a qual é hidrolisada de forma não enzimática à ácido glucônico. Neste processo, a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) é reduzida à $FADH_2$. A FAD é uma molécula orgânica complexa (coenzima), sendo a parte ativa da GOx, a qual é um componente comum nas reações biológicas de oxirredução.

Figura 14 - Representação da reação da GOx.



Fonte: Bankar *et al.* (2009).

Na parte oxidativa da reação, a GOx reduzida é reoxidada pelo oxigênio, gerando H₂O₂ (BANKAR *et al.*, 2009). Outra forma de visualizar estas reações está demonstrada nas Equações 1, 2 e 3 (HELLER; FELDMAN, 2008).

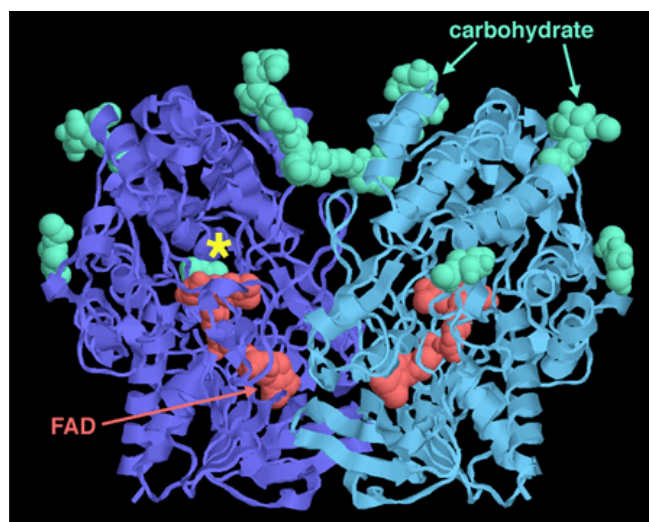


Observando as Equações 1, 2 e 3 verifica-se que a quantidade de elétrons liberada é proporcional à quantidade de H₂O₂, que por sua vez é proporcional à quantidade de glicose. Este é o princípio básico de funcionamento de um biossensor amperométrico enzimático de glicose, o qual será discutido na Seção 3.3.1 deste trabalho.

Segundo Bankar *et al.*, o peso molecular da GOx varia entre 130 a 175 kDa e a sua atividade enzimática pode ser inibida pela presença de Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, hidrazina, bissulfeto de sódio, dentre outros. Como a atividade enzimática é dependente do estado de ionização dos aminoácidos no sítio ativo da enzima, o pH do meio tem um papel importante. Para a GOx, o pH ótimo varia de 5,0 a 7,0. Já a temperatura para ótima atividade enzimática, no caso da GOx extraída do *Aspergillus niger*, fica entre 40 e 60°C.

A Figura 15 apresenta uma simulação computacional da estrutura da GOx com seu cofator, FAD, através de um modelo de fitas.

Figura 15 - Representação esquemática da GOx.



Fonte: Goodsell (2006).

3.2.2 Métodos de imobilização enzimática

Embora as enzimas apresentem inúmeras vantagens como catalisadores e também na quantificação e monitoramento de analitos, o custo da sua utilização na forma pura inviabiliza sua aplicação. Neste caso, uma possível solução é a imobilização da enzima em suportes insolúveis, permitindo a sua reutilização várias vezes. Além disto, com a imobilização há um aumento da estabilidade da proteína devido ao menor grau de liberdade, menor sensibilidade a interferentes e maior estabilidade quanto às mudanças de pH e elevação de temperatura (MARTINS, 2006).

A aplicação mais comum das enzimas e que exige a escolha correta do método de imobilização e de um suporte adequado é, sem dúvida, a de biossensores enzimáticos, cuja definição será discutida mais a frente. Neste caso, a enzima é imobilizada sobre um eletrodo e a imobilização deverá satisfazer alguns pré-requisitos (AHUJA *et al.*, 2007):

- Imobilização eficiente e estável da biomolécula sobre a superfície do transdutor;
- Retenção das propriedades biológicas;
- A enzima deverá ser compatível e inerte frente ao seu suporte;
- Acessibilidade ao substrato após a imobilização.

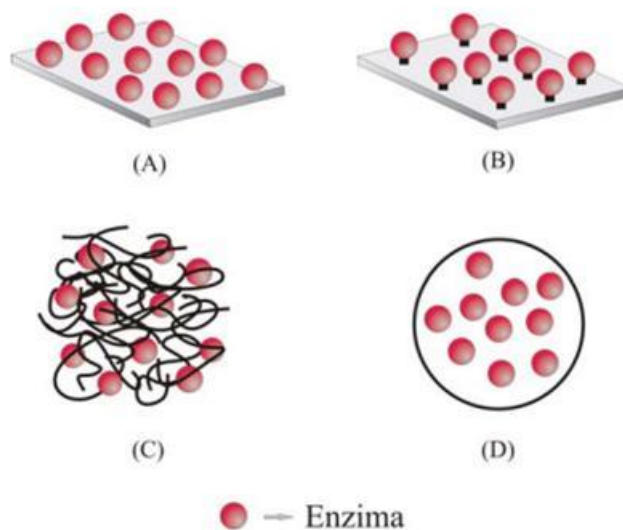
Na construção de um biossensor enzimático, o processo de imobilização é uma etapa crítica e tem como objetivo promover um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo

sua atividade e permitindo a difusão de substrato e produto para dentro e para fora da camada catalítica. A imobilização de enzimas sempre resulta em um decréscimo de sua atividade catalítica, porém prolonga o tempo de meia-vida deste biocomponente. A atividade do biocomponente imobilizado depende da área superficial, porosidade e caráter hidrofílico do suporte, assim como das condições de reação e método de imobilização (ANDRADE, 2006).

Nos últimos anos, inúmeros artigos tem sido publicados indicando os polímeros condutores como suportes apropriados para a imobilização de enzimas sobre eletrodos, visto que proporcionam um ambiente adequado e facilitam a interação da enzima com a superfície do eletrodo (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002).

Os principais métodos de imobilização enzimática são adsorção física, ligação covalente, *entrapment* e confinamento. A Figura 16 ilustra estes métodos de imobilização. A seleção do método mais adequado dependerá primeiramente do suporte a ser utilizado e também do uso pretendido e da aplicação (BICKERSTAFF, 1997).

Figura 16 - Ilustração esquemática dos métodos de imobilização enzimática sobre um suporte. (A) adsorção física, (B) ligação covalente, (C) *entrapment* e (D) confinamento.



Fonte: Martins (2006).

Dentre os métodos de imobilização apresentados na Figura 16, destaca-se o método por adsorção física, pois devido à sua simplicidade, é um dos mais utilizados. Neste método, a enzima é imobilizada em um suporte sólido, onde estão envolvidas ligações, em sua maioria de natureza eletrostática como ligações de hidrogênio, ligações iônicas e forças de van der Waals, as quais ocorrem entre os grupos superficiais do suporte e os grupos superficiais da enzima.

Estas forças são muito fracas, porém, em grande quantidade, permitem uma ligação razoável com o suporte (BICKERSTAFF, 1997; GERARD; MALHOTRA, 2005).

No entanto, a desvantagem da imobilização por adsorção física é que as forças de ligação entre a enzima e o suporte não podem ser facilmente controladas. Por serem forças de ligação fracas, dependendo das condições experimentais como pH, temperatura e solvente, a enzima pode ser desorvida do substrato para o meio, resultando em perda de reprodutibilidade e redução do tempo de vida útil do sensor. Além disto, através deste método é difícil controlar a quantidade de enzima efetivamente imobilizada no suporte (ALBAREDA-SIRVENT; MERKOÇI; ALEGRET, 2000; GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007).

Apesar das desvantagens, vários autores utilizam este método como forma de imobilização enzimática. Zhu *et al.* (2015) fizeram uma solução aquosa de GOx, PANi com nanotubos de TiO₂ e Nafion, a qual foi aplicada sobre o eletrodo. Tang, Li e Zeng (2015) também aplicaram uma alíquota de uma solução de GOx em glutaraldeído sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com PANi e nanoestruturas de TiO₂. Já Miao *et al.* (2015) aplicaram uma alíquota de 5 µL de uma solução de GOx 8 mg/mL sobre o eletrodo modificado com PANi, NPAu e poli(N-vinil-2-pirrolidona). Após a secagem, foi aplicada uma solução de Nafion 0,5% sobre o eletrodo. As soluções de Nafion e glutaraldeído auxiliam a imobilização da enzima sobre o eletrodo, formando uma estrutura reticulada. No entanto, a utilização destas soluções causa, frequentemente, desnaturação da enzima devido às ligações cruzadas e à toxicidade dos reagentes, principalmente o glutaraldeído (AHUJA *et al.*, 2007; LAI *et al.*, 2016).

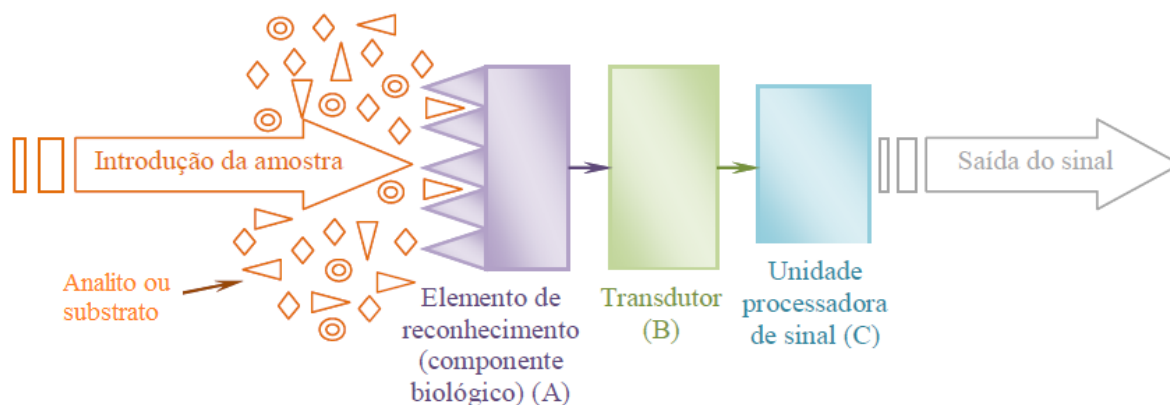
3.3 Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos autocontidos, geralmente de tamanho pequeno, que consistem de um componente sensor biológico que está em contato espacial direto com um elemento transdutor (também conhecido como detector ou eletrodo) (THÉVENOT *et al.*, 2001). Estes dispositivos utilizam a sensibilidade e seletividade das biomoléculas em relação ao seu correspondente analito, em conjunto com transdutores físico-químicos, os quais convertem o complexo sinal bioanalítico, gerado pela reação entre a biomolécula e o seu analito, em um sinal mais simples de ser detectado e mensurado (DHAND *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2016).

Um biossensor opera basicamente em três estágios: (i) reconhecimento do analito específico pelo componente biológico, (ii) transformação da reação bioquímica em uma reação

detectável pelo transdutor, e (iii) processamento do sinal do transdutor (SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016). A Figura 17 ilustra os principais componentes de um biossensor.

Figura 17 – Principais componentes de um biossensor.



Fonte: Calil; Silva (2011).

Baseado no tipo de elemento biológico de reconhecimento, o biossensor pode ser classificado em enzimático, imunossensor, genossensor, dentre outros, sendo o biossensor enzimático um dos mais estudados, devido à sua alta especificidade e sensibilidade (LAI *et al.*, 2016).

Referente ao transdutor, o biossensor pode ser classificado em eletroquímico, semicondutor, fotoelétrico, piezoelétrico, etc. Dentre estes, os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados devido a sua melhor sensibilidade, reprodutibilidade, fácil manutenção e operação, além do baixo custo em comparação a outros transdutores. Os transdutores eletroquímicos podem ser subdivididos em amperométricos, potenciométricos e condutométricos (LAI *et al.*, 2016; YOO; LEE, 2010). Em biossensores amperométricos os transdutores mais comuns são eletrodos de metal, eletrodos de carbono ou eletrodos modificados quimicamente (THÉVENOT *et al.*, 2001).

No caso de biossensores de glicose, os dispositivos mais comuns disponíveis comercialmente são os amperométricos enzimáticos (LAI *et al.*, 2016; YOO; LEE, 2010; ZAIDI; SHIN, 2016). Neste tipo de biossensor, é medida a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou analito, sob a aplicação de um potencial constante. A relação entre a quantidade de substrato e o sinal elétrico criado é linear e dada pela Equação 4:

$$I = nFA\nu_a \quad [4]$$

onde I é a corrente criada na reação, n o número de elétrons transferidos, A é a área do

eletrodo, F a constante de Faraday e v_a a taxa em que a reação ocorre, sendo esta proporcional à concentração do substrato (VIEIRA, 2006).

Nos biossensores amperométricos que utilizam enzimas como elemento biológico de reconhecimento, as enzimas mais utilizadas pertencem à classe das oxidorreduções, pois, como dito anteriormente, elas catalisam reações de oxirredução, transferência de hidrogênio, oxigênio e elétrons. Estas enzimas quase sempre liberam como subproduto o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é facilmente detectado amperometricamente pela liberação de elétrons, conforme a Equação 5:



A quantidade de elétrons liberada é proporcional à concentração de H_2O_2 , que por sua vez, é proporcional à concentração do analito. O funcionamento dos biossensores enzimáticos amperométricos será discutida na Seção 3.3.1.

O primeiro destes biossensores foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 e ficou conhecido como “eletrodo enzimático”. O conceito foi testado em uma experiência usando a enzima glicose oxidase imobilizada em uma membrana de diálise fixada na superfície de um eletrodo de oxigênio. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos nesta área até a produção do primeiro biossensor comercial, em 1975 (DHAND *et al.*, 2011; PATACAS, 2007).

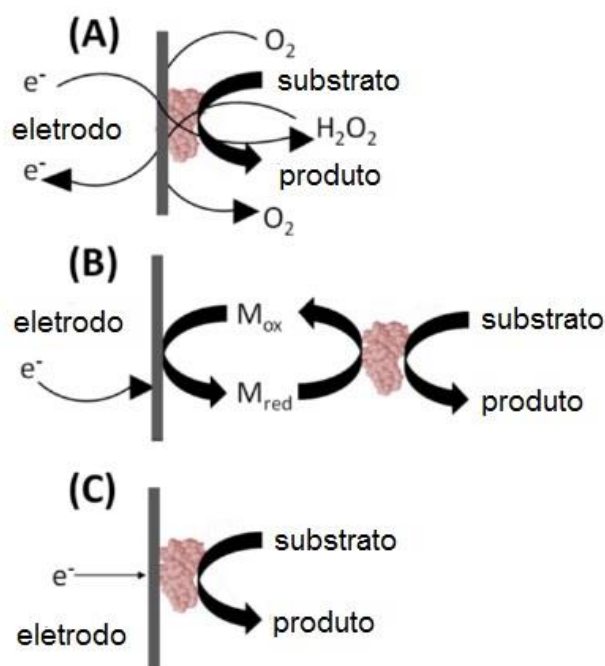
Estes dispositivos são utilizados, principalmente, em diagnóstico médico, segurança alimentar e em monitoramento ambiental, podendo ser sofisticados, robustos e de uso laboratorial; ou fáceis de usar, portáteis e de uso domiciliar (TURNER, 2013). As vantagens deste último tipo é a sua portabilidade, especificidade, rápido tempo de resposta e análise em tempo real (CHAVERO, 2013; CHOWDHURY; GANGOPADHYAY; DE, 2014; DHAND *et al.*, 2015).

A comunidade acadêmica tem se esforçado muito nos últimos anos para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico eficiente para a gestão da diabetes, já que esta é uma doença crônica e sem cura. Segundo Turner (2013), os dispositivos para medir glicose no sangue para gerenciamento da diabetes compreendem aproximadamente 85% do mercado mundial de biossensores. Os dispositivos mais comercialmente bem sucedidos para a monitoração da glicose são os biossensores amperométricos de glicose baseados em enzimas (LAI *et al.*, 2016).

3.3.1 Biossensor amperométrico enzimático de glicose

Há três formas gerais de detectar a glicose utilizando um biossensor enzimático amperométrico, resultando nos chamados biossensores de primeira, segunda e terceira geração. Como explicado na Seção 3.2.1, a FAD é a parte ativa da GOx, responsável pelas reações de detecção da glicose. Ao entrar em contato com a glicose, a FAD se reduz à FADH₂, a qual pode ser regenerada cataliticamente pelo oxigênio presente naturalmente no meio, pela reação com um mediador ou por oxidação direta pelo eletrodo. Os três tipos de biossensores estão ilustrados na Figura 18.

Figura 18 – Representação esquemática dos biossensores de primeira (A), segunda (B) e terceira geração (C).



Fonte: Putzbach; Ronkainen (2013).

Os biossensores de primeira geração (Figura 18A) dependem da presença do O₂ como co-substrato para a regeneração catalítica da FAD, ou seja, a GOx irá oxidar a glicose para gluconolactona, com a redução simultânea da FAD para FADH₂. Em seguida, a FADH₂ será regenerada para FAD usando o O₂ dissolvido no meio, produzindo H₂O₂. Por fim, a aplicação de um potencial elétrico irá induzir a oxidação do H₂O₂ na superfície do eletrodo, liberando dois elétrons, conforme ilustrado nas Equações 1, 2 e 3 (página 19) (PUTZBACH; RONKAINEN, 2013). Este era o princípio dos primeiros biossensores desenvolvidos.

Porém, este método de detecção apresenta algumas desvantagens. Em primeiro lugar, o

centro ativo redox da GOx está protegido por uma camada proteica, dificultando a difusão dos reagentes. Em segundo, o O₂ tem uma solubilidade limitada em meio aquoso, e portanto em altas concentrações de glicose poderia ocorrer uma deficiência de O₂ no meio. Por fim, no potencial de oxidação do H₂O₂ ocorre também a oxidação de diversos outros componentes químicos presentes em amostras biológicas (sangue, por exemplo) como ácido ascórbico, acetaminofeno e ácido úrico, o que acaba afetando e comprometendo o resultado do teste (HOMMA *et al.*, 2014; PUTZBACH; RONKAINEN, 2013; YOO; LEE, 2010).

Há duas maneiras de contornar estes problemas, as quais deram origem aos biossensores de segunda e terceira geração. Os biossensores de segunda geração (Figura 18B) são caracterizados pela incorporação de um mediador sintético que irá substituir o O₂ na regeneração da FAD. Nestes biossensores, o mediador oxidado regenera a FAD, através de sua própria redução. Após, o mediador reduzido é regenerado pela superfície do eletrodo, produzindo o sinal elétrico (PUTZBACH; RONKAINEN, 2013; YOO; LEE, 2010). Esta sequência de reações está descrita nas Equações 6, 7 e 8.



onde, M_(ox) e M_(red) são as formas oxidadas e reduzidas do mediador. Os mediadores mais utilizados são os derivados dos ferrocenos, o ferricianeto e compostos quinônicos, dentre outros. A vantagem de usar estes mediadores é que a detecção da glicose torna-se independente da presença do O₂ e é realizada pelo monitoramento da oxidação do mediador, em potenciais elétricos menores do que os biossensores de primeira geração, evitando a interferência de outros reagentes (DHAND *et al.*, 2015; WANG, 2008).

No entanto, os biossensores de segunda geração também apresentam desvantagens. Por serem moléculas pequenas e de fácil difusão, manter os mediadores próximos do centro redox da enzima é difícil. Além disso, podem se desorver da superfície do sensor com o tempo (TOGHILL; COMPTON, 2010). Vários dispositivos de auto monitoração de glicose são baseados no uso de mediadores ferroceno e ferricianeto (YOO; LEE, 2010).

Por fim, os biossensores de terceira geração (Figura 18C) envolvem a transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo, sem a necessidade de mediadores naturais ou sintéticos.

A grande dificuldade na fabricação destes biossensores é garantir o contato do centro redox da enzima com a superfície do eletrodo, já que, como citado anteriormente, este centro está protegido por uma camada proteica, isolante elétrica. No entanto, com o avanço dos materiais nanoestruturados, a área superficial do eletrodo pode ser aumentada, oferecendo uma superfície que imobilize e envolva a enzima, permitindo um contato mais próximo entre enzima/eletrodo (TOGHILL; COMPTON, 2010).

Putzbach e Ronkainen (2013) apresentam outra abordagem para os biossensores de terceira geração. Segundo os autores, estes biossensores envolvem a ligação da enzima ao eletrodo pela co-imobilização desta e do mediador diretamente na superfície do eletrodo ou dentro de uma matriz adjacente, como um filme de polímero condutor. Neste caso, o polímero condutor atuaria como um “caminho” para os elétrons, do centro redox da enzima até o eletrodo. No caso de um biossensor de terceira geração que não utiliza um mediador, a detecção da glicose será realizada no potencial redox da GOx, diretamente sobre o eletrodo.

Considerando os biossensores de glicose disponíveis comercialmente, os mesmos são basicamente constituídos de:

- Suporte polimérico sobre o qual são impressos os eletrodos responsáveis pelo transporte da corrente elétrica (contatos elétricos);
- Enzima responsável pela detecção da glicose;
- Mediador redox, que auxilia no transporte dos elétrons entre o centro ativo da enzima e a superfície do eletrodo.

Em relação aos mediadores redox, o mais utilizado nos dispositivos comerciais é o ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$). Conforme discutido sobre os biossensores de segunda geração, a presença de um mediador é importante para auxiliar no transporte de elétrons. Os centros ativos redox das enzimas são protegidos por grupos proteicos, que são isolantes. Desta forma, a utilização de pequenas moléculas mediadoras, que conseguem penetrar na enzima e chegar ao centro redox, auxilia e acelera o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo (MALHOTRA; CHAUBEY; SINGH, 2006).

Comercialmente, os biossensores ou tiras teste de glicose, como também são chamados, são vendidos separadamente dos dispositivos eletrônicos para detecção. Em uma rápida pesquisa de preços nas farmácias, observa-se que o valor das tiras varia de R\$1,69 a R\$2,39/tira teste, dependendo da quantidade a ser comprada, da marca do fabricante e do fornecedor.

Mesmo considerando o valor mais baixo, o preço ainda é muito elevado para um paciente que precisa utilizar várias tiras por dia. A Figura 19 mostra algumas tiras teste de glicose de marcas bastante difundidas no mercado nacional.

Figura 19 – Exemplos de biossensores de glicose disponíveis no mercado.



Fonte: Google Imagens.

Segundo Turner (2013), aproximadamente metade dos eletrodos (tiras teste) hoje em dia utilizados nos dispositivos portáteis para medição de glicose são fabricados pela tecnologia de *screen printing* (serigrafia), utilizando-se tintas poliméricas curáveis, seguido de etapas posteriores de impressão, *drop-on-delivery* e/ou laminação, onde são aplicadas a enzima e demais reagentes, resultando em eletrodos como aqueles apresentados na Figura 19.

Geralmente estes dispositivos comerciais possuem uma faixa de leitura que varia de 10 a 600 mg/dL de glicose (0,5 a 33 mM), sendo que para pessoas sem diabetes o nível de glicose varia de 70 a 120 mg/dL (4 a 7 mM) (SANTOS, 2012). Todos são baseados em medidas eletroquímicas e necessitam de pequenos volumes de sangue para realizar o teste (volumes na ordem de microlitro).

3.3.2 Parâmetros e desempenho

Existem diversos parâmetros de caracterização que devem ser estudados e avaliados para a validação do funcionamento de um biossensor. Os principais são a sensibilidade, a seletividade, o limite de detecção (LOD), repetibilidade e reprodutibilidade destes dispositivos. Estes parâmetros e suas definições estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de caracterização de biossensores e suas definições.

Parâmetro	Definição
Sensibilidade	Inclinação da curva de calibração analítica. Um método analítico é sensível quando uma pequena alteração na concentração do analito causa uma grande alteração na resposta.
Seletividade	Relação entre as inclinações das linhas de calibração do analito de interesse e uma interferência particular. Um método é seletivo quando a resposta do analito pode ser diferenciada de qualquer outra resposta.
LOD	Concentração ou a quantidade derivada do menor sinal que pode ser detectado com grau aceitável de certeza para um determinado procedimento analítico.
Repetibilidade	A proximidade do acordo entre medidas sucessivas do mesmo parâmetro, que foram realizadas nas mesmas condições relacionadas com operadores, aparelhos, laboratórios e/ou intervalos de análise de tempo.
Reprodutibilidade	Proximidade do acordo entre medidas sucessivas do mesmo parâmetro, realizadas em diferentes condições em termos de operadores, aparelhos, laboratórios e/ou intervalos de análise de tempo.
Razão sinal-ruído (S/N)	Relação do sinal analítico útil com o ruído do sinal de fundo, que é identificado como uma medida das flutuações estatísticas no sinal do branco da amostra.

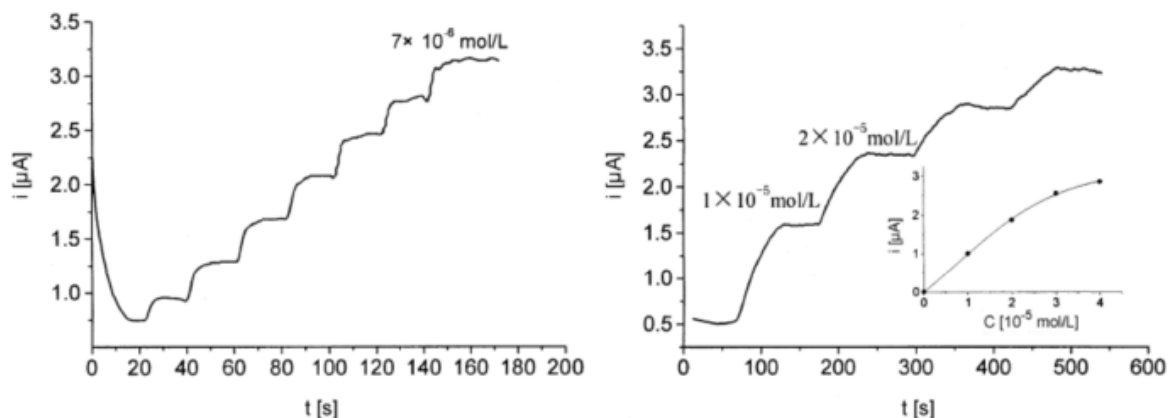
Fonte: Justino; Duarte; Rocha-Santos (2016).

A determinação dos parâmetros listados na Tabela 1 é feita a partir da curva de calibração do biossensor, a qual é obtida, em geral, pela adição de soluções padrão do analito e pelo traçado das respostas de estado estacionário, possivelmente corrigidas para um sinal do branco (frequentemente designado de fundo), em comparação com a concentração do analito. O método eletroquímico mais utilizado para traçar estas curvas é a cronoamperometria.

A cronoamperometria é uma técnica largamente utilizada para avaliação da capacidade de reação de biossensores. Consiste na imersão do biossensor em um eletrólito e, sob agitação e aplicação de um potencial constante, são feitas adições de uma solução padrão do analito. A corrente inicial medida no eletrólito é muito baixa e resulta de pequenas quantidades de impureza ou espécies adsorvidas na superfície do sensor (sinal do branco ou fundo). A cada adição do analito, corresponde um aumento na corrente, que é proporcional à concentração do analito adicionado (KOZAN, 2007). A Figura 20 mostra exemplos de curvas cronoamperométricas, onde se observa a adição do analito e o estado estacionário que se forma

após esta adição.

Figura 20 – Curvas de cronoamperometria para a detecção de colesterol, em tampão fosfato (pH 6,8), mediante a aplicação de um potencial de -0,05 V (vs. Ag/AgCl).



Fonte: Grieshaber *et al.* (2008).

A sensibilidade do biossensor é obtida do gráfico de corrente *versus* concentração do analito obtido pelo ensaio de cronoamperometria, o qual apresenta uma relação linear. A inclinação da reta deste gráfico representa a sensibilidade, conforme explicado na Tabela 1. Outra característica importante é a faixa linear de detecção, ou seja, faixa na qual há uma relação linear entre a concentração de analito e a corrente elétrica gerada. Fora desta faixa linear, há um decréscimo de sensibilidade do biossensor (THÉVENOT *et al.*, 2001).

Em relação à seletividade, um biossensor com alta seletividade deve responder somente a um analito, mesmo na presença de outras espécies interferentes (SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016). A análise de interferentes é muito importante, já que podem causar uma falsa leitura de glicose. Um interferente é uma espécie que é eletroativa no potencial de operação do biossensor amperométrico. Alguns interferentes que devem ser avaliados são o ácido salicílico, a dopamina, o ibuprofeno, o ácido ascórbico, o colesterol, o ácido úrico, dentre outros. O ácido ascórbico é um dos interferentes mais comuns que afeta a precisão dos biossensores de glicose (YOO; LEE, 2010).

Outro fator determinado em biossensores enzimáticos é a constante cinética de Michaelis-Menten (K_m), a qual determina a afinidade entre a enzima e o seu substrato, sendo uma estimativa da constante de dissociação aparente, indicando a velocidade na qual o complexo enzima-substrato se dissocia em substrato-produto. Assim, um valor maior de K_m mostra uma menor probabilidade de formação de produto por evento de ligação, ou seja, um maior valor de

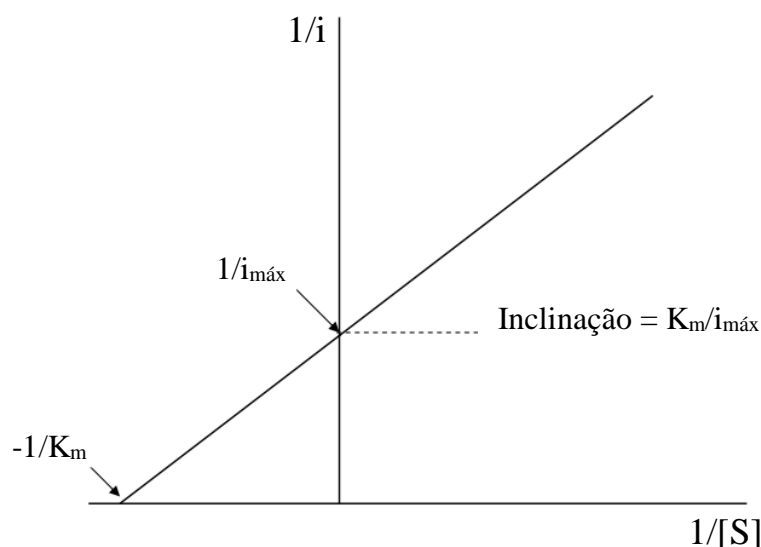
K_m indica menor afinidade da enzima pelo substrato (MOHAMMADI *et al.*, 2009).

Ainda segundo Mohammadi *et al.* (2009) e Feng *et al.* (2015), uma das formas de se determinar o K_m é pela equação de Lineweaver-Burke (Equação 9):

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{i_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{i_{m\acute{a}x} \cdot [S]} \quad [9]$$

onde i é a corrente estacionária após a adição do substrato, $i_{m\acute{a}x}$ é a corrente máxima quando o meio está saturado e $[S]$ é a concentração do substrato em análise. Desta forma, fazendo o gráfico de $1/[S]$ *versus* $1/i$ é possível determinar facilmente o valor de K_m , conforme a Figura 21.

Figura 21 - Linearização da equação de Michaelis-Menten segundo Lineweaver-Burk.



Fonte: Adaptado pela autora de Vieira (2006).

Além dos parâmetros já discutidos e apresentados na Tabela 1 e do K_m , também é comum se determinar o tempo de resposta do biossensor, o qual também é determinado pelo ensaio de cronoamperometria. É definido como o tempo necessário para que se atinja 90% da resposta de corrente no estado estacionário. Este parâmetro depende da espessura e permeabilidade do biossensor, bem como da agitação do sistema e da atividade biológica da enzima ou molécula de reconhecimento (THÉVENOT *et al.*, 2001).

Por fim, ainda segundo Thévenot (2001), é comum avaliar o tempo de vida de um biossensor, o qual geralmente é limitado por alguns dias ou semanas, dependendo das condições

de armazenamento, como temperatura, umidade, atmosfera e etc.

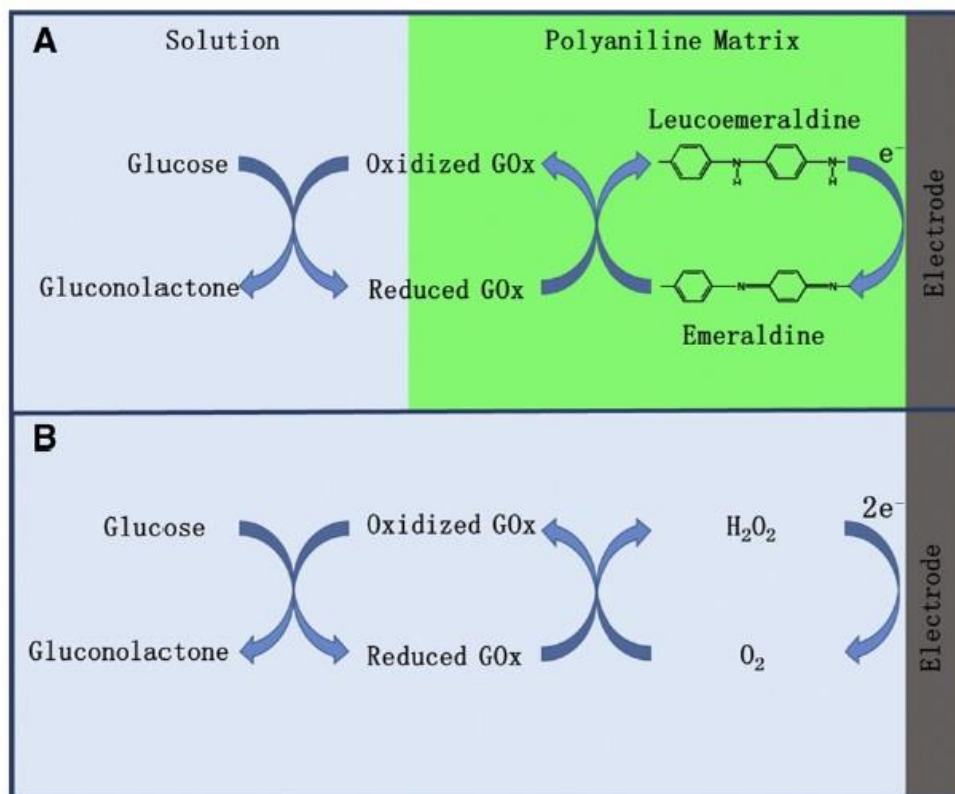
3.3.3 A PANi em biossensores de glicose

A utilização de PICs em biossensores é bem extensa e iniciou como um esforço para encontrar um modificador da superfície dos eletrodos ou um agente de imobilização enzimática, que fosse capaz de reter e evitar a dessorção da enzima, mantendo sua bioatividade. Devido às suas características, os PICs são capazes de atuar como uma matriz adequada para imobilização de biomoléculas, e também facilitam o transporte de elétrons nas reações redox enzimáticas. Novamente, dentro desta classe de polímeros, a PANi se destaca (LAI *et al.*, 2016).

Segundo Dhand *et al.* (2015), a PANi é uma plataforma condutora muito eficiente para sensores e biossensores devido ao seu comportamento redox e à sua habilidade de mediar o transporte de elétrons entre o local da reação e a superfície do eletrodo. A presença de dois pares redox (ver Seção 4.3.6) ajuda ainda mais a PANi a facilitar estes processos de transferência de cargas, tornando-a ideal para o desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos. Além disto, a presença de vários grupamentos NH₂ ao longo da cadeia polimérica da PANi oferece perspectivas diversas de imobilização enzimática. Devido à sua estrutura positivamente carregada, as biomoléculas (que geralmente tem carga negativa) podem ser imobilizadas por ligação covalente, adsorção física e confinamento.

Portanto, a PANi pode ser utilizada como plataforma para imobilização de biomoléculas devido à sua favorável habilidade de armazenamento, habilidade de formação de filmes e biocompatibilidade, além de atuar como mediador de elétrons em reações redox ou enzimáticas, devido à sua excelente condutividade e inerente eletroatividade (LAI *et al.*, 2016). O princípio de detecção de glicose em biossensores baseados em PANi pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22 – Mecanismos de detecção de glicose usando a PANi como plataforma de imobilização: A) PANi como mediador e B) oxidação do H₂O₂.



Fonte: Lai *et al.* (2016).

Numa faixa apropriada de potencial positivo, a PANi pode atuar como um mediador da transferência de elétrons com seus dois pares redox, levando à transferência de carga entre a GOx e a superfície do eletrodo (Figura 22A) (DHAND *et al.*, 2010, 2011; LAI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2011). No entanto, na maioria dos casos é mais simples medir o peróxido de hidrogênio produzido pela reação enzimática da GOx com a glicose. Nestas situações, a PANi é usada apenas como uma matriz imobilizadora para a GOx e a detecção é realizada pela aplicação de um potencial positivo (geralmente em torno de +0,6 V vs. Ag/AgCl) ao eletrodo modificado com PANi, gerando uma corrente anódica devido à oxidação do peróxido de hidrogênio (Figura 22B). A resposta de corrente é proporcional à concentração de glicose (FENG *et al.*, 2015; LAI *et al.*, 2016).

No entanto, de maneira geral, o papel da PANi e dos PICs nos biossensores não está bem definido. Há controvérsias quanto a sua atuação como mediador da reação enzimática, já que a cadeia do polímero não é capaz de penetrar perto o suficiente do centro redox da enzima para permitir a mediação (DAVIS; HUW VAUGHAN; CARDOSI, 1995).

A PANi vem sendo utilizada na fabricação de biossensores de glicose há quase 30 anos. Inicialmente, este polímero e os polímeros condutores em geral eram eletropolimerizados na presença da GOx, tendo como principal função a imobilização da enzima por *entrapment* na estrutura polimérica (DAVIS; HUW VAUGHAN; CARDOSI, 1995). Segundo Lai *et al.* (2016), o primeiro artigo utilizando a PANi como matriz para a construção de um biossensor foi publicado por Shinohara, Chiba e Aizawa (1988), e baseava-se na detecção de glicose pela diminuição da concentração de oxigênio durante a reação enzimática.

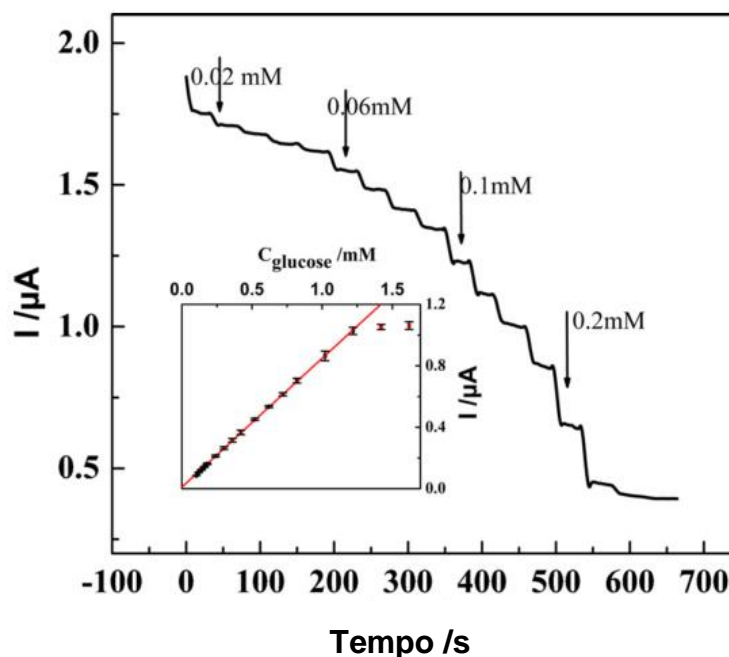
Nos anos seguintes, vários artigos foram sendo publicados utilizando a PANi em biossensores de glicose, cujo funcionamento baseava-se na detecção do H₂O₂, pela aplicação de um potencial em torno de +0,6 V (COOPER; HALL, 1992; RAMANATHAN; ANNAPOORNI; MALHOTRA, 1994; SHAOLIN; HUAIGUO; QIAN, 1991). No entanto, estes biossensores apresentavam baixa seletividade devido ao alto potencial de detecção aplicado.

Com o advento dos biossensores de segunda geração e o uso de mediadores para diminuir o potencial aplicado na detecção da glicose, várias pesquisas foram realizadas utilizando a PANi em combinação com estes mediadores artificiais. Zhang, Bao e Liu (1994) usaram benzoquinona e ácido ferroceno monocarboxílico como mediador, permitindo a detecção de glicose em +0,4 V (*vs.* Ag/AgCl). Já Losada e Armada (1997) utilizaram cloranil como mediador e detectaram a glicose em um potencial de +0,25 V (*vs.* ECS).

Nos últimos anos, com a fácil síntese da PANi com morfologia em escala nanométrica e com intensas pesquisas na formação de nanocompósitos com outros materiais, como nanopartículas de metais e óxidos metálicos, nanotubos de carbono, grafeno e etc., os mais recentes artigos científicos de PANi em biossensores de glicose se baseiam nestes materiais.

Xu *et al.* (2014) produziram um nanocompósito de PANi, grafeno e NPAu, o qual foi misturado com uma solução de GOx e quitosana e aplicado sobre um eletrodo de carbono vítreo para a produção de um biossensor de terceira geração. A Figura 23 mostra a resposta amperométrica do biossensor obtido, que apresentou uma relação linear entre corrente e concentração de glicose na faixa de 4,0 μM a 1,12 mM, LOD de 0,60 μM e K_m de 0,60 mM.

Figura 23 - Resposta amperométrica de um biossensor de glicose composto de PANi, grafeno e NPAu, após sucessivas adições de glicose em uma solução de PBS (0,1 M, pH 7). Potencial aplicado de -0,55 V.

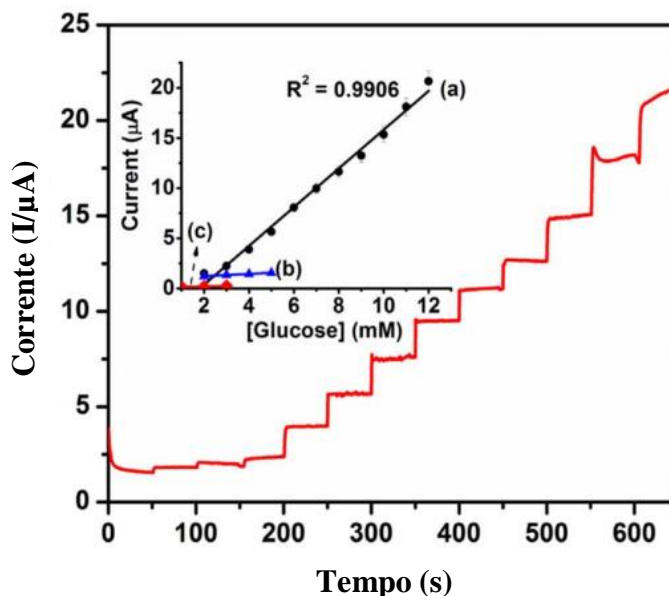


Fonte: Xu *et al.*, 2014.

Miao *et al.* (2015) sintetizaram eletroquimicamente um nanocompósito de PANi, polivinilpirrolidona e NPAu sobre o qual aplicaram uma solução de GOx com concentração de 8 mg/mL. Os ensaios de cronoamperometria foram realizados a um potencial de -0,45 V, considerando o biossensor como de terceira geração. Este biossensor apresentou uma faixa de detecção linear de 0,05 a 2,25 mM, com LOD de $1,0 \times 10^{-5}$ M e sensibilidade de $9,62 \mu\text{A} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Um hidrogel condutor de poliácido acrílico (PAA) com óxido de grafeno reduzido (rGO), PANi vinil substituída (PANi-VS) e ftalocianina de lutécio (LuPc₂), usada como mediador redox, foi produzido por Al-Sagur *et al.* (2016) e utilizado como uma matriz tridimensional para a imobilização da GOx. O hidrogel foi sintetizado quimicamente e aplicado sobre a superfície de um eletrodo impresso de carbono, seguido da aplicação do mediador redox (alíquota de 2 μL) e da GOx (2 μL , 10 mg/mL). O biossensor produzido foi testado para a detecção de glicose por cronoamperometria, aplicando-se o potencial de +0,3 V e sob sucessivas adições de alíquotas de 1 mM de glicose. A resposta pode ser visualizada na Figura 24.

Figura 24 – Cronoamperometria do hidrogel de PAA/rGO/PAni-VS/LuPc₂/GOx para sucessivas adições de glicose 1 mM em PBS 0,1 M (pH 7,0). O gráfico inserido na figura corresponde à curva de calibração da [glicose] versus corrente elétrica.

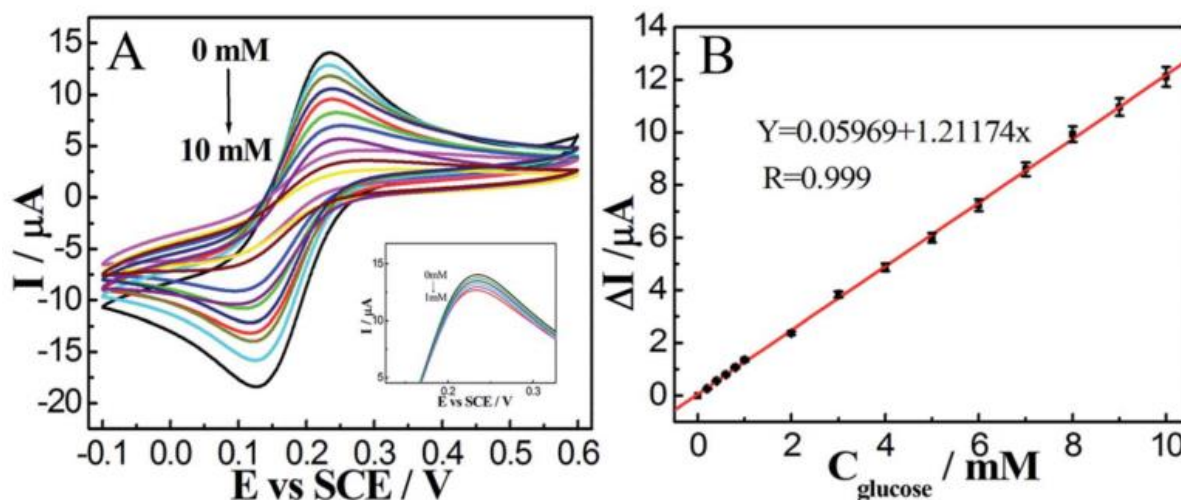


Fonte: Al-Sagur *et al.* (2016).

Este biossensor apresentou uma faixa linear de detecção de 2 a 12 mM, com sensibilidade de $15,31 \mu\text{A}\cdot\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, LOD de $25 \mu\text{M}$, tempo de resposta de 1 s e possibilidade de armazenamento de 3 meses (AL-SAGUR *et al.*, 2016).

Gong *et al.* (2016) desenvolveram um biossensor de glicose baseado em 4-amino tiofenol/nanopartículas de Au/glicose oxidase (GOx)–horseradish peroxidase (HRP)/ácido 6-mercaptop-1-hexanol-11-mercaptoundecanóico sobre um eletrodo de Au. Neste caso, a PANi foi sintetizada enzimaticamente pela HRP e pelo H₂O₂ que foi produzido pela redução do O₂, acompanhada pela oxidação da glicose em ácido glucônico *via* GOx. Com o aumento da glicose, mais moléculas de H₂O₂ são produzidas, resultando em um crescente aumento de moléculas de PANi formadas na superfície do eletrodo modificado. Esta formação crescente de PANi resulta em um decréscimo no pico de corrente do Fe(CN)₆^{3-/4-}, já que a PANi bloqueia a transferência do mediador em direção à superfície do eletrodo. Baseado neste decréscimo do pico de corrente do Fe(CN)₆^{3-/4-} que a concentração de glicose pôde ser determinada. Os ensaios foram realizados em uma célula com configuração de três eletrodos e com o eletrólito contendo o mediador, através de voltametria cíclica. A Figura 25 mostra as curvas obtidas e a respectiva curva de calibração.

Figura 25 – (A) Voltametrias cíclicas do biossensor de glicose produzido com 4-amino tiofenol/nanopartículas de Au/glicose oxidase (GOx)–horseradish peroxidase (HRP)/ácido 6-mercaptop-1-hexanol-11-mercaptoundecanóico em uma solução de PBS 0,2 M contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$, (B) Gráfico ΔI versus concentração de glicose.



Fonte: Gong *et al.* (2016).

O biossensor resultante apresentou uma faixa de detecção de 16,5 μM a 10 mM, com uma sensibilidade de 41,78 $\mu A \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-2}$ (GONG *et al.*, 2016).

Observando estes e demais artigos publicados nos dois últimos anos (2015 e 2016) sobre biossensores de glicose utilizando PANi, observa-se que a maioria se baseia na utilização de múltiplos materiais, para combinação e complementação de suas propriedades individuais. No entanto, quanto mais materiais utilizados, maior a complexidade e mais etapas são necessárias para a produção do biossensor, gerando dificuldades para sua produção comercial.

Outro problema observado por Lai *et al.* (2016) e Zaidi e Shin (2016) é a estreita faixa linear de detecção destes biossensores, a qual na maioria das vezes não compreende toda a faixa de glicose necessária para pacientes diabéticos (de 2 a 25 mM, no mínimo).

Em relação à PANi, há diversos fatores que dificultam a sua efetiva aplicação em biossensores comerciais de glicose. Iniciando pelo processo de síntese, a PANi apresenta problemas para ser processada. A anilina é um monômero carcinogênico, precisa ser destilada antes do uso, além de ser insolúvel na maioria dos solventes comuns. Outro ponto negativo é a necessidade de meio ácido para formar a PANi em meio aquoso na sua forma mais condutora, o que dificulta a imobilização da enzima durante a síntese, em uma só etapa, sendo necessário aplicá-la em uma etapa subsequente, o que adiciona complexidade à fabricação do sensor (MORRIN *et al.*, 2005).

Outros fatores limitantes da PANi são o efeito do envelhecimento, a instabilidade óptica e eletroquímica e a falta de métodos de deposição padrão e otimizados (DHAND et al., 2011, 2015). O envelhecimento da PANi envolve a degradação lenta e espontânea da sua estrutura química, resultando em quebra de cadeias, o que diminui o comprimento de conjugação do polímero, resultando em menor mobilidade e condutividade. A estabilidade química, térmica e eletroquímica da PANi pode ser aumentada, como já discutido anteriormente, com processos de dopagem com íons metálicos, incorporação de partículas metálicas ou de óxidos metálicos, nanomateriais de carbono e surfactantes iônicos.

Portanto, para a efetiva comercialização dos dispositivos seria necessário o desenvolvimento destes nanocompósitos de engenharia (DHAND *et al.*, 2015; SEN; MISHRA; SHIMPI, 2016), adicionando complexidade ao seu processo de produção. É necessário também pesquisar a melhor relação custo-benefício levando em consideração materiais utilizados na fabricação, viabilidade de fabricação em larga escala e custo do produto final.

Desta forma, neste trabalho foi estudado o desenvolvimento de dois biossensores de glicose utilizando polianilinas sintetizadas quimicamente por metodologias simples e efetivas, tendo como objetivo principal a produção de biossensores em poucas etapas e que sejam eficientes em uma ampla faixa linear de detecção, possibilitando, futuramente, sua aplicação comercial.

4 EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

Os reagentes utilizados nas sínteses e caracterizações estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Lista de reagentes utilizados neste trabalho.

Reagente – Sigla ou fórmula	Massa molar (g/mol)	Teor (%)	Procedência
2-hidroxiethyl metacrilato (2-HEMA)	130,14	-	Sigma
Ácido L-ascórbico	176,12	99	Sigma
Ácido clorídrico – HCl	36,46	37	Nuclear
Ácido cloroáurico - $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	393,83	99,99	Sigma
Ácido dodecilbenzeno sulfônico (DBSA)	326,49	65	King Ind.
Ácido úrico	168,11	>99	Sigma
Anilina	93,13	99	Synth
Cloreto de potássio – KCl	74,55	-	Neon
Cloreto de sódio – NaCl	58,44	-	Neon
D-Glicose	180,16	99,5	Vetec
Ferricianeto de potássio – $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	329,26	-	Sigma
Fosfato de sódio bibásico – Na_2HPO_4	141,98	-	Neon
Fosfato de sódio monobásico – NaH_2PO_4	138,01	-	Neon
Fosfato de potássio monobásico - KH_2PO_4	136,09	-	Neon
Glicose oxidase from <i>Aspergillus niger</i> Tipo VII (GOx)	149,8 U/mg	-	Sigma
Persulfato de Amônio (PSA)	228,20	-	Synth
Poli (óxido de etileno) (PEO)	600.000	-	Sigma
Tetracloroeto de Carbono (CCl_4)	153,82	-	Cromoline

Todos os reagentes foram usados como recebidos, com exceção da anilina, a qual foi previamente destilada e armazenada sob refrigeração e proteção da luz.

A solução de glicose foi feita em tampão fosfato salino (PBS) na concentração de 0,1 M e pH 7,4, e deixada mutarrotar por 24 h, armazenada sob refrigeração. O PBS foi feito com os seguintes sais: cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico.

Também foram utilizados tampões de fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 e 7, os quais

foram produzidos a partir de soluções de fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico.

Membranas de diálise foram utilizadas para a purificação dos polímeros ao final das sínteses (Fisherbrand, *Molecular weight cut-off* de 12.000 – 14.000 kDa).

4.2 Síntese das polianilinas

Diferentes sínteses foram testadas, a fim de encontrar a melhor combinação entre propriedades mecânicas e elétricas. Como já discutido, a PANi tem difícil processabilidade, o que dificulta a sua aplicação sobre a superfície do sensor. Portanto, o principal desafio deste trabalho foi sintetizar a PANi com as seguintes propriedades:

- Dispersa ou em solução em meio aquoso: não deverá ocorrer a precipitação imediata do polímero, pois dificultaria e prejudicaria sua aplicação sobre o eletrodo;
- Meio levemente viscoso: essa característica é necessária, pois o intuito é aplicar o polímero por *casting*;
- Formação de filme: necessário para garantir a cobertura total do eletrodo de trabalho e uma melhor aderência à superfície;
- Condutora, na forma sal de esmeraldina: o estado de oxidação e dopagem da polianilina são importantes, pois ela atuará como facilitadora do transporte elétrico, conduzindo a corrente elétrica produzida na reação enzimática;
- Nanoestruturada: a utilização de nanoestruturas em biossensores aumenta significativamente a sensibilidade e diminui o tempo de resposta, já que a área de contato polímero/enzima é maior.

A combinação de todas estas propriedades é bastante difícil, já que a PANi nanoestruturada na sua forma mais condutora é obtida em meio ácido e aquoso e portanto, de baixa viscosidade. Ao adicionar um polímero convencional para aumentar a viscosidade, perde-se em condutividade elétrica. Além disso, a PANi sintetizada quimicamente é, na maioria das vezes, obtida na forma de pó, o qual precipita logo após o término da síntese. Desta forma, é necessário encontrar uma metodologia de síntese que permita a combinação de propriedades para que seja possível atingir os objetivos deste trabalho.

A fim de encontrar esta combinação ótima de propriedades, diferentes sínteses de PANi

foram previamente testadas e caracterizadas. Algumas destas sínteses estão listadas na Tabela 3, com as devidas observações e comentários, esclarecendo porque a síntese atingiu ou não as propriedades desejadas para prosseguimento do trabalho.

Tabela 3 - Diferentes sínteses de PANi realizadas.

Síntese	Referência	Comentários
PAni-DBSA em dispersão	(MOULTON et al., 2004)	Realizada com relações de DBSA para anilina de 0,65, 0,85 e 1,00. Todas resultaram em nanofibras de PANi sal de esmeraldina. A viscosidade do meio é alta ao final da síntese, porém diminui acentuadamente depois da purificação por diálise.
PAni-PHEMA	(MONÇÃO, 1997)	Síntese do hidrogel poli(2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) e posterior mistura com a PANi-DBSA. Formou filme irregular, com aglomerados de PANi.
PAni-PEO	(LI; JING, 2009)	Realizada variando-se a concentração de PEO adicionada em 1, 5 e 10 g/L. Obtenção de nanofibras de PANi na forma sal esmeraldina verde e com adequada viscosidade.
PAni-PEO-NPAu	(GANGOPADHYAY; CHOWDHURY; DE, 2012)	A síntese foi alterada pela adição do PEO no meio, nas concentrações de 1, 5 e 10 g/L. Obtenção de nanopartículas de PANi na forma sal de esmeraldina verde e com adequada viscosidade.

A partir das caracterizações realizadas nas diferentes sínteses, foi decidido prosseguir o trabalho utilizando apenas duas amostras: PANi-PEO e PANi-PEO-NPAu, ambas sintetizadas com 5 g/L de PEO. Estas sínteses serão descritas detalhadamente na sequência.

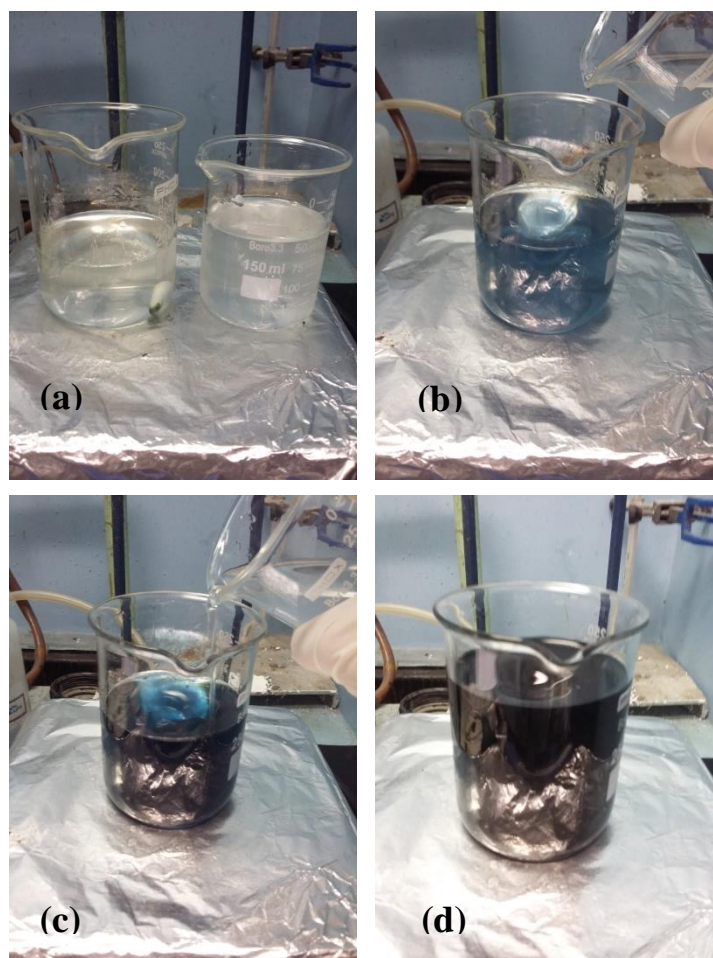
4.2.1 Síntese da PANi-PEO

Esta síntese foi baseada no método proposto por Li e Jing (2009), com algumas alterações. Uma quantidade pré-determinada de PEO foi dissolvida em 50 mL de HCl 1 M, sob intensa agitação para homogeneizar o meio. Em seguida, 50 mL de solução de anilina 0,5 M em HCl 1 M foi adicionada à solução de PEO, obtendo-se então, 100 mL de uma mistura homogênea de anilina e PEO. Por fim, 100 mL de uma solução de PEO e persulfato de amônio (PSA) 0,5 M em HCl 1 M foi adicionada à solução anterior, seguido por agitação até completa mistura dos reagentes. A reação segue sem agitação por 4 h. A Figura 26 ilustra as etapas desta síntese química.

A razão molar entre monômero e oxidante foi mantida em 1:1 e igual a 0,5 M. Já a concentração de PEO na síntese foi de 5 g/L.

Finalizadas as 4 h de síntese, o polímero foi purificado através de diálise, por 24 h em água deionizada. A diálise permite a retirada de excesso de reagentes como HCl e PSA, e a retirada de oligômeros, mantendo o polímero disperso no meio de síntese.

Figura 26 - Etapas da síntese da PAni-PEO. (a) Soluções de PEO com anilina e PSA, em HCl 1 M, (b) e (c) adição de uma solução sobre a outra, sob agitação, (d) adição completa das soluções.



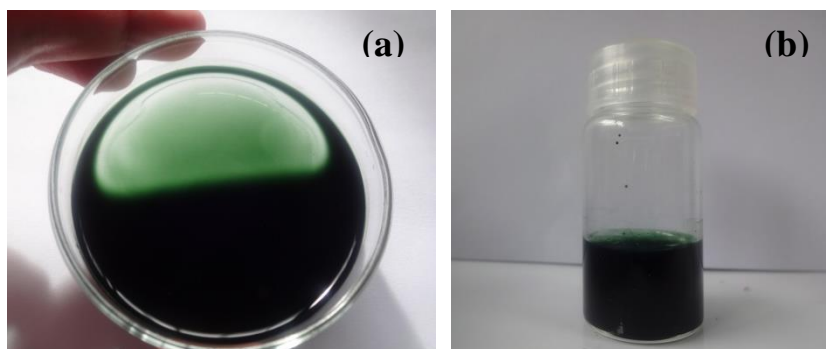
Fonte: Da autora.

A Figura 27 (a) mostra o polímero em uma placa de Petry, onde é possível observar que a PAni está bem dispersa no meio, sem a presença de aglomerados ou grânulos. Na Figura 27 (b) observa-se o polímero em dispersão e sem precipitar após 2 dias.

Ao final da síntese foi determinado o teor de não voláteis da dispersão polimérica, de

acordo com a NBR 7340 (ABNT, 1982). Esta norma foi escolhida por ser a única que determina este índice e, apesar de ser direcionada a tintas e vernizes, é possível ser aplicada para a dispersão polimérica produzida neste trabalho. Após este ensaio, verificou-se um teor de não voláteis de 3,7%.

Figura 27 - PANi-PEO após diálise (a) na placa de Petry, (b) armazenada há 2 dias sem precipitar.



Fonte: Da autora.

4.2.2 Síntese da PANi-PEO-NPAu

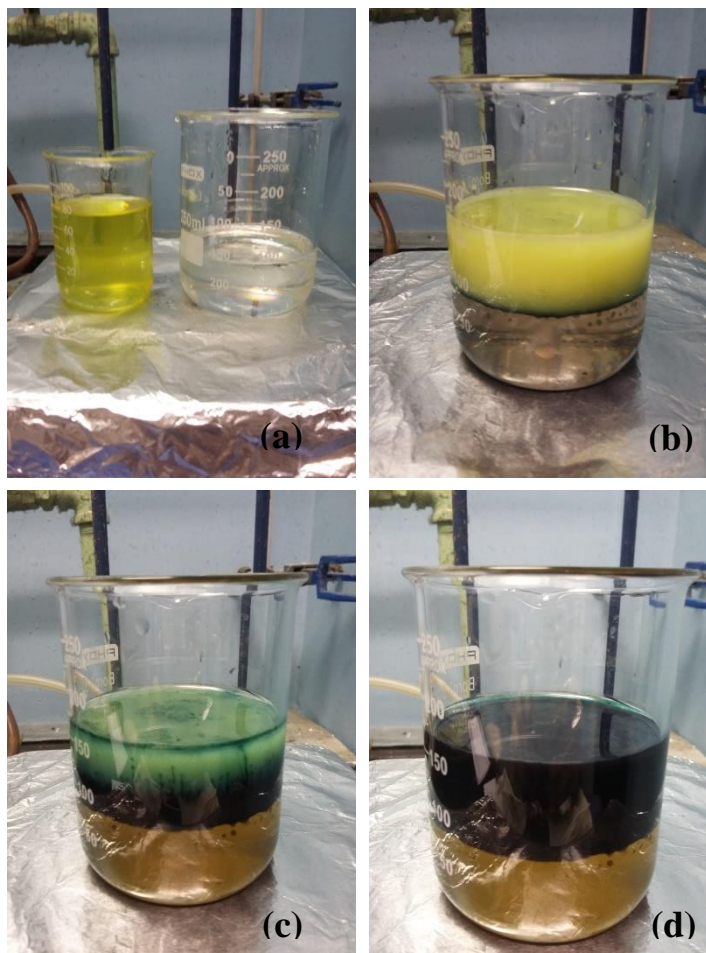
A síntese foi baseada no método proposto por Gangopadhyay, Chowdhury e De (2012), com algumas modificações. Estes autores realizaram uma síntese química interfacial, baseados nos estudos de Huang e Kaner (2004a, 2004b) para obtenção de nanocompósitos de PANi com NPAu, utilizando meio aquoso e meio orgânico. Esta síntese segue a rota (i), descrita na Seção 3.1.1 deste trabalho (página 10), onde o agente oxidante é o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, o qual, ao oxidar a anilina, acaba se reduzindo a Au^0 , que deve precipitar na forma de nanopartículas.

Neste trabalho foi utilizado anilina 0,5 M, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,003 M e 5 g/L de PEO. Inicialmente foram feitas duas soluções: anilina em CCl_4 (meio orgânico) e $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e PEO em HCl 1 M (meio ácido aquoso). Em seguida as duas soluções são misturadas e levemente agitadas com auxílio de agitador magnético. Após homogeneização, o meio é deixado em repouso para separação das fases, sendo que a fase inferior é a orgânica e a superior a aquosa, para a qual a PANi que se forma na interface começa a difundir. A Figura 28 ilustra as etapas desta síntese.

Após 4 h de síntese, foi retirada com o auxílio de uma pipeta a fase superior da síntese, na qual o polímero ficou disperso. Em seguida o polímero foi filtrado com auxílio de papel filtro, até que a água de filtragem ficasse incolor. Da mesma forma que para a PANi-PEO,

também foi determinado o teor de não voláteis, que resultou em apenas 1,0%.

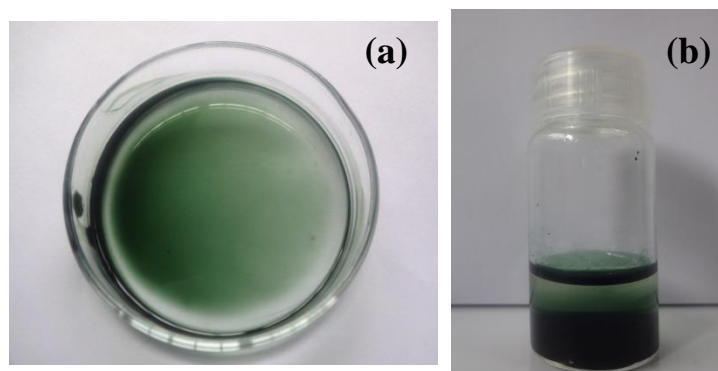
Figura 28 - Etapas da síntese da PAni-PEO-NPAu. (a) Soluções orgânica (transparente) e aquosa (amarela), (b) após 2 min de síntese, (c) após 20 min de síntese e (d) após 30 min de síntese.



Fonte: Da autora.

A Figura 29 (a) mostra o polímero em uma placa de Petry após a diálise e na Figura 29 (b) observa-se o polímero em dispersão, mas já precipitado após 2 dias de síntese. Porém, ao contrário da PAni sintetizada por método convencional, uma leve agitação no frasco já dispersa o polímero novamente, o que facilita a sua aplicação.

Figura 29 - PANi-PEO-NPAu após diálise (a) na placa de Petry, (b) armazenada há 2 dias.



Fonte: Da autora.

4.3 Caracterização dos polímeros

Os polímeros foram caracterizados através do método de 4 pontas para determinar sua condutividade elétrica, por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia no UV-Visível e voltametria cíclica.

4.3.1 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica da PANi-PEO foi medida com o polímero na forma de pastilha, com 1,2 cm de diâmetro e 1,65 mm de espessura. Já para a PANi-PEO-NPAu, devido ao baixo rendimento e ao pouco volume sintetizado não foi possível secar polímero suficiente para fazer uma pastilha. Desta forma, o polímero foi aplicado na forma líquida sobre uma lâmina de vidro para microscopia e em seguida foi seco em estufa a 60°C. A espessura da película formada foi medida com o auxílio de um paquímetro digital (resolução de 0,005 mm). Os ensaios foram realizados a temperatura ambiente.

Para a execução do método padrão de quatro pontas foi utilizado o equipamento Cascade Microtech CS 4-64, associado a uma fonte Keithley 6430. O método consiste em aplicar valores de potencial elétrico nas pontas externas e medir a corrente gerada nas pontas internas. Segundo Giroto e Santos (2002), a medição da condutividade elétrica depende de vários fatores como o formato da amostra e suas dimensões, além do substrato sobre o qual foi aplicada. Para cada combinação destes fatores existe uma equação de resistividade (ρ), cujo inverso é a

condutividade, em S/cm. Para a PANi-PEO a resistividade foi determinada pela Equação 10 e para a PANi-PEO-NPAu, pela Equação 11:

$$\rho = \frac{V}{I} w F_2 F_4 \quad [10]$$

$$\rho = \frac{V}{I} w F_3 \quad [11]$$

onde ρ é a resistividade ($\Omega \cdot \text{cm}$), V é o potencial (Volts), I é a corrente (Ampéres), w é a espessura da amostra (cm) e F_2 , F_3 e F_4 são constantes que dependem da espessura da amostra, diâmetro e distância entre as ponteiros (GIROTTI; SANTOS, 2002).

4.3.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de FT-IR foram realizadas, a fim de se obter informações sobre o estado de oxidação da PANi e interação entre o PEO e as NPAu com a cadeia polimérica. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas do material a ser analisado com KBr, e as análises foram feitas em um espectrofotômetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum 1000.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia dos polímeros sintetizados foi analisada por MEV nos microscópios JEOL JSM 6060, para a PANi-PEO e Zeiss EVO MA10 para a PANi-PEO-NPAu. Para esta última ainda foi utilizado o sistema de detecção de raios-X característicos (EDS) do equipamento para verificar se houve a incorporação do Au na estrutura da PANi-PEO. Ambos os microscópios operaram a um potencial de 10 kV.

As análises foram realizadas com o polímero e com o polímero coberto pela GOx. Para isso, os polímeros foram aplicados sobre o suporte (*stub*) e secos em estufa a 60°C. Em seguida, a solução de GOx foi aplicada sobre o polímero e seca em estufa a 30°C. As amostras de PANi-PEO foram previamente metalizadas com Au, enquanto as de PANi-PEO-NPAu não sofreram o processo de metalização.

4.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para esta análise, uma alíquota dos polímeros foi diluída a 50 vezes em água e depositada

sobre *grid* (grade) de cobre com filme de carbono. Os *grids* foram secos a temperatura ambiente. A análise foi realizada em microscópio JEOL JEM 1200.

4.3.5 Espectroscopia no UV-Visível

Para realizar esta análise, a PAni-PEO e a PAni-PEO-NPAu foram diluídas a 100 vezes em água deionizada. Foi feita a varredura no intervalo de 300 a 900 nm, utilizando-se o equipamento T80 + UV-Vis Spectrometer da PG Instruments Ltd. Esta faixa foi escolhida considerando-se que abaixo de 300 nm há uma forte absorção do PSA utilizado na síntese da PAni-PEO e, acima de 300 nm, nenhum dos outros reagentes além do polímero apresenta absorvência significativa, portanto todas as mudanças que ocorrem no espectro são atribuídas à PAni (STEJSKAL, 1993).

4.3.6 Voltametria cíclica

Esta técnica foi utilizada para conhecer a influência da adição de um polímero isolante (PEO) nas características eletroquímicas da PAni. Para a PAni-PEO, os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em uma célula eletroquímica de 3 eletrodos: placa de platina contendo uma película de PAni-PEO cobrindo uma área de 1,5 cm², como eletrodo de trabalho; fio de platina como contra eletrodo e eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência.

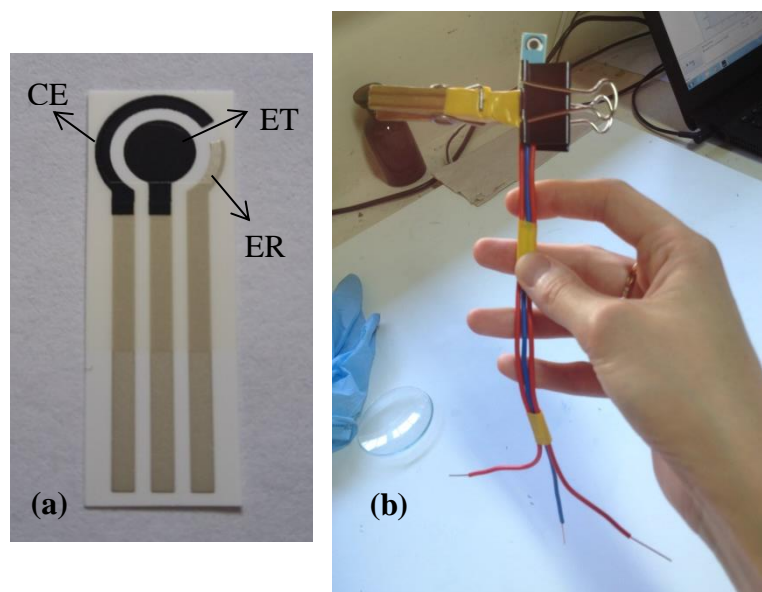
Para a PAni-PEO-NPAu, os ensaios foram realizados utilizando-se o eletrodo de carbono (Figura 30 (a)) fornecido pela GSI Technologies. Este eletrodo possui base polimérica, de poli(cloreto de vinila) (PVC), sobre a qual são impressos o contra eletrodo e o eletrodo de trabalho, os quais são de carbono, e o eletrodo de referência, que é de Ag/AgCl. O polímero foi aplicado na área de 0,07 cm² referente ao eletrodo de trabalho (ET), como indicado na Figura 30 (a).

Para encaixar o eletrodo de carbono e realizar os ensaios eletroquímicos, foi improvisado um dispositivo utilizando 3 fios elétricos, os quais foram fixados em um prendedor de roupa na distância certa para fazer contato com os 3 eletrodos do eletrodo de carbono. Para efetivar o contato elétrico ainda foi utilizado um *clips*, que pressionava o dispositivo (Figura 30 (b)).

Para ambos os polímeros o potencial foi ciclado de -0,2 V a +0,8 V vs Ag/AgCl, com velocidade de varredura de 30 mV/s e utilizando como eletrólito uma solução de HCl 1 M. No caso da PAni-PEO-NPAu, o eletrodo foi fixado na horizontal e uma alíquota de 120 µL do

eletrólito foi aplicada sobre o eletrodo, cobrindo a área do eletrodo de trabalho, de referência e contra eletrodo, garantindo o contato elétrico entre eles. As medidas foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT 302N com auxílio do software Nova 1.10.

Figura 30 – (a) Eletrodo de carbono indicando os eletrodos de trabalho (ET), contra eletrodo (CE) e eletrodo de referência (ER), (b) eletrodo fixado no dispositivo improvisado.



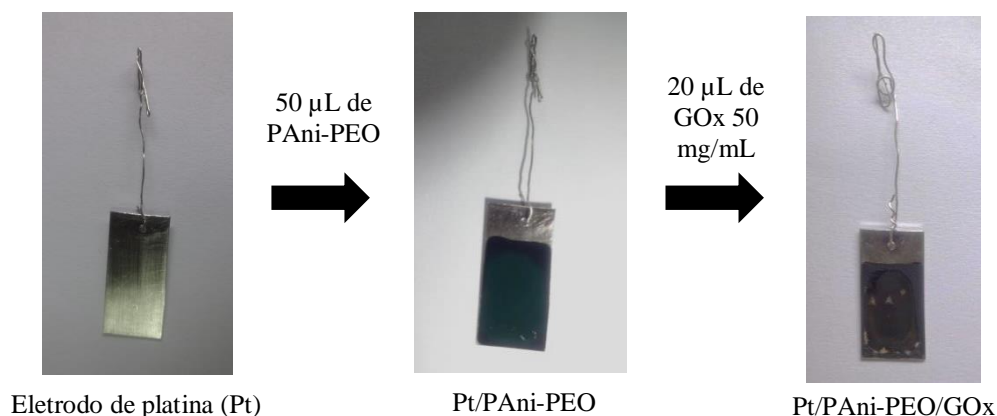
Fonte: Da autora.

4.4 Produção dos biossensores

O objetivo principal deste trabalho, como já citado anteriormente, é a produção de um biossensor simples, eficiente e reprodutível. Para isto, foi escolhida uma metodologia simples de produção do biossensor, que consiste em aplicar o polímero e a enzima por *casting*, sobre a superfície do eletrodo.

No caso da PANi-PEO, o eletrodo sobre o qual o biossensor foi estruturado consiste em uma placa de platina, conforme mostrado na Figura 31. Sobre a placa foi aplicada uma quantidade pré-determinada de polímero em uma área de $1,5 \text{ cm}^2$ e levada para secar em estufa a 60°C . Sobre o polímero aplicou-se a enzima GOx e esta camada foi seca a 30°C . Ao final deste processo, o biossensor foi chamado de Pt/PAni-PEO/GOx. Os volumes de polímero e de GOx, assim como a concentração de GOx aplicados sobre o eletrodo, foram otimizados sendo que os valores apresentados no esquema da Figura 31 são os que apresentaram melhores resultados. Este processo será descrito na Seção 4.5.1 deste trabalho.

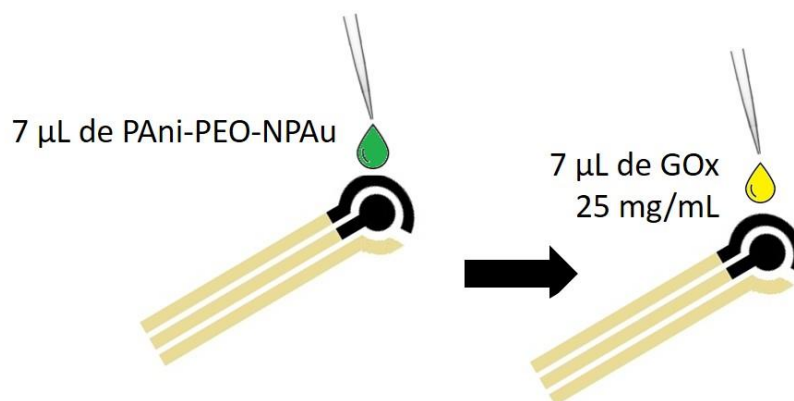
Figura 31 – Esquema ilustrando a produção do biossensor Pt/PAni-PEO/GOx.



Fonte: Da autora.

Para a PAni-PEO-NPAu, o biossensor foi produzido sobre o eletrodo de carbono descrito anteriormente, seguindo as etapas apresentadas no esquema da Figura 32. Primeiramente, uma quantidade pré-determinada de PAni-PEO-NPAu foi aplicada sobre a área referente ao eletrodo de trabalho ($0,07 \text{ cm}^2$) e levada à estufa para secar a 60°C . Em seguida, foi aplicada a solução de GOx e o eletrodo foi seco em estufa a 30°C . Ao biossensor final foi dado o nome de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx.

Figura 32 – Esquema para a produção do biossensor com PAni-PEO-NPAu.



Fonte: Da autora.

Assim como para o biossensor de PAni-PEO, os volumes de polímero e GOx, bem como a concentração da solução de GOx, foram otimizados e os valores que apresentaram melhores resultados estão ilustrados no esquema da Figura 32.

Os biossensores de PAni-PEO e PAni-PEO-NPAu foram produzidos sobre substratos diferentes devido à quantidade limitada de eletrodos de carbono fornecidos pela GSI

Technologies. Desta forma, foi decidido fazer todos os testes e ensaios da PAni-PEO sobre o substrato de platina e os da PAni-PEO-NPAu sobre o eletrodo de carbono.

Após a produção dos biossensores, os mesmos foram caracterizados, conforme os métodos descritos na Seção 4.5 deste trabalho.

4.5 Caracterização dos biossensores

Os biossensores foram caracterizados por métodos eletroquímicos como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e cronoamperometria, os quais serão descritos a seguir.

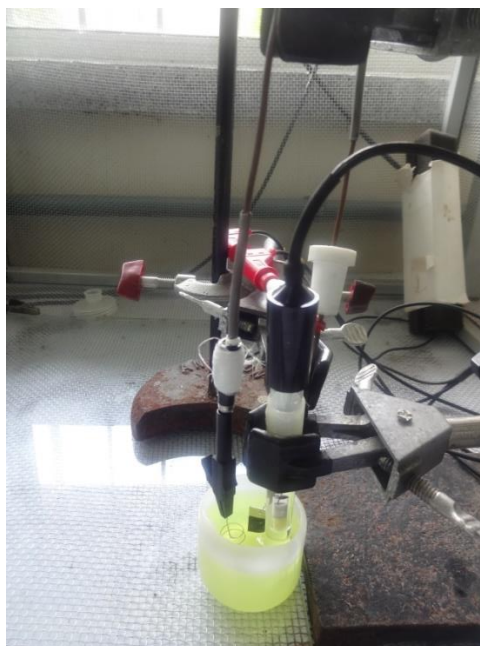
4.5.1 Voltametria cíclica

Vários parâmetros influenciam no desempenho de um biossensor amperométrico enzimático que utiliza polímeros condutores, como o eletrólito onde ocorrerão os ensaios, a quantidade de polímero depositada sobre o eletrodo, a presença de um mediador eletroquímico e a quantidade de enzima GOx imobilizada. Para avaliar e otimizar estes fatores, os quais também são parâmetros de produção e aplicação dos biossensores, foi utilizada a técnica de voltametria cíclica.

As células eletroquímicas foram as mesmas descritas na Seção 4.3.6 deste trabalho, ou seja, uma célula de 3 eletrodos para a PAni-PEO (eletrodo de trabalho: placa de platina; contra eletrodo: fio de platina; eletrodo de referência: eletrodo de Ag/AgCl saturado), a qual está ilustrada na Figura 33, e para a PAni-PEO-NPAu, utilizou-se o eletrodo de carbono, da mesma forma que apresentado na Figura 30. O potencial foi ciclado de -0,5 V a +0,8 V *vs* Ag/AgCl, com velocidade de varredura de 30 mV/s, em um potenciostato Autolab PGSTAT 302N com auxílio do software Nova 1.10.

Os ensaios foram realizados com os parâmetros apresentados na Tabela 4 para a PAni-PEO e na Tabela 5 para a PAni-PEO-NPAu. Na avaliação de cada um dos parâmetros citados anteriormente, os demais parâmetros foram mantidos fixos.

Figura 33 – Célula eletroquímica para a realização dos ensaios com a PANi-PEO.



Fonte: Da autora.

Tabela 4 – Estudos realizados na otimização da produção do biossensor Pt/PAni-PEO/GOx, estabelecendo os parâmetros variados e os parâmetros fixados em cada análise.

	Estudo do eletrólito	Estudo da quantidade de PANi-PEO	Estudo da quantidade de mediador (K₃Fe(CN)₆)	Estudo da concentração de enzima GOx
Parâmetro variado	Tampão fosfato de sódio pH 6	50 µL	1 mM	5 mg/mL
		75 µL	5 mM	25 mg/mL
	Tampão fosfato de sódio pH 7	100 µL	10 mM	50 mg/mL
				75 mg/mL
Parâmetros fixos	5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆	Tampão fosfato de sódio pH 7	Tampão fosfato de sódio pH 7	Tampão fosfato de sódio pH 7
	50 µL de PANi-PEO	5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆	50 µL de PANi-PEO	5 mM de K ₃ Fe(CN) ₆
	20 µL de GOx 50 mg/mL	20 µL de GOx 50 mg/mL	20 µL de GOx 50 mg/mL	50 µL de PANi-PEO

Tabela 5 - Estudos realizados na otimização da produção do biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, estabelecendo os parâmetros variados e os parâmetros fixados em cada análise.

	Estudo do eletrólito	Estudo da quantidade de PAni-PEO-NPAu	Estudo da quantidade de mediador ($K_3Fe(CN)_6$)	Estudo da concentração de enzima GOx
Parâmetro variado	Tampão fosfato de sódio pH 6	5 μ L	1 mM	5 mg/mL
		7 μ L	5 mM	25 mg/mL
	Tampão fosfato de sódio pH 7	9 μ L	10 mM	50 mg/mL
				75 mg/mL
Parâmetros fixos	5 mM de $K_3Fe(CN)_6$	Tampão fosfato de sódio pH 6	Tampão fosfato de sódio pH 6	Tampão fosfato de sódio pH 6
	7 μ L de PAni-PEO-NPAu	5 mM de $K_3Fe(CN)_6$	7 μ L de PAni-PEO-NPAu	5 mM de $K_3Fe(CN)_6$
	4 μ L de GOx 10 mg/mL	4 μ L de GOx 10 mg/mL	4 μ L de GOx 10 mg/mL	7 μ L de PAni-PEO-NPAu

Analisando a Tabela 4 observa-se que para o estudo do eletrólito foram avaliados o tampão fosfato de sódio pH 6 e pH 7, sendo que a quantidade de mediador no eletrólito (5 mM) e as quantidades de PAni-PEO (50 μ L) e GOx (20 μ L, 50 mg/mL) aplicadas sobre o eletrodo permaneceram fixas. No estudo da quantidade de polímero PAni-PEO a ser aplicado na superfície do eletrodo para a construção do biossensor, foram avaliados os volumes de 50, 75 e 100 μ L de polímero, seguidos da aplicação de 20 μ L de GOx 50 mg/mL. Foi utilizado como eletrólito o tampão fosfato de sódio pH 7 contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$.

Para a avaliação da quantidade de mediador $K_3Fe(CN)_6$ que seria utilizada no eletrólito, foram estudadas as concentrações de 1, 5 e 10 mM, adicionadas ao eletrólito de tampão fosfato de sódio pH 7. Para a produção dos eletrodos foram utilizados 50 μ L de PAni-PEO e 20 μ L de GOx 50 mg/mL. Por fim, para analisar a concentração de GOx a ser aplicada sobre o eletrodo, foram estudadas as concentrações de 5, 25, 50 e 75 mg/mL. Foi aplicado 50 μ L de PAni-PEO para a produção do eletrodo e o eletrólito utilizado foi o tampão fosfato de sódio pH 7 contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Esta mesma interpretação deve ser dada a Tabela 5, a qual resume as condições dos ensaios realizados com a PAni-PEO-NPAu. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Foi observada em cada ensaio, qual condição apresentava a melhor resposta eletroquímica, ou seja, maior densidade de corrente nos pares redox durante a ciclagem do potencial, o que indica maior atividade eletroquímica naquela determinada condição.

A partir dos resultados obtidos em todos estes ensaios, foram determinados os parâmetros ótimos para a construção dos biossensores com PANi-PEO (Pt/PAni-PEO/GOx) e biossensores com PANi-PEO-NPAu (EC/PAni-PEO-NPAu/GOx), os quais foram aplicados em todos os demais ensaios realizados a partir daqui.

Com esta plataforma definida, ainda foram realizadas voltametrias cíclicas com os polímeros e com os biossensores já estruturados na ausência e na presença de glicose no eletrólito, a fim de evidenciar se a presença da enzima GOx sobre o polímero estava apresentando resposta eletroquímica à glicose. A partir destas curvas também foi possível identificar o melhor potencial para realização dos ensaios de cronoamperometria, descritos na Seção 4.5.3. Além disso, foram realizados ensaios de voltametria cíclica em várias velocidades de varredura (30, 60, 90, 120 e 150 mV/s), com o intuito de conhecer qual o processo limitante na resposta de corrente elétrica.

4.5.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

As análises de impedância foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT 302N com auxílio do software Nova 1.10, no intervalo de frequências de 10 kHz a 0,05 Hz para a PANi-PEO e 100 kHz a 10 Hz para a PANi-PEO-NPAu. A amplitude de voltagem utilizada foi de 5 mV e os ensaios foram realizados em temperatura ambiente.

Para a PANi-PEO, utilizou-se a célula padrão com 3 eletrodos, descrita anteriormente e mostrada na Figura 33, sendo o eletrólito a solução de tampão fosfato de sódio com pH 7 contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Já para a PANi-PEO-NPAu, os ensaios foram realizados com o eletrodo de carbono acoplado ao dispositivo improvisado neste trabalho e mostrado na Figura 30 sendo aplicada a alíquota de 120 μ L do eletrólito tampão fosfato de sódio pH 6 contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$, recobrando a área dos 3 eletrodos.

Para ambos os polímeros, os ensaios de impedância foram feitos com os eletrodos contendo apenas os polímeros e contendo os polímeros e a GOx, nas quantidades e concentração definidas nos ensaios anteriores de voltametria cíclica.

4.5.3 Cronoamperometria

O ensaio de cronoamperometria realizado neste trabalho consistiu na aplicação de um potencial fixo (+0,2 V para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx; +0,3 V para o biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx) e adições sucessivas, a cada 30 segundos, de uma alíquota de glicose correspondente a 0,1 mM (somente para o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx) e 1 mM com micropipeta, a qual auxiliou também na agitação do sistema. Os ensaios foram realizados na célula eletroquímica com 3 eletrodos (Figura 33) para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, e com o eletrodo de carbono acoplado ao dispositivo improvisado neste trabalho (Figura 30) sendo aplicada a alíquota de 120 μ L do eletrólito tampão fosfato de sódio pH 6 contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$, recobrando a área dos 3 eletrodos. A partir destes ensaios de cronoamperometria foi possível determinar a curva de calibração dos biossensores e estabelecer a relação entre a concentração de glicose e a densidade de corrente gerada.

Além disso, foi realizado o teste de sensibilidade a agentes interferentes, como o ácido úrico e o ácido ascórbico, ambos em soluções preparadas em PBS 0,1 M pH 7,4. As curvas cronoamperométricas foram obtidas a partir de adições sucessivas de glicose na concentração de 1 mM e dos interferentes, com uma concentração de 0,2 mM, sendo adicionada uma espécie por vez, em intervalos de 30 s.

Por fim, foi realizado um teste de estabilidade do biossensor, no qual foi comparada a resposta de corrente para uma medida de 2 mM de glicose no primeiro dia de produção do biossensor, após 15 dias e após 30 dias de produção. Durante este intervalo de 30 dias, no qual os ensaios foram realizados, os biossensores ficaram armazenados na geladeira ($\sim 4^\circ C$) em uma placa de Petry e protegidos da luz. Para a realização deste ensaio, os biossensores Pt/PAni-PEO/GOx e EC/PAni-PEO-NPAu/GOx foram colocados em contato com uma solução do seu eletrólito padrão (PAni-PEO: tampão fosfato de sódio pH 7 contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$; PAni-PEO-NPAu: tampão fosfato de sódio pH 6 contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$) contendo 2 mM de glicose, sendo que a corrente foi deixada estabilizar. Por fim, foi traçado o gráfico de densidade de corrente em função do dia de realização do ensaio.

Todas as cronoamperometrias foram realizadas em um potenciostato Autolab PGSTAT 302N com auxílio do software Nova 1.10. O ensaio para determinar a sensibilidade e curva de calibração foi realizado com 10 amostras. Já os ensaios de sensibilidade a interferentes e de estabilidade foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O capítulo Resultados e Discussão foi dividido em duas partes principais: caracterização dos polímeros, na qual serão discutidos simultaneamente a PANi-PEO e a PANi-PEO-NPAu; e a produção e caracterização dos biossensores, que será dividida em duas seções, referentes a cada um dos biossensores produzidos.

5.1 Caracterização dos polímeros

5.1.1 Condutividade elétrica

Os ensaios de condutividade elétrica foram conduzidos conforme descrito na Seção 4.3.1, através da aplicação de 15 potenciais elétricos, em 3 locais diferentes das amostras, com as respectivas leituras de corrente elétrica. Para cada um destes valores foi calculada a resistividade ρ e a correspondente condutividade σ , em S/cm, conforme as Equações 10 e 11.

A PANi-PEO apresentou condutividade elétrica de $5,77 \times 10^{-4}$ S/cm, o que supera o obtido por outros autores que produziram compósitos de PANi com PEO. Devendrappa, Rao e Prasad (2006) obtiveram uma condutividade de $1,5 \times 10^{-5}$ S/cm para compósitos de PANi:PEO (50:50) e Kunteppa *et al.* (2011) obtiveram condutividades na ordem de 2,0 a $4,0 \times 10^{-5}$ S/cm para compósitos com diferentes porcentagens de PANi, PEO e NaClO₄.

No caso da PANi-PEO-NPAu, o valor de condutividade obtido foi $1,3 \times 10^{-2}$ S/cm. Pillalamarri *et al.* (2005) obtiveram valor de condutividade de 0,1 S/cm em um compósito de PANi (0,1 M) e NPAu (0,002 M de HAuCl₄ na síntese). Já Sarma e Chattopadhyay (2004) obtiveram condutividade de 1,08 S/cm para um compósito de PANi e NPAu sintetizado na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e H₂O₂. Desta forma, o valor de condutividade encontrado para a PANi-PEO-NPAu está um pouco menor do que os encontrados na literatura, mas deve-se considerar que neste trabalho houve também a inserção do PEO na estrutura de PANi, que é um polímero convencional, não condutor.

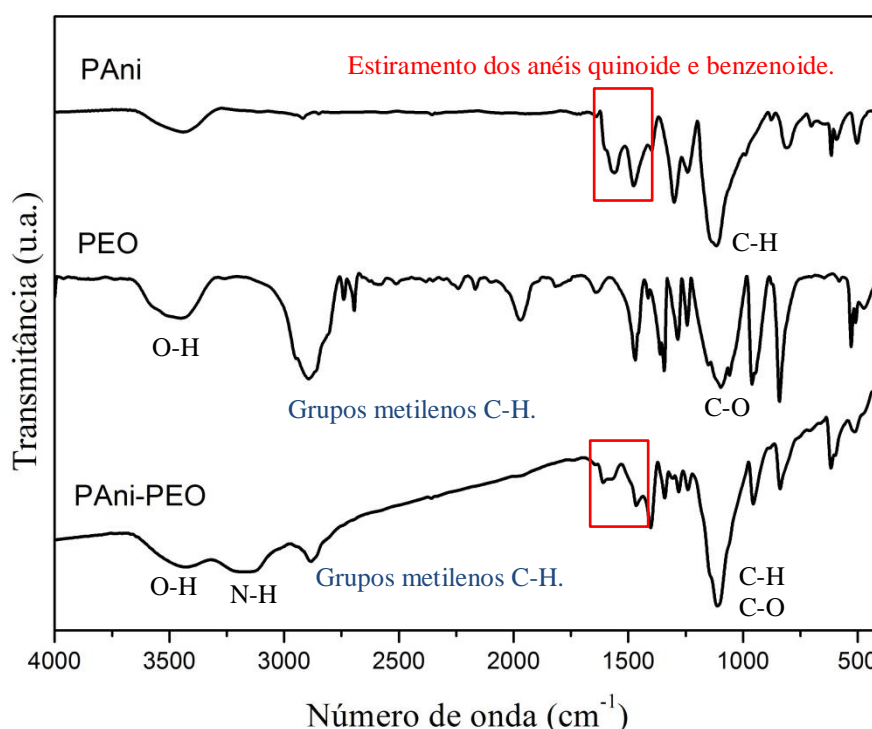
De forma geral, segundo Hopkins *et al.* (2004), a inserção de um polímero convencional na síntese de PANi forma uma matriz isolante na qual a PANi fica inserida, resultando em decréscimo de condutividade elétrica. No entanto, mesmo com o acréscimo do PEO na síntese, os valores de condutividade ficaram dentro da faixa prevista.

5.1.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os ensaios de FT-IR foram realizados com o intuito de confirmar a formação de PANi na forma sal de esmeraldina, dopada e protonada, e a sua relação com o PEO e as NPAu.

A Figura 34 mostra as espectroscopias de FT-IR obtidas para a PANi, o PEO e a PANi-PEO. A PANi pura foi sintetizada da mesma forma que a PANi-PEO, porém sem a adição do PEO no meio de síntese.

Figura 34 – Espectroscopia FT-IR das amostras de PANi, PEO e PANi-PEO.



Analisando a Figura 34 observa-se os picos característicos da PANi, referentes ao estiramento das ligações C=C dos anéis quinoide e benzenoide, os quais devem estar presentes em torno de 1600 e 1500 cm^{-1} (KANG; NEOH; TAN, 1998). A presença destes dois segmentos da cadeia de PANi confirma a formação da PANi sal de esmeraldina. Nos polímeros sintetizados neste trabalho, estes picos se localizam em 1562 e 1476 cm^{-1} para a PANi, e em 1610 e 1467 cm^{-1} para a PANi-PEO, respectivamente. O deslocamento dos picos e sua menor intensidade no composto de PANi-PEO em relação à PANi pura sugere uma interação química entre estes polímeros e um decréscimo em condutividade (LI; JING, 2009).

Os demais picos presentes na faixa de 1250 a 1600 cm^{-1} , tanto no espectro da PANi quanto

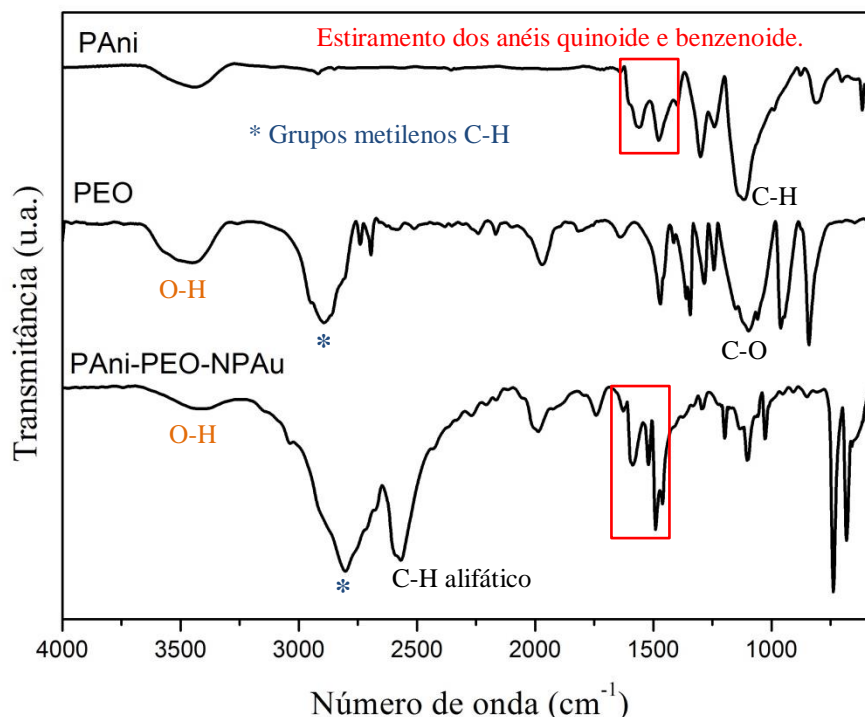
no da PANi-PEO, referem-se ao estiramento da ligação C-N, flexão da ligação C-C dos anéis aromáticos quinoídes e benzenoídes e flexão das ligações N-H presentes na PANi. Já o pico intenso em torno de 1115 cm^{-1} está associado à flexão no plano das ligações C-H dos anéis (KANG; NEOH; TAN, 1998).

Em relação ao espectro do PEO puro, observa-se uma ampla banda centrada em 3466 cm^{-1} , correspondente à vibração da ligação O-H. De acordo com Kunteppa *et al.* (2011), o PEO é altamente hidrofílico e absorve facilmente a umidade do ar, ficando hidratado. Também está presente um pico em 2899 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C-H dos grupos metílenos e uma banda mais ampla em torno de 1100 cm^{-1} , referente à ligação C-O (DEVENDRAPP; RAO; PRASAD, 2006). Os picos na faixa entre 1500 e 800 cm^{-1} , presentes no espectro do PEO puro, referem-se às vibrações de oscilação e flexão das ligações C-H (BASAVARAJU; DEMAPPA; RAI, 2007; DEVENDRAPP; RAO; PRASAD, 2006; KUNTEPPA *et al.*, 2011).

Os picos característicos da PANi e do PEO estão presentes no compósito de PANi-PEO, indicando que houve incorporação do PEO na cadeia de PANi sal de esmeraldina.

A Figura 35 mostra os espectros da PANi, PEO e PANi-PEO-NPAu.

Figura 35 - Espectroscopia FT-IR das amostras de PANi, PEO e PANi-PEO-NPAu.



Analisando a Figura 35, observa-se no espectro da PANi-PEO-NPAu os picos referentes

ao estiramento das ligações C=C dos anéis quinoide e benzenoide, localizados em 1591 cm^{-1} e 1488 cm^{-1} , respectivamente, o que confirma a formação da PANi sal de esmeraldina. Também é possível observar a incorporação do PEO no compósito de PANi-PEO-NPAu pelo pico em 2796 cm^{-1} , referentes ao estiramento das ligações C-H dos grupos metílenos do PEO.

Já os intensos picos em 1115 cm^{-1} (flexão no plano das ligações C-H dos anéis, para a PANi) e 1110 cm^{-1} (referente à ligação C-O, no PEO) estão presentes no espectro da PANi-PEO-NPAu com intensidade bem reduzida. Os picos intensos na região entre 550 e 750 cm^{-1} estão associados a bandas de deformação características da ligação C-Cl (GONÇALVES, 2010). Além disso, analisando de forma geral o espectro da PANi-PEO-NPAu e comparando-o com o da PANi-PEO (Figura 34) é possível observar que houveram alterações, possivelmente relacionadas com interações entre a PANi-PEO e as NPAu.

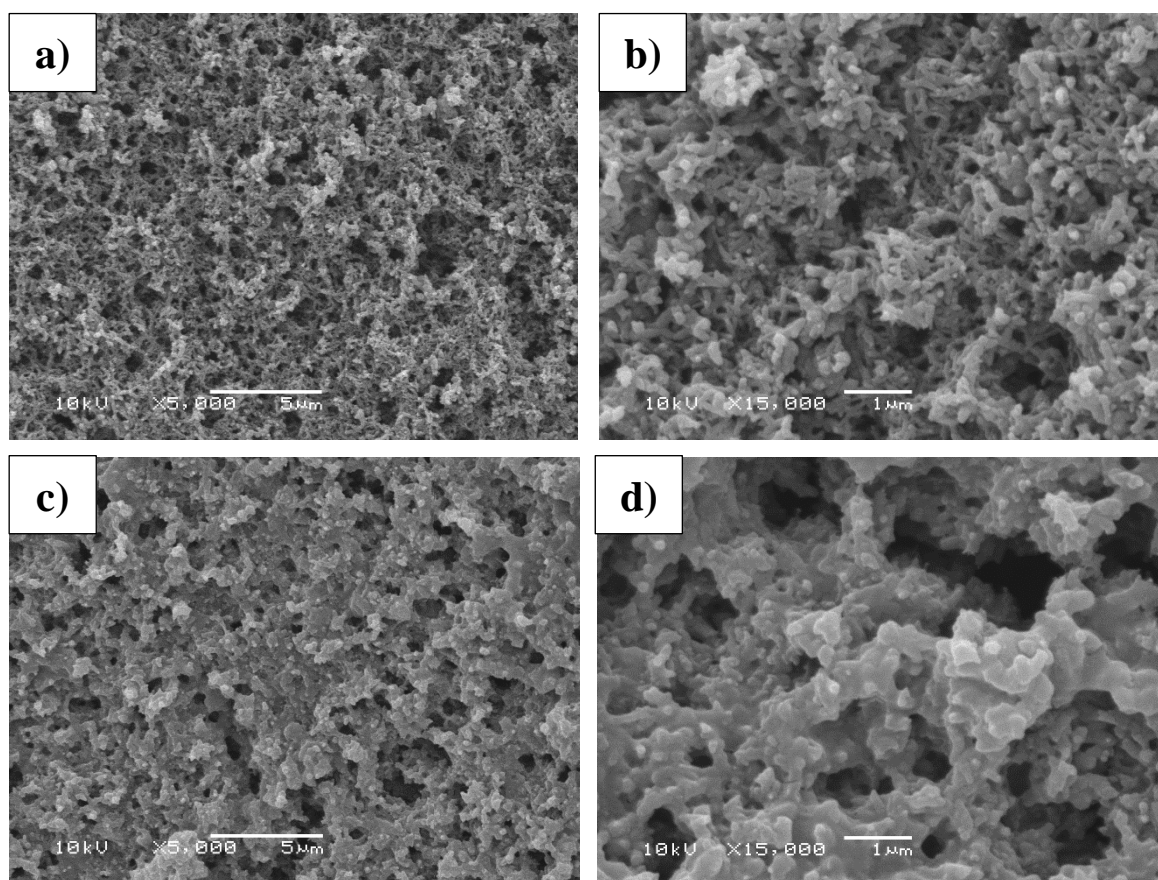
5.1.3 *Microscopia eletrônica de varredura (MEV)*

A Figura 36 apresenta as micrografias MEV das amostras de PANi-PEO e da PANi-PEO/GOx, em diferentes magnificações. A GOx foi adicionada sobre o polímero com o intuito de verificar a sua influência na morfologia da PANi

Analisando a Figura 36 (a) e (b) é possível verificar que a PANi-PEO sintetizada é uma mistura de fibras com pequenas partículas de variadas dimensões. Não é possível, visualmente, identificar a PANi e o PEO separadamente, o que indica uma boa miscibilidade destes polímeros. Além disso, a presença do PEO no meio de síntese não afetou a formação de fibras de PANi sal de esmeraldina.

Na Figura 36 (c) e (d) é possível visualizar a morfologia da PANi-PEO após a aplicação de uma camada da GOx com a mesma concentração utilizada para a produção dos biossensores. Verifica-se que a deposição desta solução de GOx em PBS criou uma camada sobre as fibras e partículas, ligando umas às outras e deixando a superfície mais compacta e coesa. No entanto, uma estrutura porosa (mais aberta) ainda manteve-se presente, o que, segundo Gangopadhyay, Chowdury e De (2012), oferece uma fácil difusão de moléculas entre o eletrólito e a superfície do eletrodo, resultando em maior sensibilidade e em respostas mais rápidas dos biossensores.

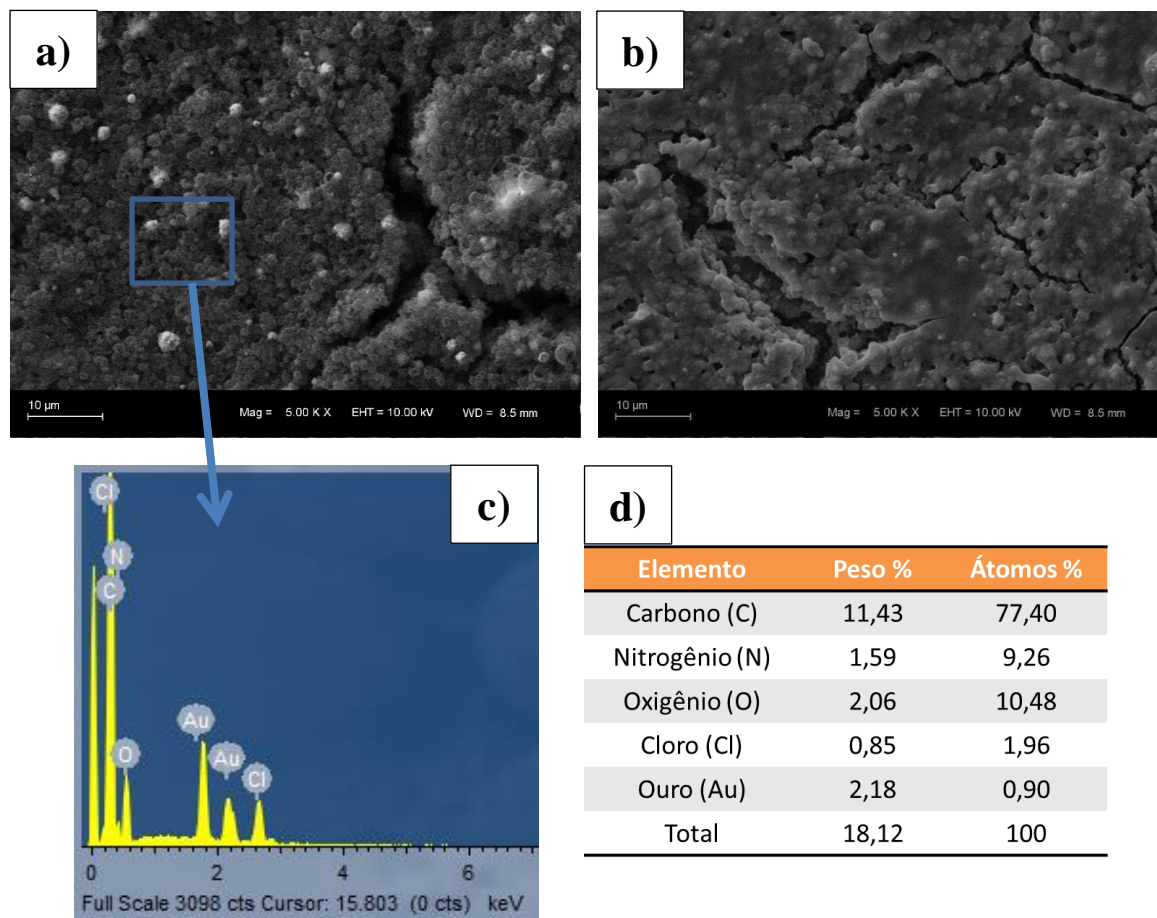
Figura 36 – Micrografias MEV, a) e b) da PANi-PEO em diferentes magnificações; c) e d) da PANi-PEO/GOx em diferentes magnificações.



A Figura 37 (a) e (b) mostra as micrografias MEV da PANi-PEO-NPAu e PANi-PEO-NPAu/GOx, respectivamente. Observa-se, na Figura 37 (a) que, ao contrário do compósito de PANi-PEO, na síntese da PANi-PEO-NPAu ocorreu a formação de pequenas partículas de PANi, de formato arredondado. Gangopadhyay, Chowdhury e De (2012), em cujo trabalho esta síntese foi baseada, obtiveram nanofibras de PANi. Possivelmente, pela inserção do PEO no meio de síntese, a morfologia da PANi foi alterada.

É possível observar também na Figura 37 (a) que as partículas se unem, formando aglomerados maiores e compactos. Em comparação com a Figura 36 (a), referente ao compósito de PANi-PEO, a PANi-PEO-NPAu forma uma estrutura menos porosa e menos aberta. Com a aplicação da GOx sobre o polímero (Figura 37 (b)) verifica-se que a estrutura torna-se ainda mais compacta e menos porosa, da mesma forma que ocorreu com a PANi-PEO/GOx (Figura 36 (c)), devido à formação de uma camada da solução de GOx em PBS, que está unindo e aglomerando ainda mais as partículas.

Figura 37 – Micrografias MEV a) da PANi-PEO-NPAu, b) da PANi-PEO-NPAu/GOx, c) espectroscopia de EDX da PANi-PEO-NPAu e d) porcentagem de cada elemento atômico na área avaliada.



Na Figura 37 (a) é possível visualizar algumas partículas mais claras e com maior brilho, que poderiam ser as partículas de Au formadas durante a síntese. Para confirmar a formação do Au metálico, foi realizada a detecção de raios-X específicos (EDS), cujo espectro está na Figura 37 (c). Pelo espectro é possível confirmar que há átomos de Au na amostra avaliada e pela tabela apresentada na Figura 37 (d), verifica-se que a quantidade em porcentagem de átomos de Au é 0,90% na área avaliada pelo EDS (indicada pelo quadrado na Figura 37 (a)).

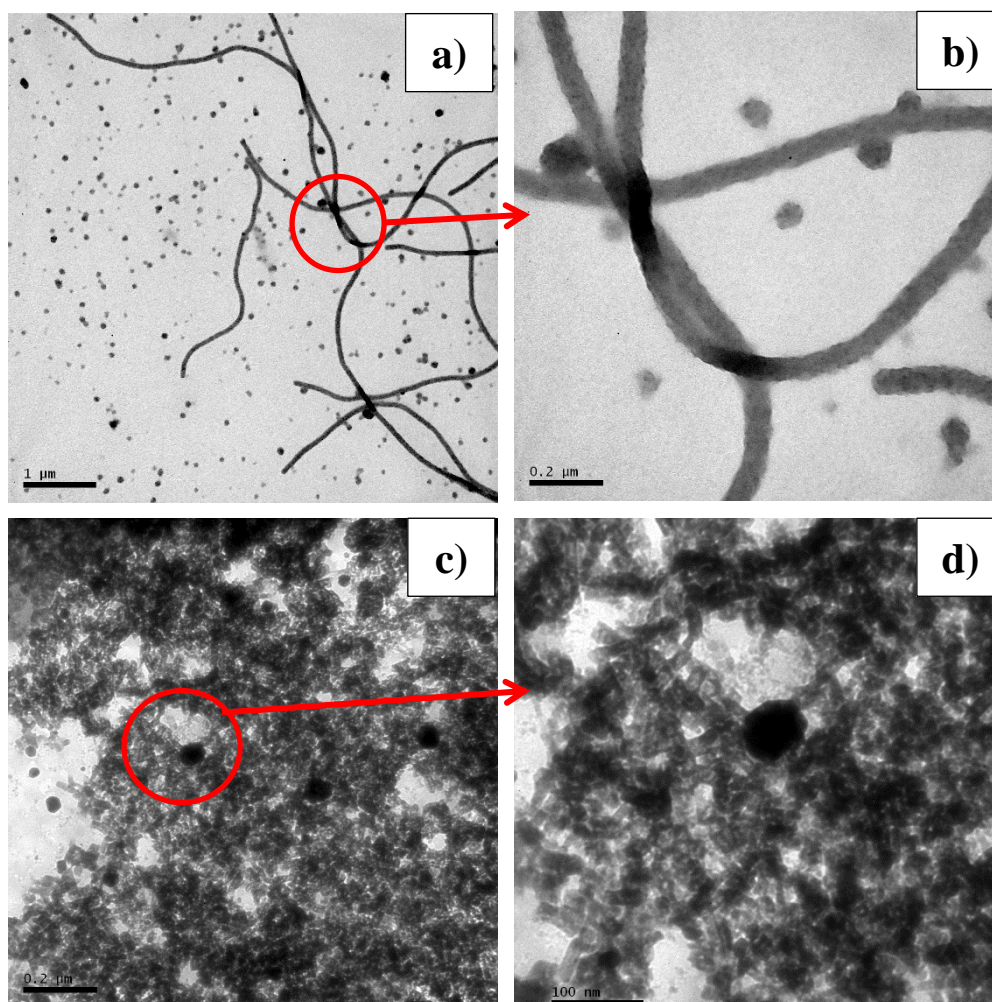
A partir destes resultados é possível afirmar que o método de síntese utilizado foi efetivo e que houve a redução do Au, presente no agente oxidante $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, para Au^0 .

5.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A técnica de caracterização por MET foi utilizada para confirmar a formação de nanoestruturas de PANi em ambos os compósitos produzidos, bem como para confirmar a presença de NPAu no compósito de PANi-PEO-NPAu. As micrografias MET da PANi-PEO

podem ser visualizadas na Figura 38 (a) e (b), em diferentes magnificações; e as da amostra de PANi-PEO-NPAu estão na Figura 38 (c) e (d), também em diferentes magnificações.

Figura 38 – Micrografias MET da (a) e (b) PANi-PEO, em diferentes magnificações e (c) e (d) PANi-PEO-NPAu em diferentes magnificações. As áreas circuladas nas imagens (a) e (c) indicam onde houveram as magnificações.

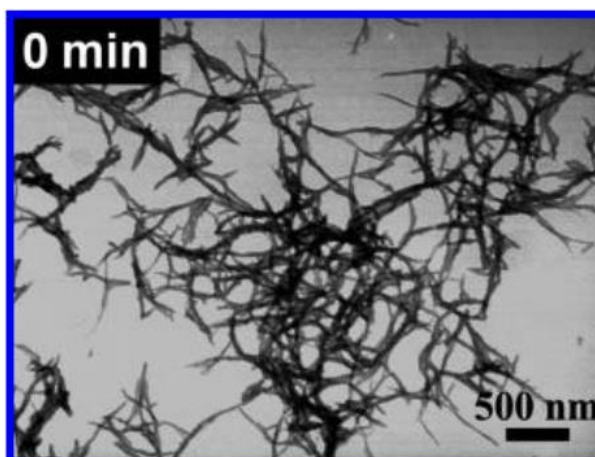


Na Figura 38 (a) e (b) é possível confirmar a formação de nanofibras de PANi com diferentes comprimentos e diâmetro de aproximadamente 70 nm. Também se observa a formação de nanopartículas de PANi com diâmetros variados. Assim como nas micrografias de MEV, não é possível distinguir a PANi e o PEO, indicando boa miscibilidade destes polímeros.

Outra característica interessante das nanofibras de PANi-PEO formadas é a sua aparente flexibilidade. Analisando as imagens de outros trabalhos, como o da Figura 39, onde nanofibras de PANi foram sintetizadas (HUANG, 2006; LI; HUANG; KANER, 2009), as fibras aparentam ser mais rígidas e menos flexíveis do que as nanofibras de PANi-PEO. Este fato pode estar

associado à incorporação do PEO na cadeia de PANi, tornando-a mais flexível.

Figura 39 – Micrografia MET de nanofibras de PANi no início de uma síntese convencional.



Fonte: Li; Huang; Kaner (2009)

Analisando a Figura 38 (c) e (d), relativas à PANi-PEO-NPAu, é possível confirmar o que já foi visualizado com as micrografias MEV, ou seja, ocorreu a formação de partículas de PANi de diferentes dimensões, as quais estão aglomeradas. Pela Figura 35 (d) verifica-se que a grande maioria das partículas de PANi estão na escala nanométrica. Estas imagens também mostram partículas maiores e mais escuras, as quais podem ser as partículas de Au, com aproximadamente 68 nm. Para efetiva confirmação, mais ensaios seriam necessários.

5.1.5 Espectroscopia no UV-Visível

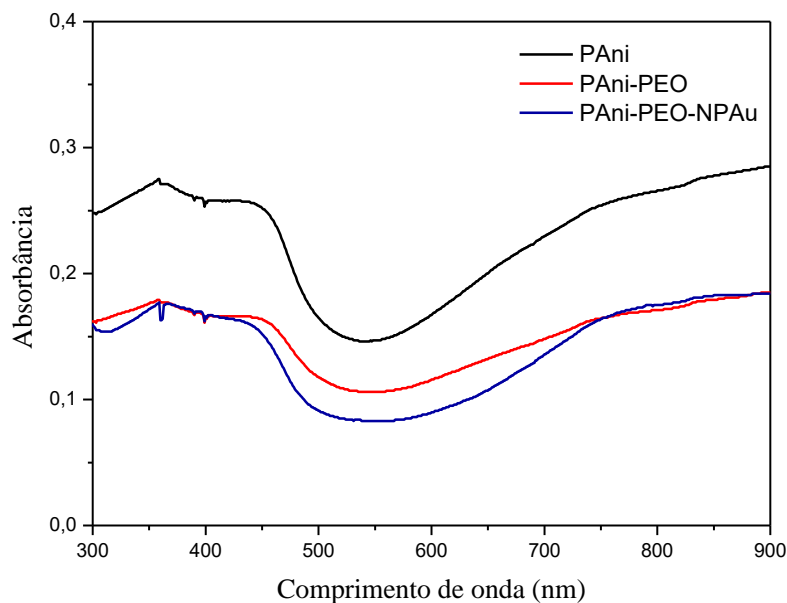
Esta técnica de caracterização é bastante utilizada para a PANi, já que uma das principais características deste polímero é a mudança de cor, de acordo com seu estado de oxidação e protonação.

Segundo a literatura (HAN *et al.*, 2002; STEJSKAL, 1993; YU *et al.*, 2006), a PANi no estado condutor sal de esmeraldina deve possuir três bandas de absorção, normalmente observadas em 325-360 nm, 400-430 nm e 780-826 nm. Geralmente as duas primeiras bandas se juntam formando uma banda única, com o máximo entre 380 e 420 nm. Esta banda extensa, com formato de “ombro” (*shoulder-like*) é atribuída às transições $\pi-\pi^*$ dos anéis aromáticos do polímero. Já a banda em torno de 800 nm, a qual possui uma longa cauda, é atribuída aos segmentos polarônicos, que é uma característica do polímero protonado e condutor, na forma sal esmeraldina (YU *et al.*, 2006).

A Figura 40 mostra os espectros obtidos para os polímeros PANi-PEO e PANi-PEO-

NPAu, em comparação com um espectro de PANi pura, sintetizada da mesma forma que a PANi-PEO, porém sem a adição do PEO no meio de síntese. Analisando esta figura observa-se que as duas bandas características da PANi estão presentes em ambos os compósitos, comprovando a formação da PANi na sua forma dopada sal de esmeraldina.

Figura 40 – Espectroscopias no UV-Visível das amostras de PANi, PANi-PEO e PANi-PEO-NPAu, diluídas 100 vezes em água.



Em relação às NPAu, a sua banda característica localiza-se em uma faixa entre 500 e 600 nm, dependendo da dimensão das nanopartículas (HODAK; HENGLEIN; HARTLAND, 1999) e é atribuída ao plasmon de superfície destes materiais. No entanto, esta banda não está visível no espectro da PANi-PEO-NPAu. Este fato, segundo Bogdanović *et al.* (2015), está associado com os seguintes fatores:

- (i) A banda de plasmon das nanopartículas de metais é sensível ao ambiente ao seu redor;
- (ii) A banda de plasmon fica sobreposta pela forte absorção da PANi na mesma região e devido à menor quantidade de NPAu em relação à PANi no nanocompósito;
- (iii) Há uma menor oscilação das nanopartículas em meio ácido.

A ausência destes picos é bem comum em nanocompósitos de PANi com NPAu e foi observado também por Pillalamarri *et al.* (2005), Bogdanović *et al.* (2015), Gangopadhyay; Chowdhury e De (2012) e Abdulla *et al.* (2015).

5.1.6 Voltametria cíclica

Ao final das sínteses e purificações, a amostra de PANi-PEO foi aplicada sobre a superfície de uma placa de platina (Pt) e a amostra de PANi-PEO-NPAu foi aplicada sobre a área referente ao eletrodo de trabalho do eletrodo de carbono (EC). Ambos os eletrodos foram secos em estufa a 60°C. Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados em HCl 1 M, conforme descrito na Seção 4.3.6 deste trabalho. Os voltamogramas cíclicos da PANi-PEO e da PANi-PEO-NPAu estão apresentados nas Figuras 41 e 42, respectivamente.

Figura 41 - Voltamograma cíclico da PANi-PEO e do eletrodo de Pt, em HCl 1 M. Potencial ciclado de -0,2 V a +0,8 V, *versus* eletrodo de Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam a direção do ciclo.

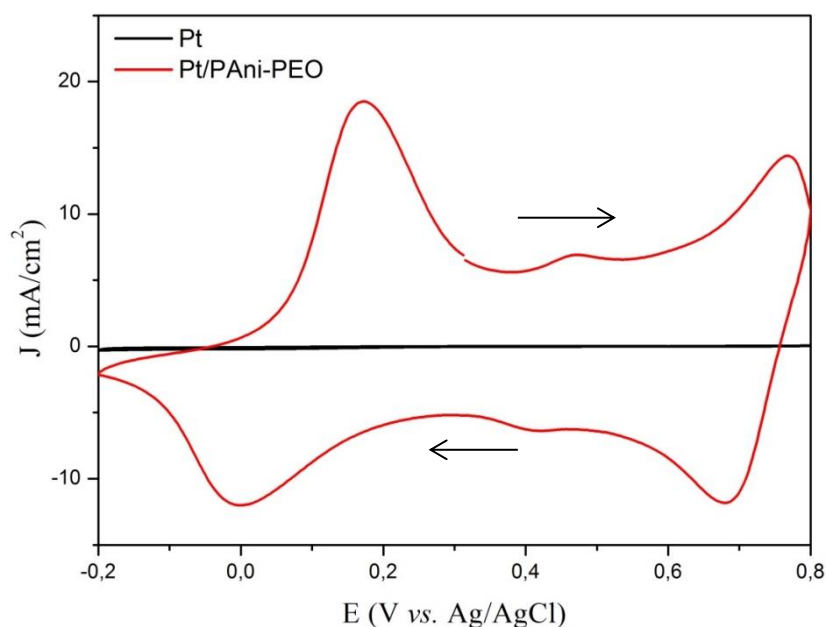
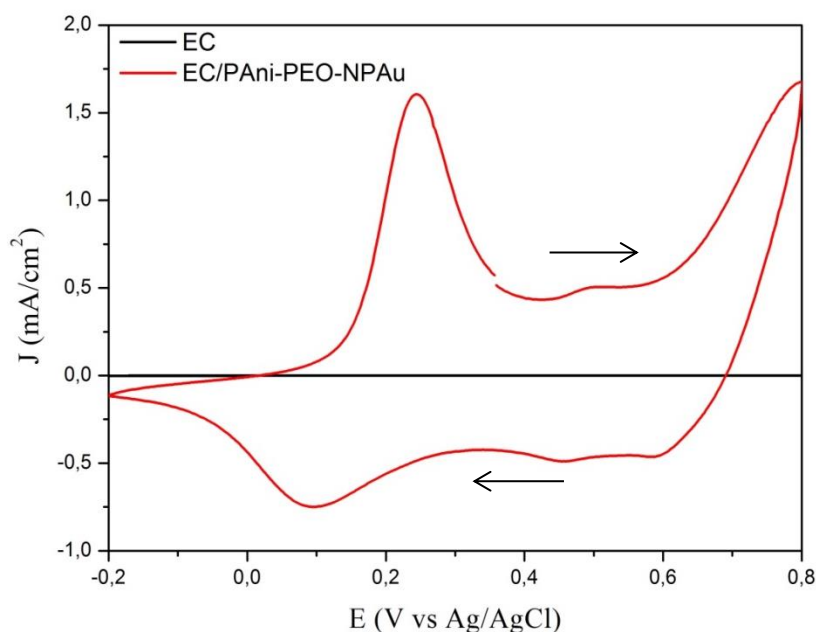


Figura 42 - Voltamograma cíclico da PANi-PEO-NPAu e do eletrodo de carbono (EC), em HCl 1 M. Potencial ciclado de -0,2 V a +0,8 V, *versus* eletrodo de Ag/AgCl. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam a direção do ciclo.



Comparando o voltamograma típico da PANi em HCl 1 M, mostrado na Figura 12 (página 15) deste trabalho, com os obtidos para a PANi-PEO e para a PANi-PEO-NPAu, verifica-se a formação dos dois pares de picos redox em ambos os compósitos sintetizados, o que confirma a eletroatividade e reversibilidade da PANi.

A diferença nos valores de densidade de corrente observada entre os dois voltamogramas (Figura 41 e 42) deve-se aos eletrodos utilizados, já que para a PANi-PEO-NPAu foi utilizado um sistema miniaturizado, com o eletrodo de carbono e suas trilhas atuando como eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência. Já no caso da PANi-PEO utilizou-se um eletrodo de Pt, em uma célula de 3 eletrodos. Outra causa para a diferença nas densidades de corrente deve-se à quantidade de polímero sobre o eletrodo, que para o sistema PANi-PEO é maior em comparação ao sistema PANi-PEO-NPAu, devido ao maior teor de não-voláteis da PANi-PEO.

No caso da PANi-PEO (Figura 41), os picos anódicos estão em +0,172 V e +0,768 V e os catódicos em +0,006 V e +0,679 V, sendo que o primeiro par de picos está associado à interconversão entre os estados de oxidação leucoesmeraldina (amarelo) e esmeraldina (verde), e o segundo par de picos redox refere-se à interconversão entre os estados esmeraldina (verde) e pernigranilina (violeta). O par de picos intermediário (+0,472 V e +0,410 V) está associado a uma pequena degradação da cadeia polimérica (MATTOSO, 1996). Observa-se também que o

eletrodo de Pt, sem recobrimento polimérico, apresenta baixa atividade eletroquímica.

Para a PANi-PEO-NPAu (Figura 42), os picos anódicos estão localizados em +0,244 V e +0,8 V e os catódicos em +0,090 V e +0,580 V. Da mesma forma que para a PANi-PEO, o pequeno par de picos intermediário (+0,494 V e +0,451 V) corresponde à degradação da cadeia polimérica. Na Figura 41 observa-se também que o eletrodo de carbono (EC) sem recobrimento polimérico apresenta baixa atividade eletroquímica.

Uma característica interessante observada em ambos os voltamogramas das Figuras 41 e 42 é a grande separação entre os dois picos anódicos, o que indica uma ampla faixa de potencial onde a PANi se encontra dopada e no estado de oxidação esmeraldina (MAŽEIKIENE; NIAURA; MALINAUSKAS, 2003).

Por fim, é possível afirmar que a adição do PEO e a presença de NPAu não afetaram de forma negativa a eletroatividade da PANi sintetizada na forma de compósitos.

5.2 Produção e caracterização dos biossensores

Para ambos os biossensores produzidos neste trabalho, primeiramente foram otimizados os seus parâmetros de construção, tais como o eletrólito no qual os ensaios eletroquímicos seriam conduzidos, quantidade de polímero a ser aplicada sobre o eletrodo, quantidade de mediador redox no eletrólito e quantidade de enzima GOx a ser imobilizada no eletrodo. Para isto, foi utilizada a técnica de voltametria cíclica.

Com os parâmetros otimizados, foi feito o ensaio de espectroscopia de impedância eletroquímica, a fim de avaliar os fenômenos que estão ocorrendo na superfície do eletrodo. Em seguida, através da técnica de cronoamperometria, foi definido o potencial ótimo para a realização dos demais ensaios de cronoamperometria para detecção de glicose e interferentes.

Por fim, foi definida a curva de calibração dos biossensores, sua equação característica, limite de detecção e constante de Michaelis-Menten. Além disso, foi realizado um estudo da estabilidade dos biossensores, a fim de avaliar a sua vida útil.

5.2.1 Biossensor Pt/PAni-PEO/GOx

5.2.1.1 Voltametria cíclica

Os ensaios de voltametria cíclica para otimização dos parâmetros de produção do

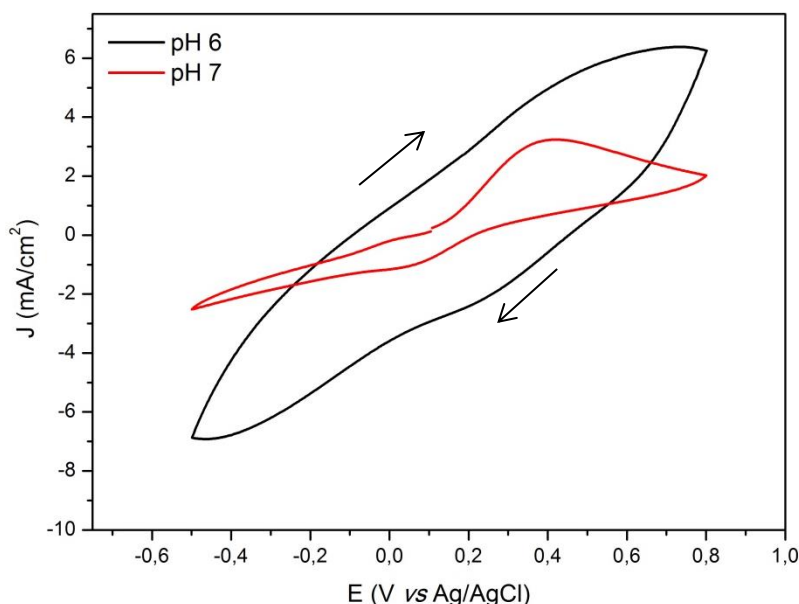
biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx foram realizados conforme apresentado na Tabela 4 da Seção 4.5.1 deste trabalho.

O primeiro estudo realizado foi em relação ao eletrólito no qual seriam conduzidos os demais ensaios de caracterização eletroquímica do biossensor. Foram avaliadas as soluções de tampão fosfato de sódio com pH 6 ou pH 7, tendo em vista que são as mais utilizadas em ensaios biológicos por apresentarem um ambiente adequado para as enzimas. Também, conforme discutido na Seção 3.2.1 deste trabalho, a glicose oxidase apresenta atividade biológica ótima em um intervalo de pH de 5 a 7.

Para a produção do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx a ser ensaiado nos diferentes eletrólitos foi aplicado, primeiramente, 50 μL da dispersão de PAni-PEO sobre o eletrodo de Pt. Este volume foi escolhido por ser suficiente para cobrir a área de 1,5 cm^2 do eletrodo de trabalho, sem formar um filme muito fino e poroso ou então muito espesso e quebradiço. Após a secagem da PAni-PEO em estufa a 60°C, aplicou-se 20 μL de uma solução com 50 mg/mL de GOx, o que resulta em 100 U/cm^2 . Esta concentração foi escolhida com base em outros trabalhos, como o de Miao *et al.* (2015), que aplicou 56 U/cm^2 , Xu *et al.* (2014) que aplicou 31 U/cm^2 e Feng *et al.* (2015) que aplicou 129 U/cm^2 de GOx sobre o eletrodo de trabalho. Após a aplicação, a camada de GOx foi seca em estufa a 30°C.

Nos eletrólitos ensaiados foi colocado 5 mM do mediador redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, também com base na concentração utilizada em outros trabalhos (ZHU *et al.*, 2015; WU; YIN, 2011; SONG *et al.*, 2010). Os voltamogramas obtidos com os dois eletrólitos ensaiados podem ser observados na Figura 43.

Figura 43 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função do pH do eletrólito. Eletrólitos: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 ou pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



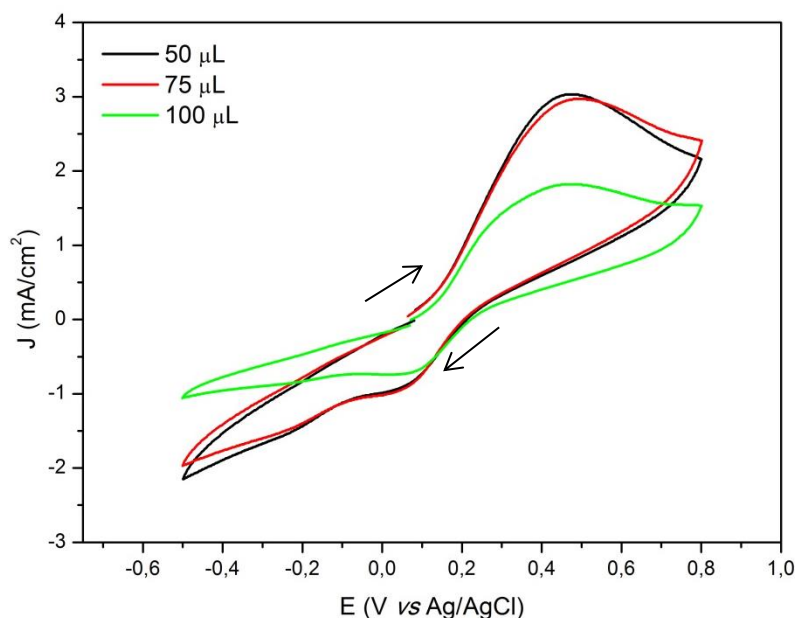
Analisando a Figura 43 verifica-se um perfil das curvas totalmente diferente daquele obtido no ensaio em HCl 1 M (Figura 40). Isto acontece, pois a eletroatividade da PANi depende fortemente do pH do eletrólito. Em meios neutros e alcalinos, a PANi perde sua eletroatividade e o comportamento observado na Figura 40 tende a desaparecer (GOSPODINOVA; TERLEMEZYAN, 1998; MATTOSO, 1996). No entanto, mesmo com o maior valor de pH, o voltamograma no eletrólito de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7 apresentou um pico de oxidação em +0,386 V e um pequeno pico de redução em +0,069 V, os quais estão associados ao processo redox do $K_3Fe(CN)_6$ (WOHLFAHRT et al., 2004). A diferença na intensidade dos picos indica que o processo não é totalmente reversível e que o transporte de elétrons das espécies redox é lento no eletrodo de trabalho. Já o biossensor no eletrólito com pH 6 se mostrou eletroativo, porém sem picos de oxidação e redução. Desta forma, o eletrólito escolhido para os subsequentes ensaios eletroquímicos foi o tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7.

O próximo parâmetro de produção do biossensor a ser otimizado foi a quantidade de PANi-PEO aplicada sobre o eletrodo. O volume de 50 μL mostrou-se adequado para cobrir a área de 1,5 cm^2 do eletrodo de Pt. No entanto, um maior volume de polímero sobre o eletrodo pode significar maior eletroatividade e propiciar maior imobilização da enzima. Portanto, foram testados mais dois volumes de PANi-PEO aplicados sobre o eletrodo de trabalho de Pt: 75 e 100 μL .

Para a realização deste ensaio, os diferentes volumes foram imobilizados sobre os eletrodos de Pt e secos em estufa a 60°C. Em seguida, 20 µL da solução de GOx 50 mg/mL foi aplicado nos eletrodos e seca em estufa a 30°C. Os voltamogramas cíclicos foram realizados utilizando como eletrólito a solução de tampão fosfato de sódio pH 7, com 5 mM de K₃Fe(CN)₆. Os resultados estão apresentados na Figura 44.

Analisando a Figura 44 observa-se que os biossensores de Pt/PAni-PEO/GOx com 50 µL e com 75 µL de PAni-PEO apresentaram o mesmo comportamento eletroquímico, com a mesma intensidade de corrente nos picos anódico e catódico. Já o biossensor com 100 µL de PAni-PEO apresentou menor intensidade dos picos de corrente, o que pode estar associado com a maior espessura do filme resultante sobre o eletrodo. Uma maior espessura de filme, sem aumento considerável de porosidade e de área superficial efetiva, acaba aumentando a resistência ao transporte de elétrons, dificultando a sua passagem até a superfície do eletrodo (XU *et al.*, 2013).

Figura 44 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função do volume de PAni-PEO aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de K₃Fe(CN)₆. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



A partir destes resultados, foi definido o volume de 50 µL de PAni-PEO a ser aplicado sobre o eletrodo de trabalho de Pt para os demais ensaios eletroquímicos, já que apresentou eletroatividade semelhante ao biossensor com 75 µL e com menor volume de polímero.

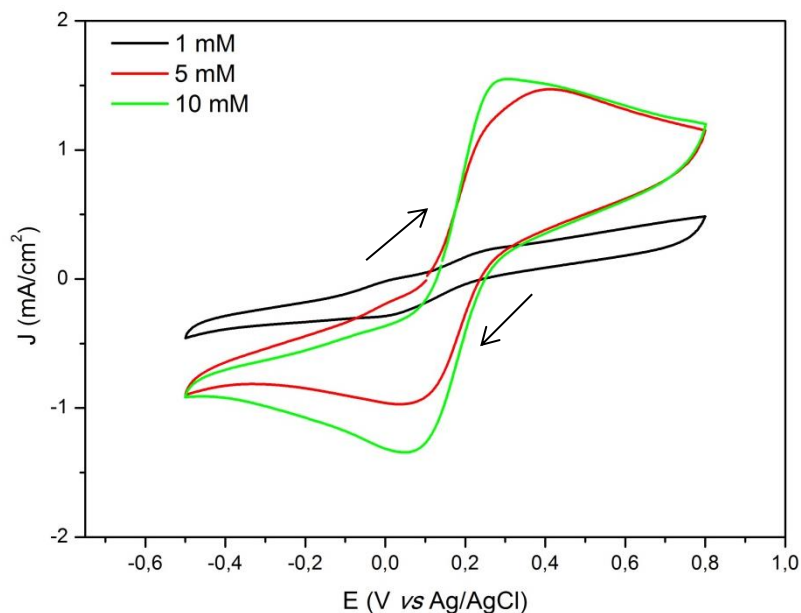
Outro fator avaliado foi a quantidade de mediador redox $K_3Fe(CN)_6$ presente no eletrólito. Como já mencionado na Seção 3.3.1 deste trabalho, os biossensores comerciais de glicose utilizam mediadores redox, sendo o $K_3Fe(CN)_6$ o mais comum. Portanto, foi decidido utilizar este componente nos biossensores produzidos neste trabalho, com o intuito de auxiliar no processo de detecção da glicose.

Em ensaios preliminares, o $K_3Fe(CN)_6$ foi aplicado sobre a superfície do eletrodo, antes ou depois da camada de GOx. No entanto, ao mergulhar o eletrodo na célula eletroquímica para realizar os ensaios, o $K_3Fe(CN)_6$ facilmente se desprendia do eletrodo, por ser muito solúvel no eletrólito. Por isso optou-se por utilizá-lo em solução no eletrólito e, futuramente, caso o biossensor venha a ser produzido, o mediador pode ser aplicado diretamente sobre a sua superfície.

Foram testadas as concentrações de 1, 5 e 10 mM de mediador $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7, com base em outras pesquisas consultadas (ZHU *et al.*, 2015; WU; YIN, 2011; SONG *et al.*, 2010).

Os biossensores de Pt/PAni-PEO/GOx utilizados nestes ensaios foram produzidos com 50 μ L de PAni-PEO aplicados sobre o eletrodo, seguido da aplicação de 20 μ L de GOx 50 mg/mL. O eletrólito utilizado foi o tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7, contendo 1, 5 ou 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Os voltamogramas obtidos encontram-se na Figura 45.

Figura 45 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função da concentração de mediador redox $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 1, 5 ou 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



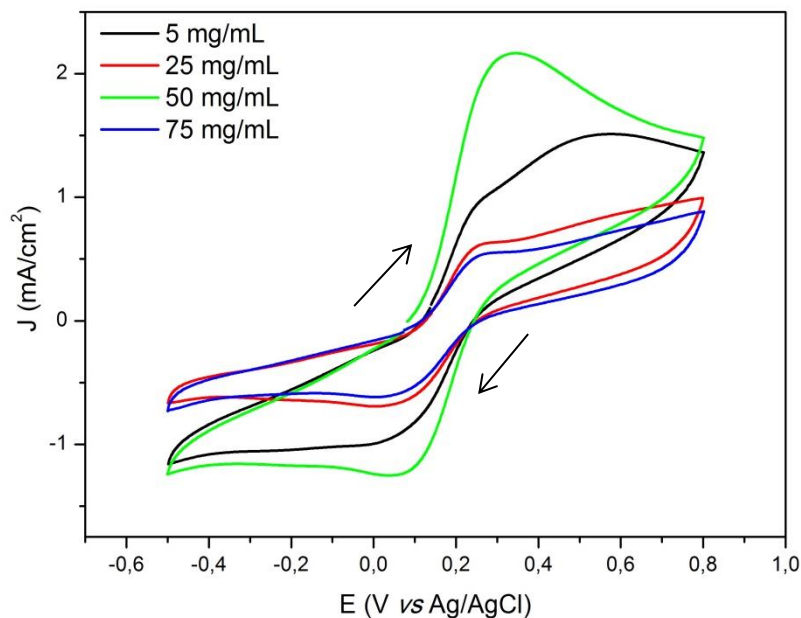
Analisando a Figura 45 observa-se um comportamento eletroquímico bastante semelhante entre os biossensores ensaiados nos eletrólitos contendo 5 ou 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Já o biossensor ensaiado no eletrólito contendo apenas 1 mM do mediador redox, apresentou uma menor atividade eletroquímica, com menores picos de corrente anódico e catódico.

Como há pouca diferença de eletroatividade entre as concentrações de 5 e 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$ presentes no eletrólito, optou-se por utilizar a menor concentração, e os demais ensaios eletroquímicos foram conduzidos com 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito.

Por fim, o último parâmetro avaliado para otimização da produção do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx foi a concentração da solução de GOx aplicada sobre a camada de PAni-PEO. Como explicado no início desta Seção, os primeiros ensaios foram conduzidos com uma concentração de enzima de 50 mg/mL, com base na quantidade utilizada em outros trabalhos publicados. Ainda foram testadas as concentrações de 5, 25 e 75 mg/mL.

Os biossensores a serem testados foram produzidos com 50 μ L de PAni-PEO aplicado no eletrodo de Pt, sobre a qual, após a secagem em estufa a 60°C, foi aplicado 20 μ L das soluções de GOx com concentrações de 5, 25, 50 ou 75 mg/mL. Em seguida, os biossensores secaram em estufa a 30°C. O eletrólito utilizado nos ensaios foi a solução de tampão fosfato de sódio pH 7 com 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Os voltamogramas obtidos estão na Figura 46.

Figura 46 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em função da concentração de GOx aplicada no biossensor. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



Na Figura 46 é possível observar que a maior resposta eletroquímica foi obtida quando o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx foi produzido com a aplicação de 20 μ L de GOx 50 mg/mL. Da mesma forma que para o polímero, uma quantidade muito grande de enzima pode acabar dificultando o transporte de elétrons até a superfície do eletrodo, tornando o sistema menos eletroativo. O biossensor produzido com a aplicação de uma solução de GOx 5 mg/mL também apresentou uma boa eletroatividade, no entanto, como nos demais ensaios o biossensor será mergulhado na célula eletrolítica, haverá dessorção da enzima. Então optou-se pela utilização de uma maior concentração inicial de enzima, a fim de garantir o funcionamento do biossensor nos ensaios posteriores.

Desta forma, os demais ensaios eletroquímicos foram conduzidos com o eletrodo produzido a partir de uma solução de GOx com 50 mg/mL.

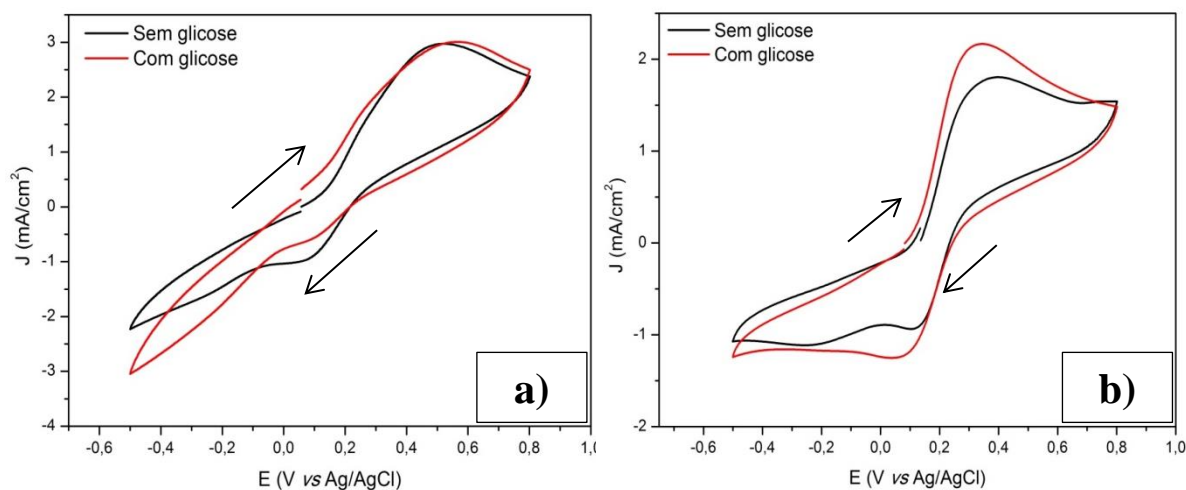
A partir dos ensaios preliminares de voltametria cíclica, os parâmetros de produção do biossensores de Pt/PAni-PEO/GOx foram determinados e estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros otimizados para a produção do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx e para realização dos ensaios eletroquímicos.

Biossensor Pt/PAni-PEO/GOx	
Quantidade de PAni-PEO	50 μ L
Quantidade de GOx	20 μ L – 50 mg/mL
Eletrólito dos ensaios eletroquímicos	Tampão fosfato de sódio pH 7,0
Concentração de mediador $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito	5 mM

Com o intuito de confirmar previamente aos ensaios de cronoamperometria se haverá detecção de glicose pelo biossensor produzido, foram realizados ensaios de voltametria cíclica da Pt/PAni-PEO e da Pt/PAni-PEO/GOx na ausência e na presença de 1 mM de glicose, conforme também realizado por Feng *et al.* (2015). Os voltamogramas obtidos estão na Figura 47.

Figura 47 – Voltamogramas cíclicos da (a) Pt/PAni-PEO e (b) Pt/PAni-PEO/GOx na ausência e na presença de 1 mM de glicose no eletrólito. Eletrólito: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.

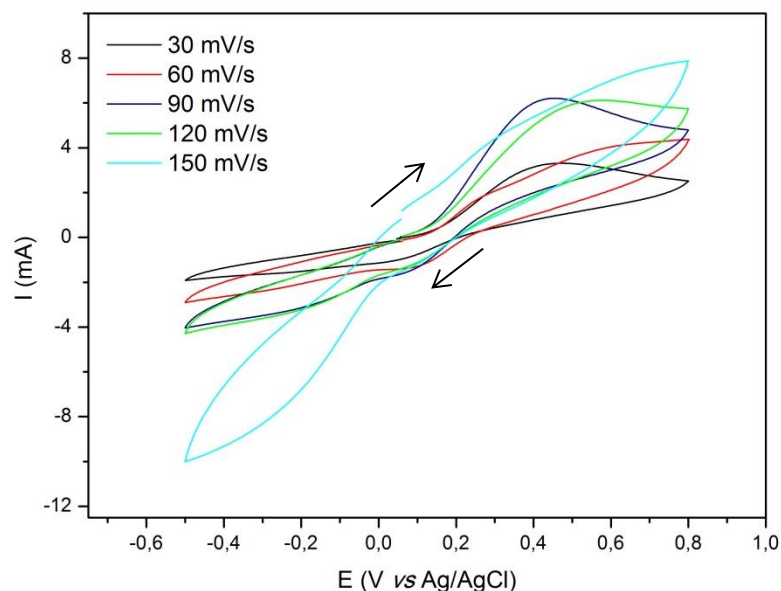


Analisando a Figura 47 (a) observa-se que no caso da Pt/PAni-PEO há pouca diferença na eletroatividade do polímero quando a glicose está presente no eletrólito, sendo que apenas o pico de redução fica menos intenso. Já no caso da Pt/PAni-PEO/GOx (Figura 47 (b)) há uma maior intensidade no pico de oxidação e no de redução quando há presença de 1 mM de glicose no meio. Isto indica que a PAni por si só não apresenta efeito catalítico sobre a glicose, e sim

que a enzima GOx é que tem papel fundamental na detecção deste analito (FENG et al., 2015).

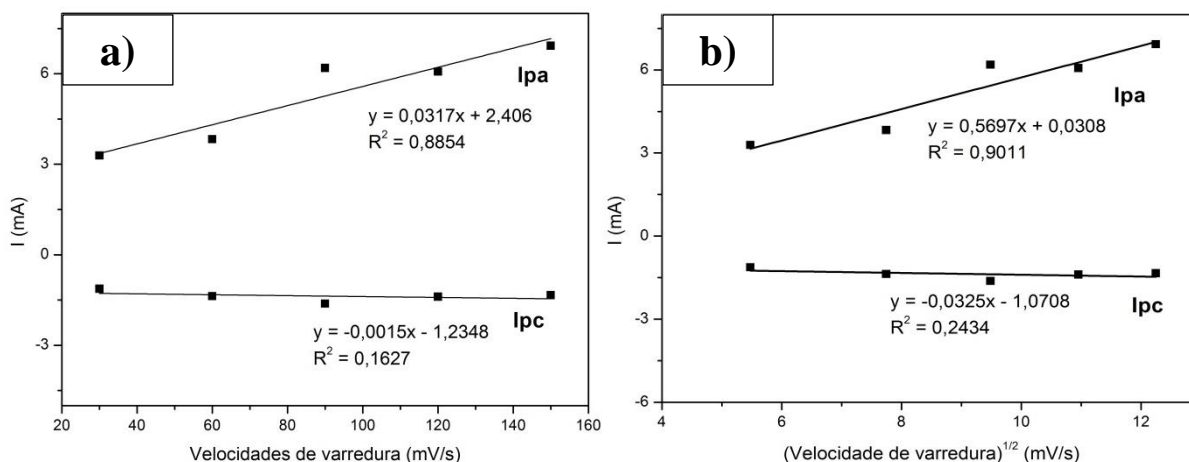
Para verificar como ocorre o processo de transferência de elétrons e se o mesmo é limitado pela difusão de massa do analito para a superfície do eletrodo ou por transferência de elétrons na própria superfície do eletrodo, o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx foi testado em diferentes velocidades de varredura e o resultado está na Figura 48 e na Figura 49, a qual apresenta a relação entre as correntes dos picos redox e as velocidades de varredura.

Figura 48 – Voltametrias cíclicas do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx em velocidades de varredura variando de 30 a 150 mV/s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. As setas indicam o sentido das varreduras.



Analisando a Figura 48 percebe-se que há um deslocamento nos potenciais dos picos anódicos e catódicos conforme aumenta-se a velocidade de varredura. Esse deslocamento é característico de sistemas quase reversíveis, onde os dois processos de transferência de carga ocorrem simultaneamente (INZELT, 2008). Além disso, não se percebe uma boa relação linear entre as correntes de pico e as velocidades de varredura, ou entre as correntes de pico e a raiz quadrada das velocidades, como ilustrado na Figura 49. Desta forma, não é possível afirmar que somente um dos dois processos (difusão ou transferência de elétrons) limita o processo de geração da corrente elétrica.

Figura 49 - Relação entre as correntes dos picos anódicos e catódicos com (a) velocidades de varredura e (b) raiz quadrada da velocidade de varredura, com suas respectivas linhas de tendência e equações características.



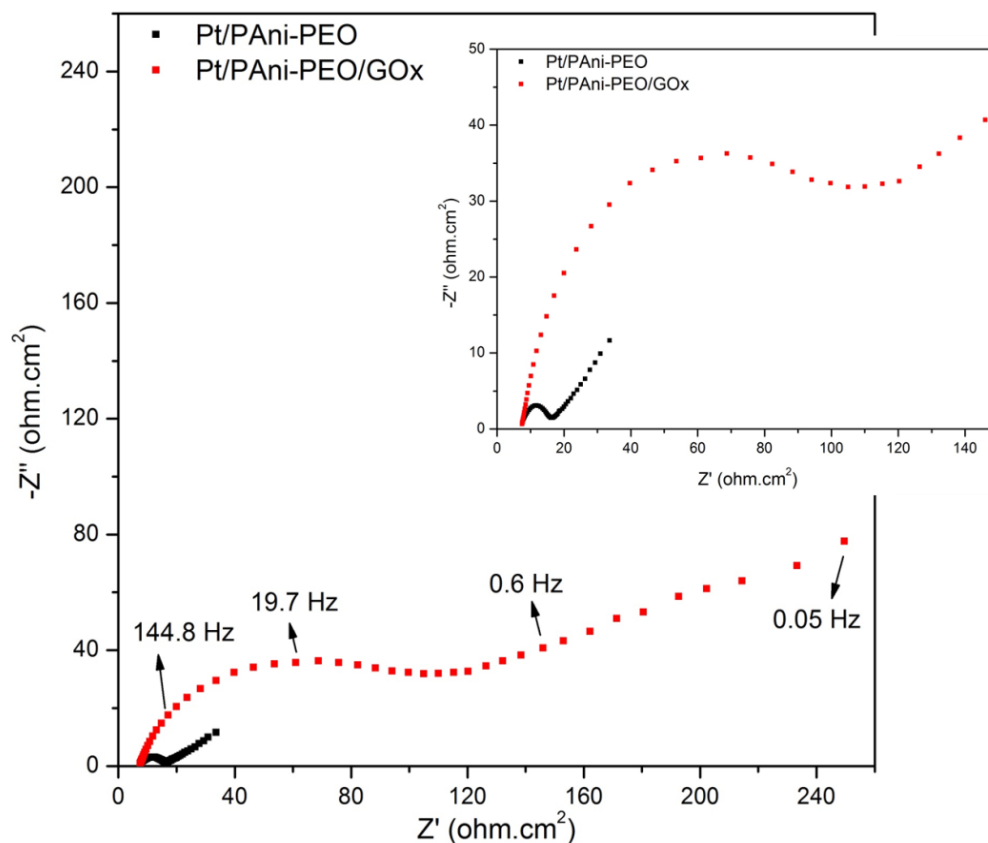
5.2.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi outra técnica utilizada para compreender os fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo. O ensaio foi realizado para o polímero e para o biossensor, ou seja, o polímero com a camada de GOx aplicada em sua superfície. Os diagramas de Nyquist obtidos podem ser visualizados na Figura 50.

Os diagramas de Nyquist apresentados na Figura 50 possuem duas regiões distintas: um semicírculo e uma reta. Segundo Lee *et al.* (2010), o semicírculo na região de alta frequência corresponde aos processos de transferência de elétrons, enquanto que a região linear em baixas frequências representa os processos de difusão. Além disso, o diâmetro do semicírculo é igual à resistência à transferência de carga do processo, o que determina as características da interface do eletrodo.

Analisando a Figura 50 percebe-se que a resistência à transferência de cargas para a Pt/PAni-PEO é de apenas 9Ω , enquanto que para a Pt/PAni-PEO/GOx esta resistência é de 105Ω . Este resultado está de acordo com o encontrado por outros autores (FENG *et al.*, 2015; SHAN *et al.*, 2008) e indica que houve uma efetiva imobilização da GOx sobre e entre a estrutura do polímero. A GOx é uma macromolécula com um alto valor de resistência elétrica, o que gera um obstáculo tanto no processo de transferência de elétrons (aumento do semicírculo), quanto no processo de difusão (diminuição da inclinação da reta na região linear do diagrama de Nyquist) (TANG; LI; ZENG, 2015).

Figura 50 – Diagrama de Nyquist da PAni-PEO aplicada sobre o eletrodo de Pt (Pt/PAni-PEO) e do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx. A inserção representa um detalhe da região de alta frequência. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$.



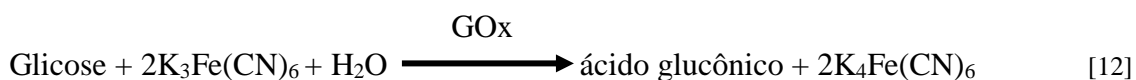
5.2.1.3 Cronoamperometrias

Após a otimização dos parâmetros de produção do biossensor e sua prévia caracterização, foram realizados os ensaios de cronoamperometria para efetiva detecção da glicose.

Segundo Feng *et al.* (2015), o potencial aplicado e o pH do eletrólito nos ensaios de cronoamperometria são dois fatores importantes e que tem influência na resposta de corrente do biossensor produzido, sendo que o pH do eletrólito já foi definido previamente nos ensaios de voltametria cíclica. Já o potencial a ser aplicado está diretamente relacionado com os potenciais de oxidação e redução do sistema, havendo variação em relação aos picos máximos devido à natureza estática da polarização aplicada (WISITSORAAT *et al.*, 2013).

Para definir o potencial ótimo dos ensaios de cronoamperometria foram consideradas as Equações 12 e 13 (Xu *et al.*; 2005) como sendo um possível mecanismo de detecção da glicose utilizando o $K_3Fe(CN)_6$ como mediador e a PAni-PEO atuando somente como matriz de imobilização da GOx e facilitadora na transferência de elétrons. Na Equação 12, a glicose é

oxidada à ácido glucônico, pela GOx, e o íon ferricianeto recebe os dois elétrons resultantes desta reação e se reduz para íon ferrocianeto. Por fim, os íons ferrocianeto são oxidados a ferricianeto pelo eletrodo anódico, ou seja, através da aplicação do potencial de oxidação do sistema, liberando dois elétrons (Equação 13). Considerando este mecanismo, o potencial ótimo para a detecção de glicose deve ser um potencial de oxidação.

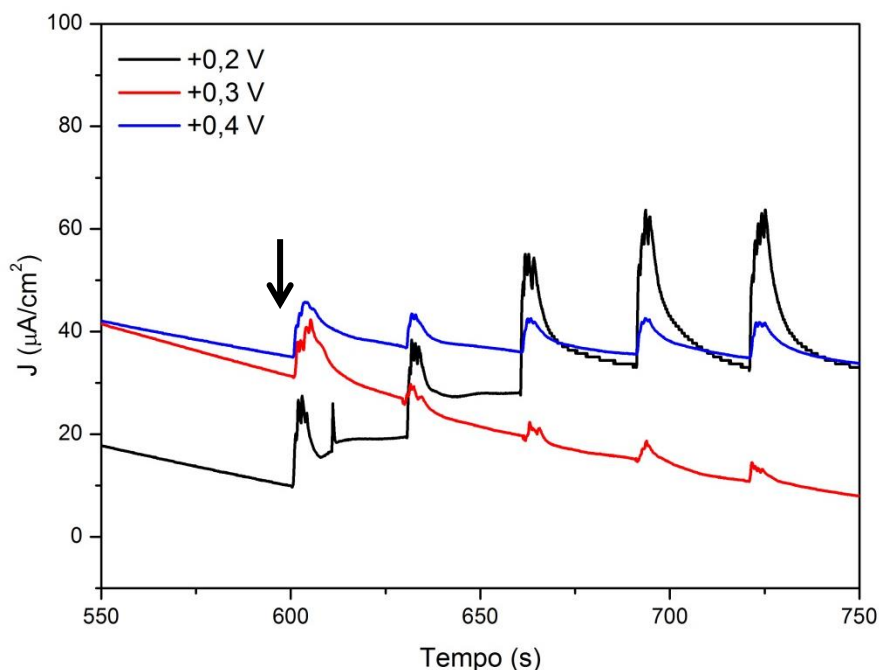


Analisando a Figura 47 (b) (página 73), que mostra uma voltametria cíclica do biossensor em presença de 1 mM de glicose, é possível observar que há um grande aumento na intensidade da corrente anódica no intervalo de potencial de +0,2 V a +0,4 V, indicando uma boa faixa de potenciais de oxidação para a detecção da glicose.

Desta forma, foram realizadas cronoamperometrias com o biossensor de Pt/PAni-PEO-GOx nos potenciais de +0,2 V, +0,3 V e +0,4 V, com a adição de 0,5 mM de glicose a cada 60 s, a fim de identificar em qual potencial o biossensor apresentaria a melhor resposta de detecção do analito.

As cronoamperometrias estão apresentadas na Figura 51, onde observa-se que ao realizar o ensaio aplicando o potencial de +0,3 V, a corrente elétrica decai constantemente a cada adição de glicose, sem apresentar um patamar de estabilização. No caso do ensaio com aplicação de +0,4 V, a corrente permanece praticamente constante a cada adição de glicose, com um pequeno incremento, o que significa que o sistema não tem grande sensibilidade para a detecção de glicose neste potencial. Já quando o ensaio foi realizado sob a aplicação de +0,2 V, observa-se um pico e a estabilização da corrente após a adição das alíquotas de glicose. Este incremento de corrente entre as adições está relacionado com a detecção de glicose. Portanto, este foi o potencial escolhido para realizar os demais ensaios de cronoamperometria.

Figura 51 – Cronoamperometrias do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a escolha do potencial de detecção da glicose. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. A seta indica a primeira adição de 0,5 mM de glicose.



Com a definição do potencial a ser aplicado nos ensaios de cronamperometria, os mesmos foram realizados com 10 biossensores diferentes, com adições de glicose equivalentes a 1 mM a cada 30 segundos. A Figura 52 mostra uma destas curvas de cronamperometria onde se percebe que cada adição de glicose resulta na formação de um pico de corrente e de um patamar de estabilização, o que confirma que está havendo a detecção da glicose catalisada pela GOx, com o auxílio do mediador $K_3Fe(CN)_6$ e da PAni-PEO.

A partir da curva da Figura 52 e dos demais biossensores testados, foi possível construir a curva característica ou curva de calibração de detecção de glicose do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, a qual relaciona a concentração de glicose com a densidade de corrente de estabilização após cada adição do analito. A curva de calibração e a respectiva equação da reta podem ser visualizadas na Figura 53.

Figura 52 – Cronoamperometria para detecção de glicose, com adições sucessivas de glicose 1 mM a cada 30 s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,2 V.

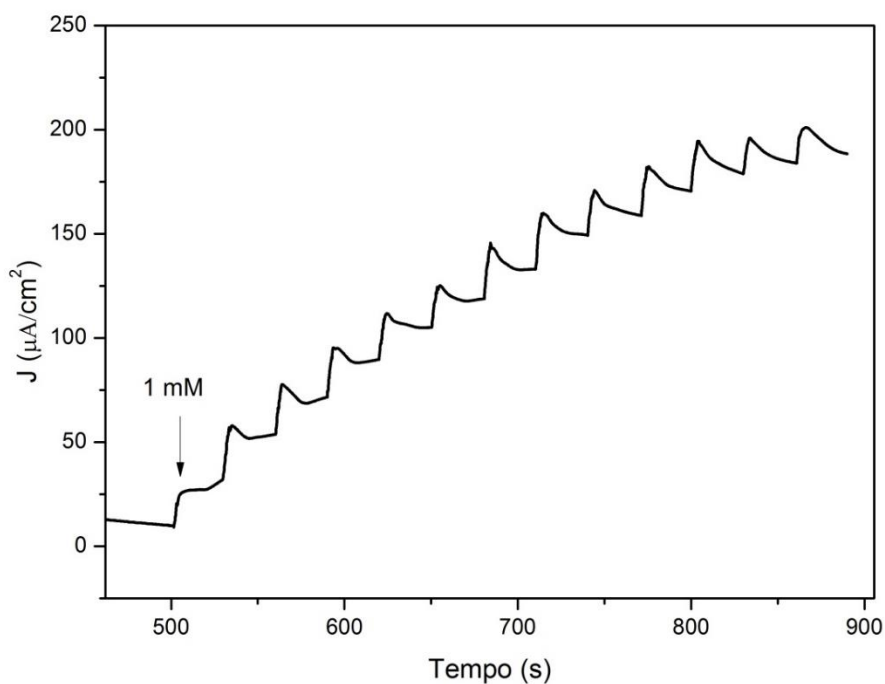
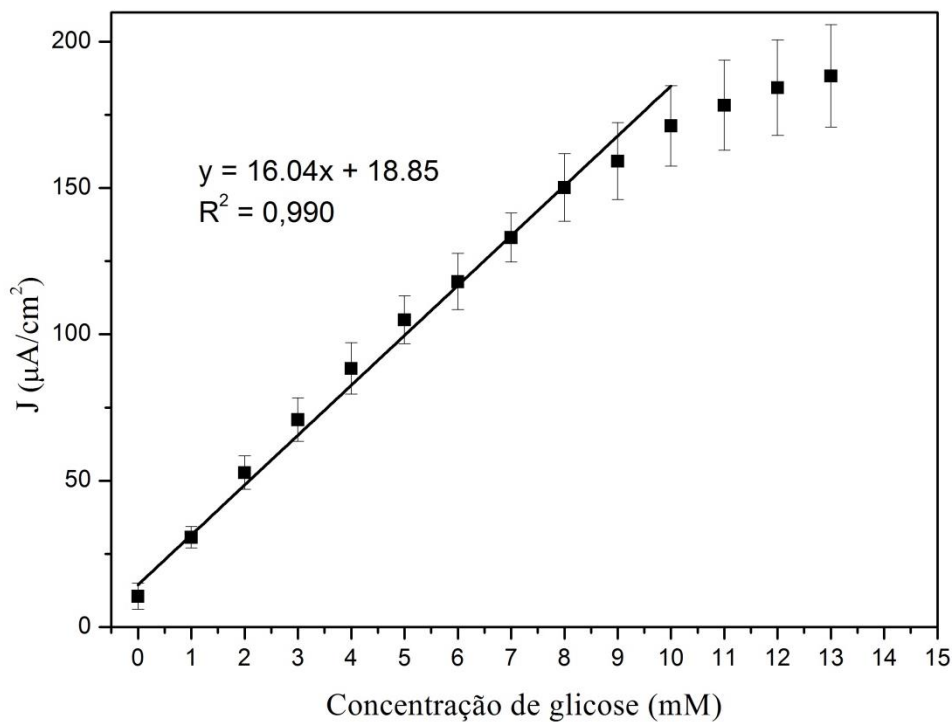


Figura 53 – Curva de calibração do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a detecção de glicose, com sua respectiva equação característica.



Analisando a Figura 53, verifica-se uma relação linear entre a densidade de corrente e a

concentração de glicose na faixa de 1 a 10 mM ($R^2 = 0,990$), com tempo de resposta de 10 s. A partir de 10 mM, a relação começa a se afastar da linearidade em mais de 5% e, além disso, começa a aumentar o desvio padrão entre as medidas, o que diminui a confiabilidade e sensibilidade do sensor (SKOOG *et al.*, 2006).

A concentração de glicose no sangue de uma pessoa que não tem diabetes se encontra na faixa de 70 a 120 mg/dL, o que equivale a 4 a 8 mM. Já os diabéticos, apresentam uma faixa bem mais ampla, de 30 a 500 mg/dL ou 2 a 30 mM (HELLER; FELDMAN, 2008). Desta forma, o biossensor produzido poderia ser utilizado apenas por pessoas saudáveis, o que limita a sua aplicação.

A sensibilidade, obtida da inclinação da reta de calibração, foi determinada como sendo de $16,04 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e o limite de detecção (LOD), calculado considerando uma relação sinal/ruído de 3, foi determinado como 0,82 mM. Já a constante de Michaelis-Menten (K_m) foi calculada como 18,14 mM. Conforme já discutido na Seção 3.3.2, há divergências quanto ao valor de K_m , sendo que a maioria dos autores afirma que quanto menor este valor, maior a afinidade da enzima pelo substrato (GVOZDENOVIC *et al.*, 2011). Já Shan *et al.* (2008) também encontraram um valor de K_m de 18 mM, o qual segundo os autores é um valor próximo ao K_m da enzima GOx livre (12,4 mM), indicando que não há desnaturação da mesma no processo de imobilização.

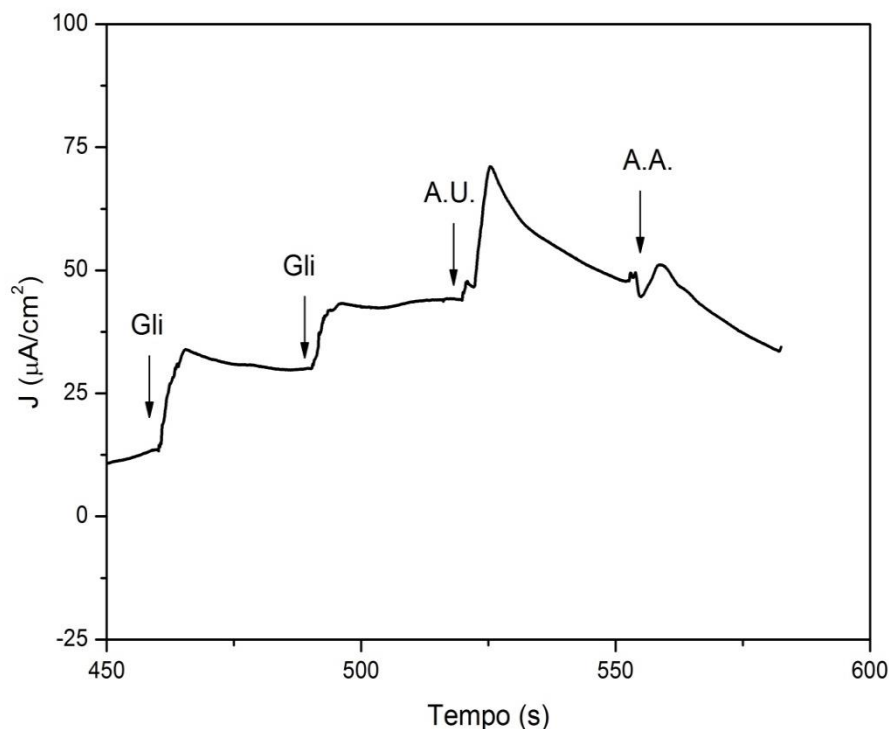
Ainda, pela equação da reta de calibração apresentada na Figura 53 é possível determinar a equação característica do biossensor. Para isso, basta considerar, na equação da reta, a variável “y” como sendo a densidade de corrente J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) e a variável “x” como sendo a concentração de glicose C (mM), e rearranjar a equação em função da incógnita C , obtendo a Equação 14:

$$C = \frac{J - 18,85}{16,04} \quad [14]$$

Outro parâmetro a ser analisado no biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx é a sua especificidade ou seletividade à presença de interferentes. Para isto, foi realizado um ensaio de cronoamperometria onde os interferentes ácido úrico (A.U.) e ácido ascórbico (A.A.) foram adicionados, na concentração de 0,2 mM, já que esta é uma concentração fisiológica normal no sangue humano, podendo ser até inferior a este valor (CHOWDHURY; GANGOPADHYAY; DE, 2014). Já a glicose (Gli) foi adicionada na concentração de 1 mM. O resultado está

apresentado na Figura 54.

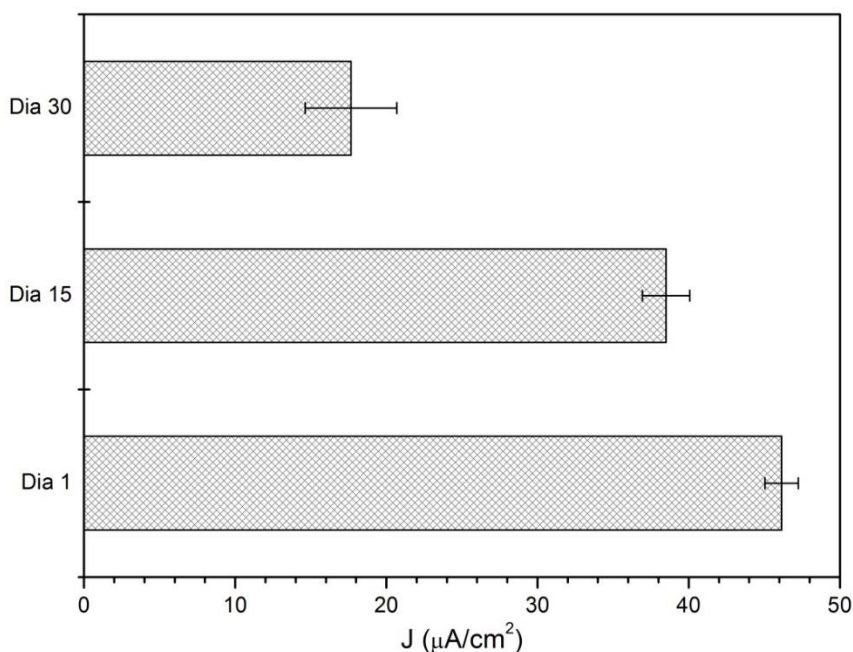
Figura 54 – Cronoamperometria do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx para a detecção dos interferentes ácido úrico (A.U.) e ácido ascórbico (A.A.), ambos com concentração de 0,2 mM e de glicose (Gli) 1 mM. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,2 V.



Na Figura 54 observa-se que, ao adicionar 1 mM de glicose no eletrólito, ocorre a formação de um patamar de corrente. Já na adição do ácido úrico até se forma um pico, mas em seguida há o decréscimo da densidade de corrente, sem estabilização. O mesmo ocorre para a adição de ácido ascórbico, onde não há formação de patamar de corrente. No entanto, não é possível afirmar que o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx apresenta seletividade, já que verifica-se uma perturbação no sistema devido à presença dos interferentes.

Por fim, foi determinado o tempo de vida útil ou estabilidade do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx. Este ensaio foi descrito na Seção 4.5.3 deste trabalho e consistiu na comparação da resposta de corrente para uma medida de 2 mM de glicose no primeiro dia de produção do biossensor, após 15 dias e após 30 dias de produção. O resultado pode ser visualizado na Figura 55.

Figura 55 – Estabilidade do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx após armazenamento por 4 semanas.



Analisando a Figura 55 é possível observar que ocorre um decréscimo significativo no valor da densidade de corrente medida entre o primeiro e o trigésimo dia. Após 15 dias de armazenamento na geladeira, a aproximadamente 4°C , a resposta de corrente atingiu 83,4% da resposta original. Após 30 dias, foi atingido apenas 38% da corrente medida no primeiro dia de produção do biossensor. Tang, Li e Zeng (2015) também produziram um biossensor de glicose e encontraram 81,7% da resposta de corrente após 30 dias de armazenamento, enquanto Miao *et al.* (2015) encontraram 89,9% da resposta original de corrente em um período de 15 dias.

A principal razão para esta queda no valor da resposta amperométrica deve-se à desnaturação da GOx, a qual não está devidamente ligada à superfície do eletrodo, mas somente adsorvida. De acordo com Sassolas, Blum e Leca-Bouvier (2012), apesar do método de imobilização enzimática por adsorção causar pouca ou nenhuma inativação da enzima, este método se baseia em ligações fracas, sendo que a enzima fica fracamente adsorvida no eletrodo, o que resulta em fácil dessorção e baixa habilidade de armazenamento.

Além da perda da GOx, pode ter ocorrido também o envelhecimento da PAni, resultando em perda de estabilidade química e eletroquímica, e conseqüentemente, em menor condutividade elétrica, como já discutido na Seção 3.3.3 deste trabalho (LAI *et al.*, 2016).

Considerando estes resultados é possível afirmar que foi produzido um biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx capaz de detectar a glicose na faixa de 1 a 10 mM (18 a 180 mg/dL), com o

auxílio do mediador $K_3Fe(CN)_6$ e da PANi-PEO, como matriz de imobilização da enzima GOx. No entanto, mais esforços devem ser realizados com o intuito de aumentar a faixa de detecção e melhorar a ligação da enzima à superfície do eletrodo.

5.2.2 *Biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx*

5.2.2.1 *Voltametria cíclica*

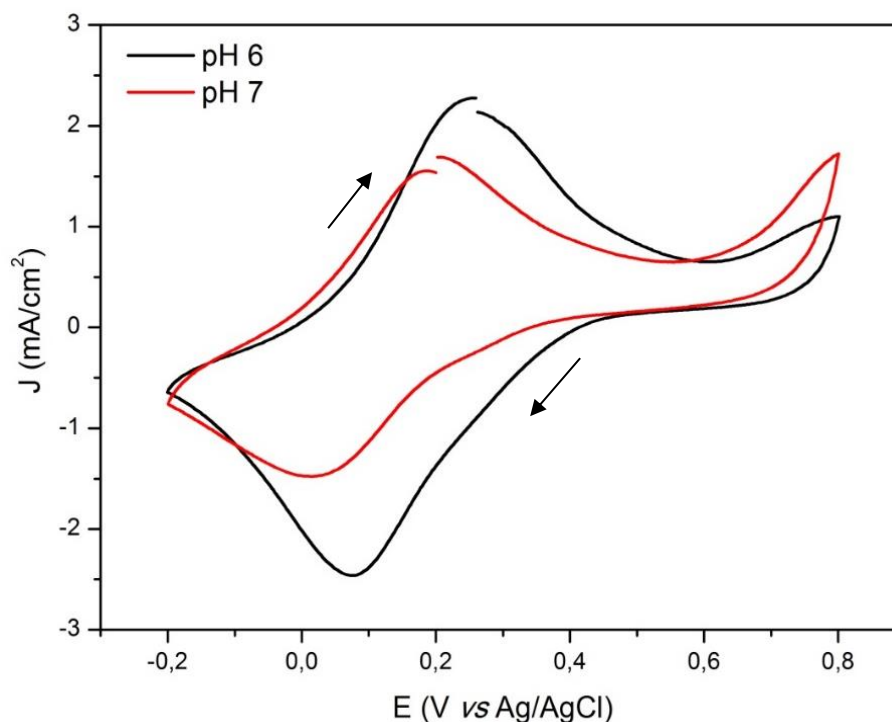
Os ensaios de voltametria cíclica para otimização dos parâmetros de produção do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx foram realizados conforme apresentado na Tabela 5 da Seção 4.5.1 deste trabalho. Assim como para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, o primeiro ensaio realizado foi para determinar o eletrólito mais adequado para realizar os demais ensaios eletroquímicos. Para isso, foram testadas soluções de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 e 7.

Para a produção dos biossensores de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx a serem ensaiados nos diferentes eletrólitos foi aplicado, primeiramente, 7 μ L da dispersão de PANi-PEO-NPAu sobre a área de trabalho do eletrodo de carbono. Este volume foi escolhido por ser suficiente para cobrir a área do eletrodo de trabalho. Após a secagem da PANi-PEO-NPAu em estufa a 60°C, aplicou-se 7 μ L de uma solução de GOx com concentração de 25 mg/mL, o que resulta em 50 U/cm². Da mesma forma que para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, esta concentração foi baseada no estudo de outros trabalhos (FENG *et al.*, 2015; MIAO *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2014).

Nos eletrólitos ensaiados foi colocado 5 mM do mediador redox $K_3Fe(CN)_6$, também com base na concentração utilizada em outros trabalhos (ZHU *et al.*, 2015; WU; YIN, 2011; SONG *et al.*, 2010). Os voltamogramas obtidos com os dois eletrólitos ensaiados podem ser observados na Figura 56.

Analisando a Figura 56 verifica-se que, em ambos os eletrólitos, o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx apresenta eletroatividade, com a formação de um par de picos de oxidação e redução. No entanto, ao realizar o ensaio no eletrólito de solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, os picos de oxidação e redução apresentam maior densidade de corrente, indicando maior eletroatividade neste eletrólito. Desta forma, este foi o eletrólito escolhido para realização dos demais ensaios eletroquímicos subsequentes.

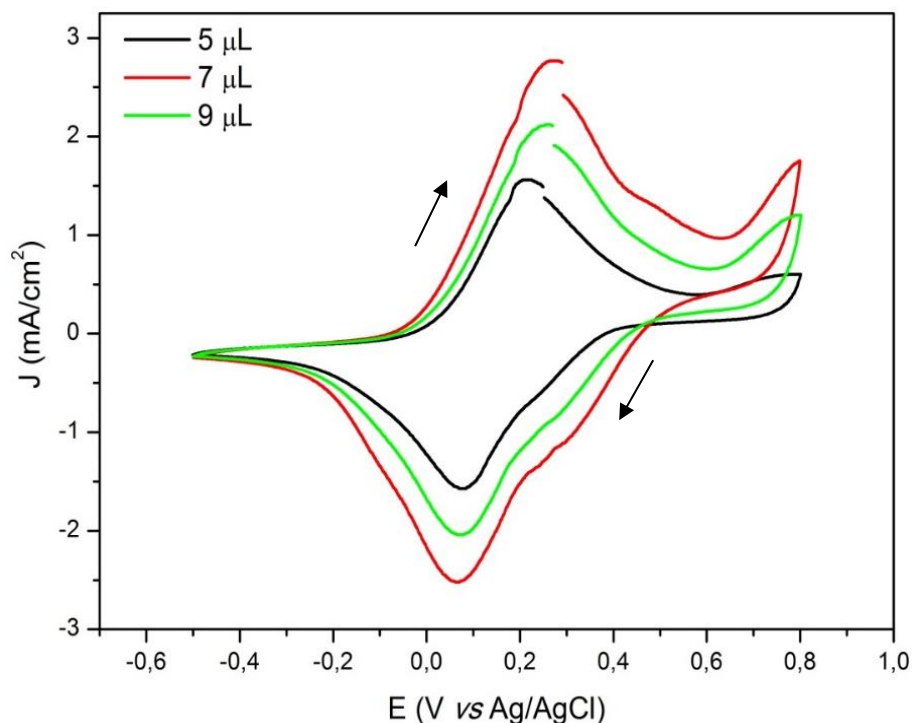
Figura 56 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-AuNP/GOx em função do pH do eletrólito. Eletrólitos: solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6 ou pH 7, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



Após a determinação do eletrólito, foi verificada a quantidade ótima de polímero PAni-PEO/NPAu a ser aplicada sobre o eletrodo de forma a resultar em um máximo sinal de atividade eletroquímica. Para este ensaio, foram preparados eletrodos de carbono contendo 5, 7 e 9 μL de PAni-PEO/NPAu, os quais foram secos em estufa a 60°C. Após a secagem, foi aplicado 7 μL de uma solução de GOx com concentração de 25 mg/mL, seguido de secagem do eletrodo a 30°C. Os ensaios de voltametria cíclica foram realizados no eletrólito de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 5 mM de mediador redox $K_3Fe(CN)_6$.

Os resultados deste ensaio podem ser visualizados na Figura 56, na qual observa-se que, quando aplicado somente 5 μL de PAni-PEO/NPAu a densidade de corrente dos picos de oxidação e redução é menor, em comparação aos biossensores com 7 e 9 μL de polímero. Da mesma forma que ocorreu com o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, ao aumentar a quantidade de polímero depositada sobre o eletrodo de trabalho de 7 para 9 μL , ocorreu um decréscimo da densidade de corrente nos picos redox, a qual pode estar associada com a maior espessura do filme sobre a área de trabalho, o que dificulta a transferência de elétrons do meio para a superfície do eletrodo (XU *et al.*, 2013). Desta forma, a quantidade de polímero escolhida para ser aplicada sobre o eletrodo de trabalho nos ensaios seguintes é de 7 μL .

Figura 57 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função do volume de PAni-PEO-NPAu aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 5 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



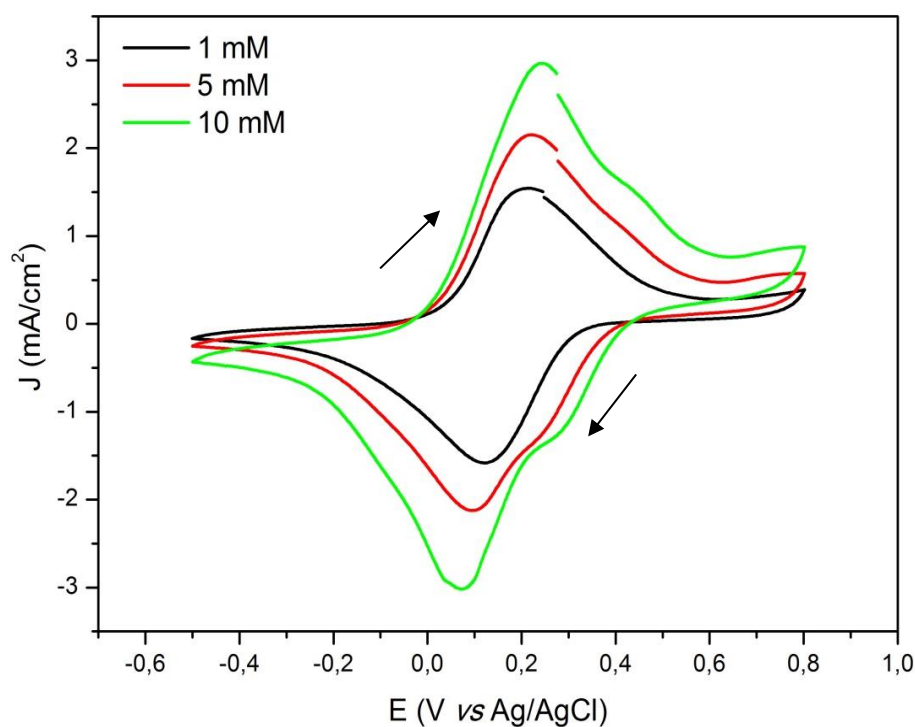
Na sequência dos ensaios de voltametria cíclica para a otimização dos parâmetros de construção do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, foi avaliada a quantidade de mediador redox a ser adicionada ao eletrólito, nos ensaios eletroquímicos. Assim como para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, o mediador redox foi utilizado em solução, junto com o eletrólito, já que quando aplicado sobre a superfície do eletrodo ocorria a sua dessorção, prejudicando a resposta dos ensaios eletroquímicos. Foram testadas as concentrações de 1, 5 e 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$ como mediador redox solubilizado na solução de tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6.

Para estes ensaios, os eletrodos foram produzidos com 7 μ L de PAni-PEO-NPAu aplicado sobre a área do eletrodo de trabalho, seguido de secagem a 60°C. Após, 7 μ L de uma solução de GOx com concentração de 25 mg/mL foi aplicada sobre a camada de polímero já seca e levada para secar em estufa a 30°C.

A Figura 58 apresenta os resultados deste ensaio. Pode-se observar que, conforme aumenta a quantidade de mediador redox no eletrólito, maior a atividade eletroquímica do sistema, pois maior a densidade de corrente dos picos de oxidação e de redução. Desta forma, ao utilizar 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito, proporciona-se uma melhor resposta

eletroquímica do biossensor, e por este motivo esta foi a concentração escolhida para ser utilizada nos ensaios eletroquímicos seguintes.

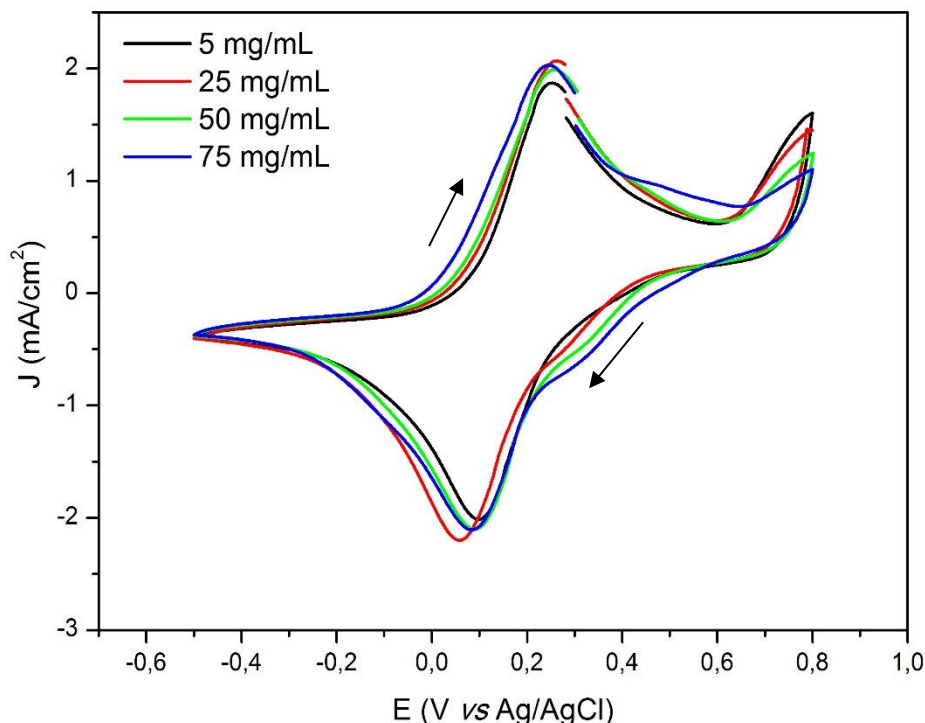
Figura 58 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função da concentração de mediador redox $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 1, 5 ou 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



Por fim, foi determinada a quantidade de enzima a ser imobilizada no biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu. Nos ensaios anteriores foi aplicado 7 μ L de uma solução de GOx com concentração de 25 mg/mL. Para este ensaio, esta concentração foi variada em 5, 25, 50 e 75 mg/mL, o que resultaria em 10, 50, 100 e 150 U/cm².

Os eletrodos a serem ensaiados foram produzidos com a aplicação de 7 μ L de PAni-PEO-NPAu, seguido de secagem em estufa a 60°C. Após, foi aplicado 7 μ L das diferentes soluções de GOx, seguido de secagem em estufa a 30°C. O eletrólito dos ensaios foi a solução de tampão de fosfato de sódio pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Os voltamogramas resultantes podem ser observados na Figura 59.

Figura 59 - Voltamogramas cíclicos do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em função da concentração de GOx aplicada no biossensor. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.



Analisando a Figura 59 observa-se que os voltamogramas apresentam o mesmo perfil, com um leve deslocamento do pico de redução para potenciais menores, conforme altera-se a quantidade de enzima sobre o eletrodo. Apesar das diferenças na quantidade de enzima, a densidade de corrente dos picos não muda significativamente, sendo que as concentrações de 25, 50 e 75 mg/mL resultam aproximadamente na mesma densidade de corrente do pico anódico. Este fato está relacionado com a camada de enzima depositada sobre o eletrodo, a qual é isolante. Portanto, uma maior quantidade de enzima não significa necessariamente maior eficiência do biossensor na detecção e transporte de corrente do meio para o eletrodo, pois a camada muito espessa de GOx acaba prejudicando este transporte. Desta forma, para os demais ensaios eletroquímicos foi escolhida a concentração de 25 mg/mL para a solução de GOx a ser aplicada sobre o eletrodo de trabalho.

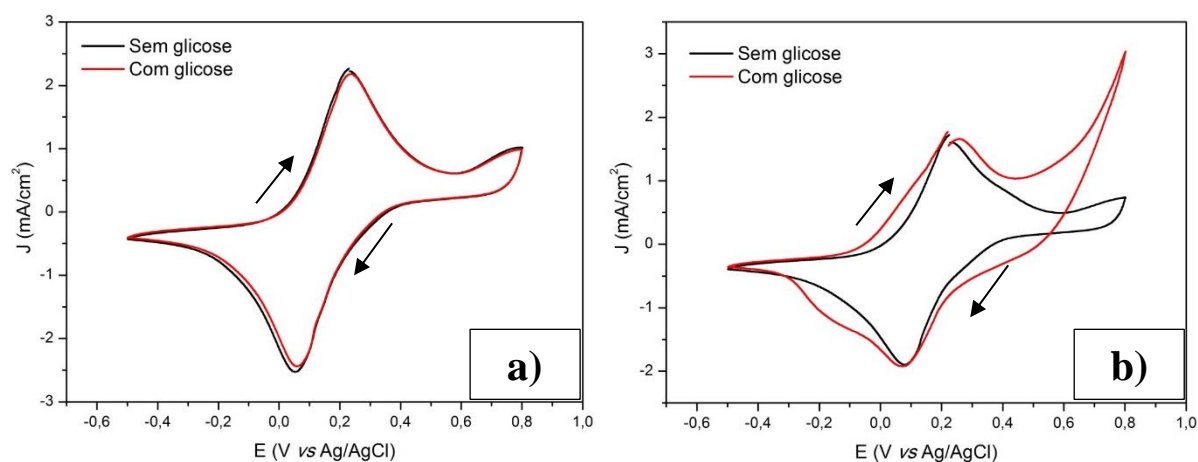
A partir destes ensaios preliminares de voltametria cíclica foi possível determinar os parâmetros de produção dos biossensores de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, os quais estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros otimizados para a produção do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx e para realização dos ensaios eletroquímicos.

Biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx	
Quantidade de PAni-PEO	7 μ L
Quantidade de GOx	7 μ L – 25 mg/mL
Eletrólito dos ensaios eletroquímicos	Tampão fosfato de sódio pH 6
Concentração de mediador $K_3Fe(CN)_6$ no eletrólito	10 mM

Com o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx já produzido, foram realizados ensaios de voltametria cíclica a fim de verificar se o polímero por si só ou se o polímero com a enzima (biossensor), tem algum efeito catalítico sobre a glicose. Para isso, os ensaios de voltametria cíclica foram realizados com o eletrodo contendo apenas o polímero (EC/PAni-PEO-NPAu) e com o biossensor (EC/PAni-PEO-NPAu/GOx), na ausência e na presença de 1 mM de glicose no eletrólito. Os resultados podem ser observados na Figura 60.

Figura 60 - Voltamogramas cíclicos da (a) EC/PAni-PEO-NPAu e (b) EC/PAni-PEO-NPAu/GOx na ausência e na presença de 1 mM de glicose no eletrólito. Eletrólito: solução tampão fosfato de sódio 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Velocidade de varredura: 30 mV/s. As setas indicam o sentido da varredura.

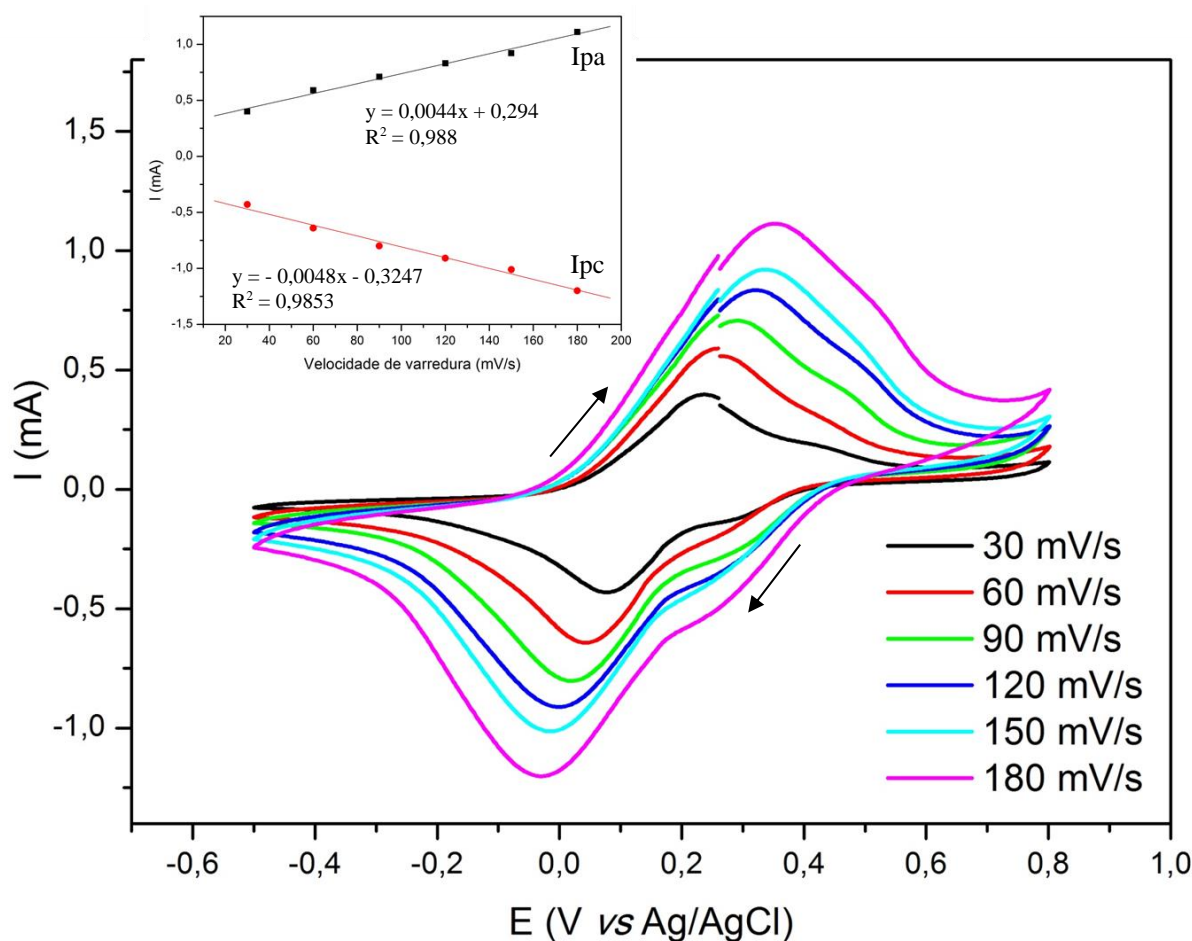


Analisando a Figura 60 (a) observa-se que a atividade eletroquímica do EC/PAni-PEO-NPAu se mantém a mesma na presença ou na ausência de 1 mM de glicose no eletrólito, o que significa que o polímero sozinho não é influenciado pela presença de glicose e não participa da sua detecção (FENG *et al.*, 2015). Ao contrário, quando há a presença de GOx no eletrodo (Figura 60 (b)) observa-se que o perfil do voltamograma se modifica, sendo que a intensidade

das correntes de oxidação aumenta significativamente, confirmando que com a presença de GOx ocorre a detecção de glicose, através da sua oxidação.

Assim como foi realizado para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, para o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx também foi estudado o processo de transferência de elétrons e se o mesmo é limitado pela difusão de massa do analito para a superfície do eletrodo ou por transferência de elétrons na própria superfície do eletrodo. Para isso, o biossensor foi submetido a ensaios de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura. O resultado está na Figura 61.

Figura 61 - Voltametrias cíclicas do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx em velocidades de varredura variando de 30 a 150 mV/s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M com pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. As setas indicam o sentido das varreduras. A inserção representa a relação entre as correntes dos picos anódicos (I_{pa}) e catódicos (I_{pc}) com as velocidades de varredura, além das suas respectivas linhas de tendência e equações características.



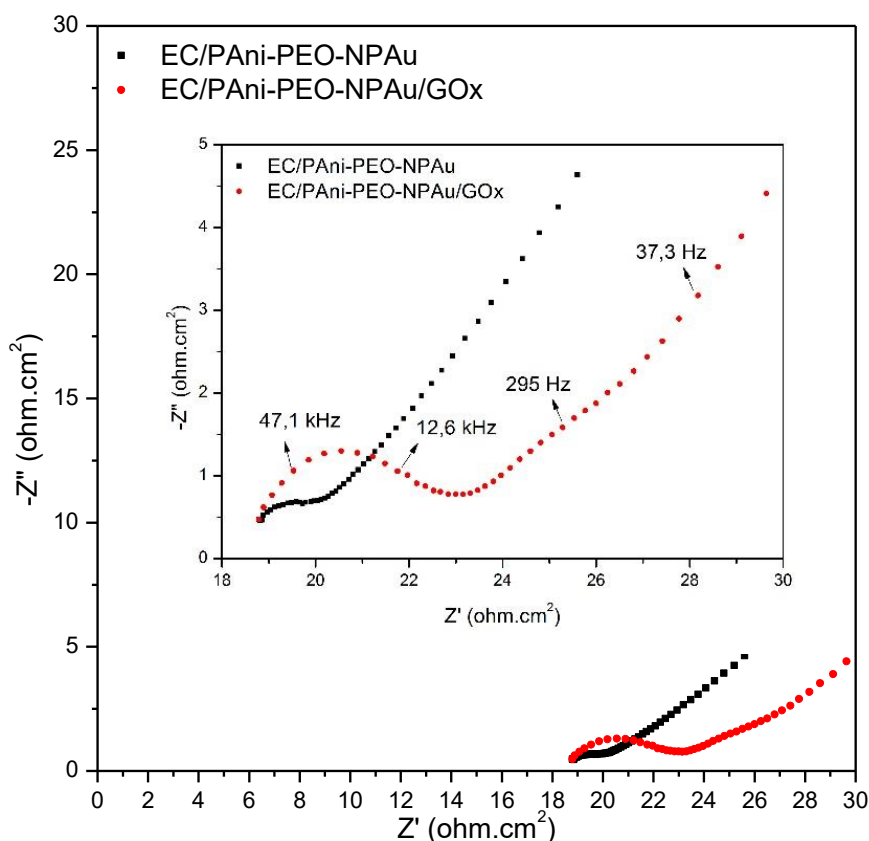
Na Figura 61 observa-se que com o aumento da velocidade de varredura há um aumento também na corrente dos picos anódico e catódico, com um leve deslocamento para potenciais

positivos, no caso do pico anódico, e potenciais mais negativos no caso do pico catódico. Na inserção da Figura 61 verifica-se uma relação linear entre estas correntes e a velocidade de varredura, com um bom coeficiente de correlação. Conforme discutido na Seção 3.1.3.1 deste trabalho, uma dependência linear da corrente de pico com a velocidade de varredura mostra que o processo não é limitado pela difusão, mas sim pela transferência de elétrons, inferindo também que o polímero está bem aderido à superfície do eletrodo (CASADO et al., 2016).

5.2.2.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A fim de compreender ainda mais os fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo, foi realizado o ensaio de espectroscopia de impedância eletroquímica. Foram ensaiados os eletrodos contendo apenas o polímero e eletrodos contendo o polímero e a enzima GOx, constituindo o biossensor produzido seguindo os parâmetros otimizados pelos ensaios de voltametria cíclica, apresentados na Tabela 7. Os diagramas de Nyquist podem ser visualizados na Figura 62.

Figura 62 - Diagrama de Nyquist da PANi-PEO-NPAu aplicada sobre o eletrodo de carbono (EC/PAni-PEO-NPAu) e do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx. A inserção representa o gráfico em outra escala. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$.



Analisando a Figura 62 verifica-se que a resistência à transferência de cargas para o eletrodo contendo apenas o polímero (EC/PAni-PEO-NPAu) é de aproximadamente 2Ω , enquanto que para o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx esta resistência é de 4Ω . Como já discutido na Seção 5.2.1.2, os semicírculos com menor diâmetro indicam uma menor resistência à transferência de cargas. Além disso, a inclinação da reta na região de baixa frequência fornece uma estimativa da resistência à difusão no eletrólito (SK; YUE, 2014).

Portanto, o maior diâmetro do semicírculo e menor inclinação da reta na região de baixas frequências, confirma a imobilização efetiva da GOx na superfície do eletrodo, já que a enzima tem caráter isolante, agregando maior resistência elétrica ao sistema.

5.2.2.3 Cronoamperometria

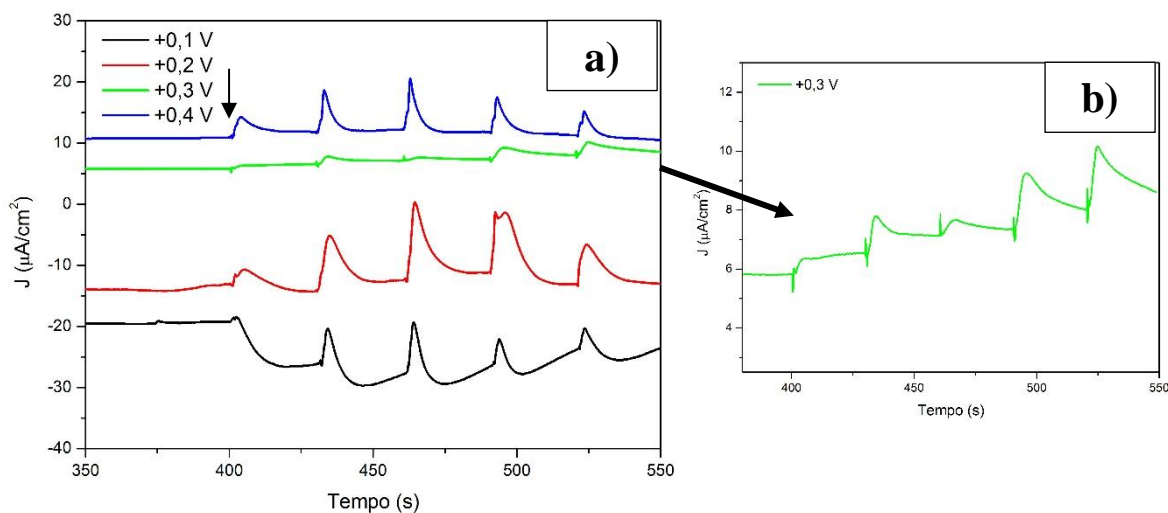
Após a otimização dos parâmetros de construção do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx e sua prévia caracterização através dos ensaios de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica para verificar a efetiva imobilização da enzima GOx e seu efeito catalítico sobre a glicose, foram realizados os ensaios de cronoamperometria, conforme explicado na Seção 4.5.3 deste trabalho.

Como discutido previamente, o potencial em que os ensaios de cronoamperometria serão realizados é um parâmetro muito importante, já que interfere na resposta de corrente obtida. Segundo Wisitorsaat *et al.* (2013) este valor de potencial está associado aos potenciais de oxidação do sistema que está sendo avaliado.

A partir deste princípio foi analisado o voltamograma da Figura 60 (b), que refere-se ao biossensor na presença e ausência de glicose, onde verifica-se que há um aumento na densidade de corrente de oxidação nos potenciais que variam de $+0,1 \text{ V}$ a $+0,4 \text{ V}$. Desta forma, foram realizados ensaios de cronoamperometria nestes potenciais, com o intuito de selecionar o potencial que resultasse em uma melhor curva amperométrica.

Estes ensaios de cronoamperometria foram realizados com biossensores de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx produzidos conforme os parâmetros apresentados na Tabela 7. O eletrólito utilizado nos ensaios foi a solução de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ M}$ com pH 6, contendo 10 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Foram adicionadas alíquotas de glicose em uma concentração resultante de $0,5 \text{ mM}$, a cada 30 s . Os resultados podem ser visualizados na Figura 63.

Figura 63 – (a) Cronoamperometrias do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a escolha do potencial de detecção da glicose. A seta indica a primeira adição de 0,5 mM de glicose, (b) Cronoamperometria do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx aplicando-se o potencial de +0,3 V. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$.



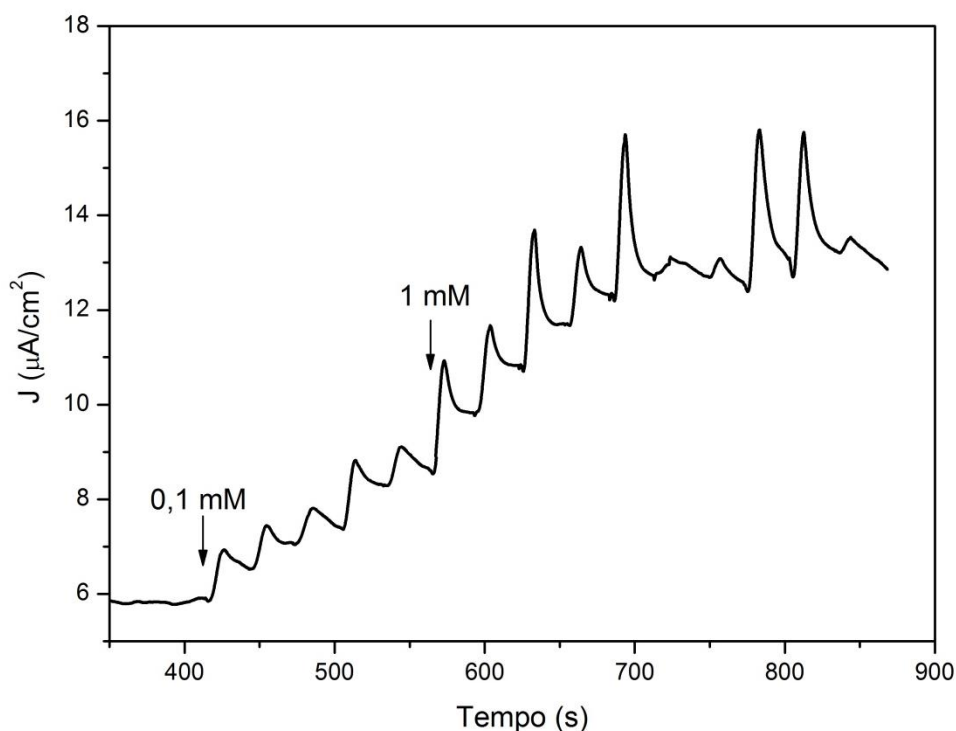
Na Figura 63 (a) é possível observar que quando o ensaio de cronoamperometria foi realizado aplicando-se um potencial de +0,1 V, há um decréscimo no valor de corrente após cada adição de glicose, no entanto a corrente não se mantém estável após as adições e não há uma relação entre a adição de glicose e o sinal elétrico gerado. Já nos ensaios aplicando-se +0,2, +0,3 e +0,4 V percebe-se um pequeno incremento e estabilização da corrente após as adições de glicose, sendo que este incremento de corrente é maior quando aplica-se o potencial de +0,3 V (Figura 62 (b)). Desta forma, o potencial escolhido para realizar os demais ensaios de cronoamperometria foi +0,3 V, já que é possível estabelecer uma relação entre a adição de glicose e o acréscimo de corrente, indicando maior sensibilidade do biossensor à detecção do analito neste potencial elétrico.

Após a definição do potencial ótimo a ser aplicado nos ensaios de cronoamperometria, os mesmos foram realizados com 10 biossensores diferentes, com adições de glicose com concentrações equivalentes a 0,1 mM e 1 mM a cada 30 segundos. Estas concentrações foram escolhidas com base em ensaios preliminares, onde verificou-se que o sistema era sensível a concentrações pequenas, da ordem de 0,1 mM.

A Figura 64 mostra uma destas curvas de cronoamperometria onde se percebe que cada adição de glicose resulta na formação de um pico de corrente seguido de um decréscimo e, em algumas adições, de uma estabilização da corrente. As respostas de corrente a cada adição de glicose não são tão regulares quanto aquelas apresentadas pelo biossensor de Pt/PAni-

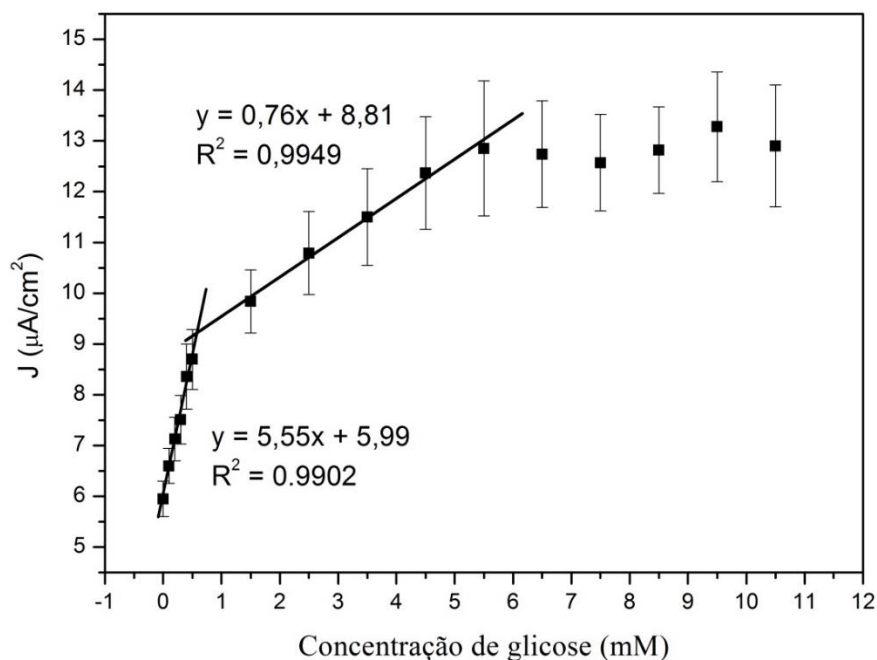
PEO/GOx, o que pode estar associado com a plataforma em que o biossensor está estruturado, que é o eletrodo de carbono contendo as tiras impressas referentes aos eletrodos de trabalho, de referência e contra eletrodo. Além disso, o ensaio configurado desta forma é bastante sensível, já que as adições de glicose são feitas com a micropipeta em uma alíquota de 120 μL do eletrólito, aplicada na superfície do eletrodo de carbono e cobrindo os três eletrodos. Este sistema miniaturizado, em que o eletrodo foi conectado ao potenciostato por um dispositivo improvisado, é bem mais sensível e suscetível a perturbações do que o sistema “robusto” utilizado no biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx.

Figura 64 - Cronoamperometria para detecção de glicose, com adições sucessivas de glicose 0,1 mM e 1 mM a cada 30 s. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Potencial aplicado: +0,3 V.



A partir da curva de cronamperometria apresentada na Figura 64 e das curvas obtidas com os demais eletrodos foi possível construir a curva característica ou curva de calibração de detecção de glicose do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, a qual relaciona a concentração de glicose com a densidade de corrente de estabilização após cada adição do analito. A curva de calibração foi separada em dois segmentos, relativos às adições de 0,1 mM e 1 mM, que resultaram em diferentes inclinações de reta. A curva de calibração e as respectivas equações da reta podem ser visualizadas na Figura 65.

Figura 65 - Curva de calibração do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a detecção de glicose, com as respectivas equações características.



Na Figura 65 verifica-se uma relação linear entre a densidade de corrente e a concentração de glicose no intervalo de 0,1 a 0,5 mM, seguindo a equação $y = 5,55x + 5,99$, com coeficiente de determinação de 0,9902. Já na faixa de 0,6 a 5,5 mM a relação entre a densidade de corrente e a concentração de glicose segue a equação $y = 0,76x + 8,81$, com coeficiente de determinação de 0,9949. A partir da concentração de 5,5 mM a relação se afasta da linearidade, indicando que não há mais sensibilidade para detecção destas concentrações. Outro fator que pode ser observado é o menor desvio padrão na detecção de menores concentrações de glicose, o que significa maior reprodutibilidade nesta faixa. O tempo de resposta do biossensor em ambas as faixas de detecção é de aproximadamente 15 s.

A partir da Figura 65 é possível afirmar que está havendo a detecção da glicose catalisada pela GOx, com o auxílio do mediador $K_3Fe(CN)_6$ e da PAni-PEO-NPAu no intervalo de 0,1 mM a 5,5 mM, cujo mecanismo foi apresentado previamente nas Equações 12 e 13. A sensibilidade do biossensor, obtida da inclinação da reta de calibração, foi determinada como sendo de $5,55 \mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ no intervalo de 0,1 a 0,5 mM e de $0,76 \mu A \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ no intervalo de 0,6 a 5,5 mM. Já o limite de detecção (LOD), calculado considerando uma relação sinal/ruído de 3, foi determinado como 0,19 mM.

Em relação à constante de Michaelis-Menten (K_m), a mesma foi calculada como sendo

0,04 mM, o que para muitos autores significa uma boa afinidade da enzima com o substrato (GVOZDENOVIĆ *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014). Segundo Das e Sarkar (2016), um baixo valor de K_m sugere uma elevada eficiência catalítica a baixas concentrações de substrato e, por conseguinte, representa uma rápida cinética de reação bioquímica.

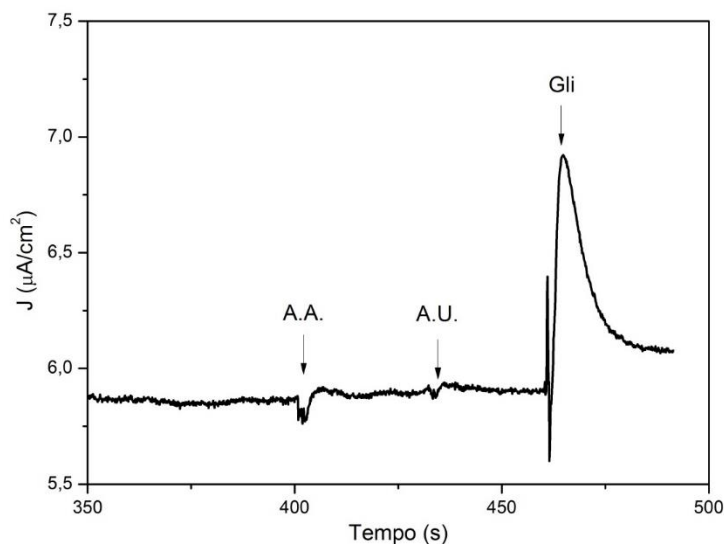
Através das equações das retas de calibração apresentadas na Figura 65 é possível determinar as equações características do biossensor. Para isso, considera-se nas equações da reta, a variável “y” como sendo a densidade de corrente J ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$) e a variável “x” como sendo a concentração de glicose C (mM). Rearranjando as equações da Figura 65 em função da incógnita C , obtém-se as Equações 15 e 16, referentes aos intervalos de concentração de 0 a 0,5 mM e 0,6 e 5,5 mM, respectivamente:

$$C = \frac{J-5,99}{5,55} \quad [15]$$

$$C = \frac{J-8,81}{0,76} \quad [16]$$

Assim como para o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, a especificidade ou seletividade à presença de interferentes foi determinada também para o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx. Para isto, foi realizado um ensaio de cronoamperometria onde os interferentes ácido úrico e ácido ascórbico foram adicionados, na concentração de 0,2 mM, por ser, como discutido anteriormente, uma concentração fisiológica normal no sangue humano, podendo ser até inferior a este valor (CHOWDHURY; GANGOPADHYAY; DE, 2014). O resultado deste ensaio está apresentado na Figura 66.

Figura 66 - Cronoamperometria do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx para a detecção dos interferentes ácido úrico (A.U.) e ácido ascórbico (A.A.), ambos com concentração de 0,2 mM e de glicose (Gli) 1 mM. Eletrólito: solução de tampão fosfato salino 0,1 M pH 6, contendo 10 mM de $K_3Fe(CN)_6$. Potencial aplicado: +0,3 V.

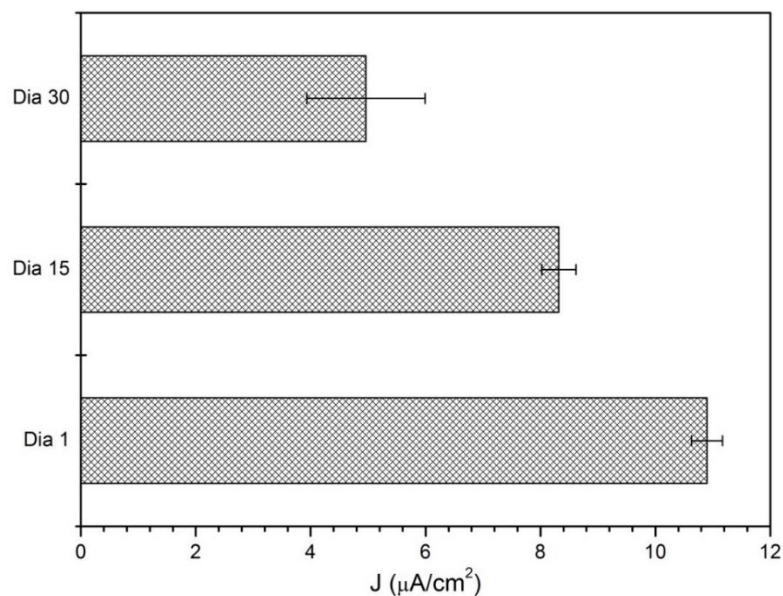


Na Figura 66 observa-se que, ao adicionar as alíquotas de ácido ascórbico e ácido úrico, não há resposta de corrente significativa, ou seja, o biossensor produzido não detecta estes interferentes. Já na adição da alíquota de 1 mM de glicose observa-se a formação de um intenso pico de corrente, seguido de um patamar de estabilização da densidade de corrente. Desta forma, é possível afirmar que o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx apresenta ótima seletividade frente às espécies interferentes. Em comparação com o biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx, o biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx apresenta melhor seletividade.

Por fim, foi determinado o tempo de vida útil ou estabilidade do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, cujo ensaio foi descrito na Seção 4.5.3 deste trabalho. O resultado deste ensaio está apresentado na Figura 67, onde observa-se que há um decréscimo significativo nos valores de densidade de corrente durante os 30 dias do ensaio. Após 15 dias de armazenamento, o biossensor apresentou 76,2% da sua resposta original e após 30 dias, apenas 45,3%.

Esta queda na resposta de corrente deve-se ao fato da enzima estar apenas adsorvida na superfície e não quimicamente ligada, o que leva a sua desnaturação. Além disso, pode ter ocorrido também o envelhecimento da PAni, resultando em menor condutividade elétrica (LAI *et al.*, 2016).

Figura 67 - Estabilidade do biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx após armazenamento por 4 semanas.



A partir dos resultados obtidos através dos ensaios eletroquímicos é possível afirmar que o biossensor EC/PAni-PEO-NPAu/GOx foi eficiente na detecção de glicose na faixa de 0,1 a 5,5 mM (1,8 a 100 mg/dL), sendo que esta faixa de detecção bem como a sua estabilidade devem ser melhorados em trabalhos futuros, a fim de proporcionar a detecção em uma faixa mais ampla e um maior tempo de vida útil.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biossensores amperométricos enzimáticos de glicose tem sido alvo de extensa pesquisa acadêmica nos últimos anos. Como discutido na Seção 3.3, estes biossensores desenvolvidos com a PANi tem ficado cada vez mais complexos, envolvendo uma combinação de materiais como grafeno, óxidos, nanopartículas de materiais metálicos, etc.

A Tabela 8 apresenta uma comparação do desempenho de biossensores amperométricos de glicose que utilizam PANi e outros materiais, com os biossensores produzidos neste trabalho.

Tabela 8 – Desempenho de diferentes biossensores amperométricos de glicose.

Biossensores de glicose	Faixa linear de detecção	Limite de detecção	Sensibilidade ($\mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	Referências
Grafeno/PAni	10,0 μM – 1,48 mM	2,769 μM	22,1	(FENG <i>et al.</i> , 2015)
NPAu/PVP ^a /PAni	0,05–2,25 mM	10,0 μM	9,62	(MIAO <i>et al.</i> , 2015)
n-TiO ₂ ^b /PAni	0,02–6,0 mM	18,0 μM	6,31	(TANG; LI; ZENG, 2015)
PAni/nanotubos de TiO ₂	10,0 μM – 2,5 mM	0,5 μM	11,4	(ZHU <i>et al.</i> , 2015)
Grafeno/PAni/NPAu	0,2–11,2 mM	0,1 mM	20,32	(KONG <i>et al.</i> , 2014)
Grafeno/PAni/NPAu	4,0 μM – 1,12 mM	0,6 μM	-	(XU <i>et al.</i> , 2014)
PAni-PEO	1,0–10,0 mM	0,82 mM	16,04	Este trabalho
PAni-PEO-NPAu	0,1-5,5 mM	0,19 mM	5,5 e 0,76	Este trabalho

^a Polivinilpirrolidona

^b TiO₂ em escala nanométrica.

Analisando a Tabela 8 é possível observar que ambos os biossensores produzidos neste trabalho apresentaram um ótimo desempenho em comparação aos demais avaliados. A grande maioria dos biossensores estudados em artigos científicos não abrange a faixa de 2 a 25 mM requerida para detectar níveis de glicose no sangue de diabéticos. Alguns autores inclusive estendem esta faixa até 30 mM. Ou seja, apesar da incorporação dos mais diversos materiais e

tecnologias, muitas vezes não se atinge requisitos mínimos para a comercialização destes sensores. Já os biossensores produzidos neste trabalho, apesar de também não abrangerem uma ampla faixa de detecção de glicose, ainda assim apresentaram uma faixa de detecção maior do que os produzidos com materiais e técnicas mais complexas.

Em relação ao limite de detecção, os biossensores produzidos apresentaram valores maiores em relação aos demais avaliados, no entanto ainda abaixo do valor de 1 mM especificado em dispositivos comerciais de detecção de glicose, conforme afirmado por Konk *et al.* (2014), estando portanto de acordo com as especificações.

Analisando a sensibilidade, o biossensor produzido com PANi-PEO-NPAu apresentou valores abaixo dos demais avaliados. Este fato pode estar relacionado à plataforma sobre a qual o biossensor foi estruturado, que era o eletrodo de carbono, além do método de realização do ensaio, que consistia em encaixar o eletrodo em um dispositivo improvisado, para fazer a leitura de corrente nos ensaios eletroquímicos. Estes fatores podem ter contribuído para a geração de um menor sinal elétrico.

Além das vantagens já citadas, muitos desses sensores avaliados na Tabela 8 utilizam estratégias complexas de produção, inclusive com a combinação de nanoestruturas binárias e ternárias, o que os tornam muito difíceis de serem efetivamente produzidos e comercializados em larga escala (ZAIDI; SHIN, 2016). Em contrapartida, os biossensores produzidos neste trabalho exigem apenas duas etapas de produção, referentes à aplicação do polímero e da enzima sobre a superfície do eletrodo, o que torna este processo muito mais simples e reprodutível.

A comparação direta entre os dois biossensores produzidos neste trabalho não é possível, já que cada um foi testado sobre um substrato diferente. Provavelmente, devido a sua estruturação sobre o eletrodo de carbono e dificuldades na detecção dos sinais elétricos, o biossensor utilizando PANi-PEO-NPAu tenha apresentado valores menores de faixa linear de detecção e de sensibilidade. No entanto, a sua eficiência foi comprovada e verificou-se, através dos ensaios eletroquímicos, uma melhor cinética de transferência de cargas em comparação ao biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx. Necessita-se apenas de mais estudos e elaboração de um dispositivo melhor estruturado para encaixá-lo na realização dos ensaios eletroquímicos. A principal vantagem deste biossensor em relação a muitos outros pesquisados em artigos científicos é ter sido produzido sobre um eletrodo descartável de carbono, aproximando-se muito mais dos biossensores já disponíveis no mercado.

Já o biossensor de PANi-PEO, estruturado sobre o eletrodo de platina (Pt) apresentou resultados satisfatórios em comparação a outros biossensores bem mais complexos, como os da Tabela 8. No entanto, estudos devem ser realizados estruturando este biossensor sobre os eletrodos de carbono, que são descartáveis e com custo bem mais reduzido em comparação aos eletrodos de Pt.

Por fim, é possível afirmar que os biossensores amperométricos de glicose produzidos neste trabalho utilizando PANi e NPAu apresentam como vantagem a sua fácil produção, devido a utilização de sínteses químicas simples de PANi, a partir das quais um grande número de biossensores pode ser produzido. Além disto, as etapas de estruturação dos biossensores são simples e reprodutíveis, o que facilitaria a sua produção em larga escala.

7 CONCLUSÃO

Biossensores amperométricos enzimáticos de glicose foram produzidos com compósitos condutores e nanoestruturados de PANi-PEO e de PANi-PEO-NPAu sintetizados quimicamente, sobre os quais a enzima GOx foi imobilizada por adsorção.

Ambas as sínteses estudadas são simples e efetivas na produção da PANi na sua forma condutora sal de esmeraldina, com morfologia em escala nanométrica. Na síntese química da PANi-PEO-NPAu foi possível polimerizar a anilina e formar nanopartículas de Au em uma só etapa, o que facilita a realização desta síntese em escala industrial. Além disso, os polímeros foram sintetizados em dispersão aquosa, apresentando estabilidade e viscosidade adequadas para serem aplicados sobre as superfícies dos eletrodos.

O biossensor utilizando a PANi-PEO foi estruturado sobre um eletrodo de platina, onde o polímero e a GOx foram aplicados por *casting*. Este biossensor detectou glicose na faixa de 1 a 10 mM, com sensibilidade de $16,04 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e limite de detecção de 0,82 mM. Já o biossensor produzido utilizando a PANi-PEO-NPAu foi estruturado sobre um eletrodo de carbono comercial, onde o polímero e a GOx foram aplicados por *casting* sobre a área referente ao eletrodo de trabalho. Este biossensor apresentou faixa de detecção de 0,1 mM a 5,5 mM, com sensibilidade de 5,5 e $0,76 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$, nas faixas de 0,1 a 0,5 e de 0,6 a 5,5 mM, respectivamente, com limite de detecção de 0,19 mM.

As faixas de detecção dos biossensores não abrangem toda a faixa necessária para detecção de glicose em pessoas com diabetes, a qual deve chegar a pelo menos 30 mM. No entanto, ao comparar os biossensores de PANi-PEO e PANi-PEO-NPAu com os produzidos recentemente em artigos científicos, observa-se que a faixa de detecção aqui atingida é muito superior a da maioria destes biossensores, os quais na maioria das vezes abrangem a utilização de muitos outros materiais, como grafeno e óxidos metálicos, e necessitam de etapas de produção bem mais complexas.

O biossensor de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx apresentou superior seletividade aos interferentes ácido ascórbico e ácido úrico, em comparação ao biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx. Nos ensaios de estabilidade, os biossensores apresentaram diminuição do sinal eletroquímico após 15 e 30 dias de armazenamento, o que deve estar relacionado à fraca adsorção da enzima GOx sobre a superfície do eletrodo.

Desta forma, a partir dos resultados obtidos é possível afirmar que os biossensores

produzidos neste trabalho são efetivos na detecção de glicose e apresentam como principal vantagem a sua simplicidade de materiais e de método de produção. Ainda, em relação ao biossensor produzido com PANi-PEO-NPAu, outras vantagens apresentadas foram a sua estruturação sobre o eletrodo de carbono, que é uma plataforma descartável e muito semelhante às tiras já comercializadas, e a sua melhor cinética de transferência de cargas, em comparação ao biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx.

Os resultados obtidos foram positivos e motivam a continuação da pesquisa, com o intuito de melhorar a ligação da enzima à superfície do eletrodo, proporcionando maior estabilidade aos biossensores, e também a produção de um dispositivo de detecção dos sinais eletroquímicos gerados nos ensaios com o eletrodo de carbono.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes processos de imobilização da enzima GOx, a partir de agentes de reticulação como o glutaraldeído.
- Realizar os ensaios eletroquímicos do biossensor produzido com PAni-PEO, estruturado sobre o eletrodo de carbono.
- Produzir um dispositivo para encaixar de forma mais eficiente os eletrodos de carbono e realizar os ensaios eletroquímicos.
- Estimar o custo de produção do biossensor de Pt/PAni-PEO/GOx e de EC/PAni-PEO-NPAu/GOx, bem como de um dispositivo eletrônico que fará a detecção do sinal elétrico.
- Realizar testes com amostras de sangue com diferentes concentrações de glicose, a fim de determinar a eficiência de detecção do biossensor em relação a dispositivos comerciais e testes de laboratórios clínicos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, S. *et al.* Controlled Fabrication of Highly Monodispersed, Gold Nanoparticles Grafted Polyaniline (Au@PANI) Nanospheres and their Efficient Ammonia Gas Sensing Properties. **J. Biosens. Bioelectron.**, v. 6, n. 2, p. 2–6, 2015.
- AHUJA, T. *et al.* Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, p. 791–805, 2007.
- AL-SAGUR, H. *et al.* A novel glucose sensor using lutetium phthalocyanine as redox mediator in reduced graphene oxide conducting polymer multifunctional hydrogel. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 638-645, 2017.
- ALBAREDA-SIRVENT, M.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 69, n. 1, p. 153–163, 2000.
- AMIN, R.; BILAL, S.; SHAH, A.-H. A. Synthesis and Characterization of Thermally Stable Organic Composites of Polyaniline with Polyethylene Oxide. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 38, n. 5, p. 937, 2016.
- ANDRADE, V. M. **Confecção De Biossensores Através Da Imobilização De Biocomponentes Por Eletropolimerização De Pirrol**. 2006. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BANKAR, S. B. *et al.* Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009.
- BARTHET, C.; GUGLIELMI, M.; BAUDRY, P. A polyaniline + polyethylene oxide mixture as a composite polymer positive electrode in solid-state secondary batteries. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 431, p. 145–152, 1997.
- BASAVARAJU, K. C.; DEMAPPA, T.; RAI, S. K. Miscibility studies of polysaccharide Xanthan gum and PEO (polyethylene oxide) in dilute solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 3, p. 462–466, 2007.
- BHADRA, S. *et al.* Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 8, p. 783–810, 2009.
- BICKERSTAFF, G. F. (ED.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press Inc, 1997.
- BOGDANOVIĆ, U. *et al.* Interfacial Synthesis of Gold-Polyaniline Nanocomposite and Its Electrocatalytic Application. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 51, p. 28393–28403, 2015.
- CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA. **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**. Disponível em: <[http://www.cppls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cppls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf)>. Acesso em: 7 jan. 2017.
- CASADO, N. *et al.* Current trends in redox polymers for energy and medicine. **Progress in Polymer Science**, v. 52, p. 107–135, 2016.
- CHAVERO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de plataformas nanoestruturadas de**

- polipirrol para biossensores amperométricos não enzimáticos e enzimáticos**. 2013. 169 f. Tese (Doutorado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- CHIANG, C. K. *et al.* Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. **Phys. Rev. Lett.**, v. 39, n. 17, p. 1098, 1977.
- CHOWDHURY, A. D.; GANGOPADHYAY, R.; DE, A. Highly sensitive electrochemical biosensor for glucose, DNA and protein using gold-polyaniline nanocomposites as a common matrix. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 348–356, 2014.
- COOPER, J. C.; HALL, E. A. H. Electrochemical response of an enzyme-loaded polyaniline film. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 7, n. 7, p. 473–485, 1992.
- CREAN, C. *et al.* Polyaniline nanofibres as templates for the covalent immobilisation of biomolecules. **Synthetic Metals**, v. 161, p. 285–292, 2011.
- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970–979, 2004.
- DAS, J.; SARKAR, P. Enzymatic electrochemical biosensor for urea with a polyaniline grafted conducting hydrogel composite modified electrode. **RSC Adv.**, v. 6, n. 95, p. 92520–92533, 2016.
- DAVIS, J.; HUW VAUGHAN, D.; CARDOSI, M. F. Elements of biosensor construction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 12, p. 1030–1035, 1995.
- DEVENDRAPPA, H.; RAO, U. V. S.; PRASAD, M. V. N. A. Study of dc conductivity and battery application of polyethylene oxide/polyaniline and its composites. **Journal of Power Sources**, v. 155, n. 2, p. 368–374, 2006.
- DHAND, C. *et al.* Electrophoretically deposited nano-structured polyaniline film for glucose sensing. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1145–1150, 2010.
- DHAND, C. *et al.* Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2811–2821, 2011.
- DHAND, C. *et al.* Polyaniline-based biosensors. **Nanobiosensors in Disease Diagnosis**, v. 4, p. 25–46, 2015.
- FENG, X. *et al.* Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene-conducting polyaniline composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 70, p. 411–417, 2015.
- GANGOPADHYAY, R.; CHOWDHURY, A. D.; DE, A. Functionalized polyaniline nanowires for biosensing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 171–172, p. 777–785, 2012.
- GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345–359, 2002.
- GERARD, M.; MALHOTRA, B. D. Application of polyaniline as enzyme based biosensor. **Current Applied Physics**, v. 5, n. 2, p. 174–177, 2005.
- GIROTTO, E. M.; SANTOS, I. A. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: como efetuá-las corretamente. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 639–647, 2002.
- GONÇALVES, V. R. **Síntese e caracterização de derivados do politiofeno para utilização em sensores**. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa

de Pós-Graduação de Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

GONG, C. *et al.* A glucose biosensor based on the polymerization of aniline induced by a bio-interphase of glucose oxidase and horseradish peroxidase. **Anal. Methods**, v. 8, n. 7, p. 1513–1519, 2016.

GOODSELL, D. **Molecular explorations through biology and medicine**. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/77>>. Acesso em: 15 jan 2017.

GOSPODINOVA, N.; TERLEMEZYAN, L. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, p. 1443–1484, 1998.

GRIESHABER, D. *et al.* Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Polymers in Biomedical Applications**, v. 32, n. 8–9, p. 876–921, 2007.

GVOZDENOVIC, M. M. *et al.* Electrochemical determination of glucose using polyaniline electrode modified by glucose oxidase. **Food Chemistry**, v. 124, p. 396–400, 2011.

HAN, M. G. *et al.* Preparation and characterization of polyaniline nanoparticles synthesized from DBSA micellar solution. **Synthetic Metals**, v. 126, n. 1, p. 53–60, 2002.

HANSEN, B. **Metodologia para produção de biossensores amperométricos enzimáticos utilizando polímeros condutores: caso polianilina**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

HANSEN, B.; HOCEVAR, M. A.; FERREIRA, C. A. A facile and simple polyaniline-poly(ethylene oxide) based glucose biosensor. **Synthetic Metals**, v. 222, p. 224–231, 2016.

HEEGER, A. J. Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials. **Synthetic Metals**, v. 125, p. 25–42, 2002.

HELLER, A.; FELDMAN, B. Electrochemical Glucose Sensors and Their Applications in Diabetes Management. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 7, p. 2482–2505, 2008.

HODAK, J. H.; HENGLEIN, A.; HARTLAND, G. V. Size dependent properties of Au particles: Coherent excitation and dephasing of acoustic vibrational modes. **J. Chem. Phys.**, v. 111, n. 18, p. 8613–8621, 1999.

HOMMA, T. *et al.* Amperometric glucose sensing with polyaniline/poly(acrylic acid) composite film bearing covalently-immobilized glucose oxidase: A novel method combining enzymatic glucose oxidation and cathodic O₂ reduction. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 712, p. 119–123, 2014.

HOPKINS, A. R. *et al.* Interfacial synthesis of electrically conducting polyaniline nanofiber composites. **Thin Solid Films**, v. 469–470, n. SPEC. ISS., p. 304–308, 2004.

HUANG, J. *et al.* Polyaniline nanofibers: facile synthesis and chemical sensors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, p. 314–315, 2003.

HUANG, J. *et al.* Nanostructured Polyaniline Sensors. **Chemistry**, v. 10, p. 1314–1319, 2004.

HUANG, J. Syntheses and applications of conducting polymer polyaniline nanofibers. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 15–27, 2006.

- HUANG, J.; KANER, R. B. Nanofiber formation in the chemical polymerization of aniline: A mechanistic study. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 43, n. 43, p. 5817–5821, 2004a.
- HUANG, J.; KANER, R. B. A general chemical route to polyaniline nanofibers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p. 851–855, 2004b.
- HUSSAM, A. Chapter 18b Voltammetry: Dynamic electrochemical techniques. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 47, p. 661–689, 2006.
- INZELT, G. **Conducting Polymers: A New Era in Electrochemistry**. Heidelberg: Springer, 2008.
- IZUMI, C. M. S. **Caracterização espectroscópica da polianilina em diferentes ambientes químicos**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- JAYMAND, M. Recent progress in chemical modification of polyaniline. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 9, p. 1287–1306, 2013.
- 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**, v. 85, p. 36–60, 2016.
- KAHOL, P. K.; PINTO, N. J. An EPR investigation of electrospun polyaniline-polyethylene oxide blends. **Synthetic Metals**, v. 140, p. 269–272, 2004.
- KANG, E. T.; NEOH, K. G.; TAN, K. L. Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states. **Progress in Polymer Science**, v. 23, n. 2, p. 277–324, 1998.
- KONG, F.-Y. *et al.* A paper disk equipped with graphene/polyaniline/Au nanoparticles/glucose oxidase biocomposite modified screen-printed electrode: Toward whole blood glucose determination. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 56, p. 77–82, 2014.
- KOZAN, J. V. B. **Microssensor Para Glicose Integrado a Catéter**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- KUNTEPPA, H. *et al.* Synthesis and morphological change in poly(ethylene oxide)–sodium chlorate based polymer electrolyte complex with polyaniline. **Physica B: Condensed Matter**, v. 406, n. 21, p. 3997–4000, 2011.
- KURAMOTO, N.; TOMITA, A. Chemical oxidative polymerization of dodecylbenzenesulfonic acid aniline salt in chloroform. **Synthetic Metals**, v. 88, n. 2, p. 147–151, 1997.
- LAI, J. *et al.* Polyaniline-based glucose biosensor: A review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 782, p. 138–153, 2016.
- LEE, K. P. *et al.* Sulfonated polyaniline network grafted multi-wall carbon nanotubes for enzyme immobilization, direct electrochemistry and biosensing of glucose. **Microchemical Journal**, v. 95, n. 1, p. 74–79, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LI, D.; HUANG, J.; KANER, R. B. Polyaniline nanofibers: a unique polymer nanostructure for versatile applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 1, p. 135–145, 2009.

- LI, D.; KANER, R. B. Processable Stabilizer-Free Polyaniline Nanofiber Aqueous Colloids. **Chemical Communications**, v. 25, p. 3286–3288, 2005.
- LI, Y.; JING, X. Morphology control of chemically prepared polyaniline nanostructures: Effects of mass transfer. **Reactive and Functional Polymers**, v. 69, n. 11, p. 797–807, 2009.
- LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, p. 79–91, 2006.
- LOSADA, J.; ARMADA, M. P. G. A glucose amperometric sensor based on covalent immobilization of glucose oxidase in poly-2-aminoaniline film via chloranil on platinized platinum electrode. **Electroanalysis**, v. 9, n. 18, p. 1416–1421, 1997.
- MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A.; SINGH, S. P. Prospects of conducting polymers in biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 578, n. 1, p. 59–74, 2006.
- MARTINS, M. **Biossensores de colesterol baseados no sistema poli(álcool vinílico)/Ftalocianina**. 2006. 143 f. Dissertação (Mestrado em Materias em Engenharia) - Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2006.
- MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: Síntese, estrutura e propriedades. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 388–399, 1996.
- MAŽEIKIENE, R.; NIAURA, G.; MALINAUSKAS, A. Voltammetric study of the redox processes of self-doped sulfonated polyaniline. **Synthetic Metals**, v. 139, p. 89–94, 2003.
- MIAO, Z. *et al.* Development of a glucose biosensor based on electrodeposited gold nanoparticles–polyvinylpyrrolidone–polyaniline nanocomposites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 756, p. 153–160, 2015.
- MOHAMMADI, A. *et al.* Direct Electron Transfer of Polyphenol Oxidase on Carbon Nanotube Surfaces: Application in Biosensing. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v. 4, p. 895–905, 2009.
- MONÇÃO, A. P. DOS S. **Síntese de hidrogéis de PHEMA para liberação controlada de drogas em meios ácido e neutro e estudo da difusão**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 1997.
- MORRIN, A. *et al.* Novel biosensor fabrication methodology based on processable conducting polyaniline nanoparticles. **Electrochemistry Communications**, v. 7, n. 3, p. 317–322, 2005.
- MOULTON, S. E. *et al.* Polymerisation and characterisation of conducting polyaniline nanoparticle dispersions. **Current Applied Physics**, v. 4, p. 402–406, 2004.
- PATACAS, R. DE C. E. **Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas**. 2007. 123 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciência, Universidade do Porto, Porto, 2007.
- PILLALAMARRI, S. K. *et al.* One-pot synthesis of polyaniline-metal nanocomposites. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 16, p. 5941–5944, 2005.
- PINTO, N. J. *et al.* Electrospun polyaniline/polyethylene oxide nanofiber field-effect transistor. **Applied Physics Letters**, v. 83, n. 20, p. 4244–4246, 2003.
- PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, n. 4, p. 4811–4840, 2013.

- RAMANATHAN, K.; ANNAPOORNI, S.; MALHOTRA, B. D. Application of Poly(Aniline) as a glucose biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, n. 21, p. 165–169, 1994.
- RAY, A. *et al.* Polyaniline: Protonation/Deprotonation of Amine and Imine Sites. **Synthetic Metals**, v. 29, p. 151–156, 1989.
- RODRIGUES, P. C. **Síntese, caracterização e correlações estrutura/propriedades de redes mistas de polianilina/poliuretano com arquitetura molecular pré-desenhada**. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- SALVATIERRA, R. V. **Nanocompósitos de polianilina e nanotubos de carbono obtidos por polimerização interfacial**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- SANTOS, J. C. DE C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Física Básica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- SARMA, T. K.; CHATTOPADHYAY, A. One pot synthesis of nanoparticles of aqueous colloidal polyaniline and its Au-nanoparticle composite from monomer vapor. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 108, n. 39, p. 7837–7842, 2004.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.
- SEN, T.; MISHRA, S.; SHIMPI, N. G. Synthesis and sensing applications of polyaniline nanocomposites: a review. **RSC Advances**, v. 6, p. 42196–42222, 2016.
- SHAN, D. *et al.* Amperometric glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline/poly(acrylonitrile-co-acrylic acid) composite film. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 213–217, 2008.
- SHAOLIN, M.; HUAIGUO, X.; QIAN, B. Bioelectrochemical responses of the polyaniline glucose oxidase electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 304, p. 7–16, 1991.
- SHINOHARA, H.; CHIBA, T.; AIZAWA, M. Enzyme microsensor for glucose with an electrochemically synthesized enzyme-polyaniline film. **Sensors and Actuators**, v. 13, p. 79–86, 1988.
- SILVA, K. F. F. **Imobilização de horseradish peroxidase em diferentes polianilinas: aplicações analíticas**. 2000. 140 f. Tese - Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.
- SK, M. M.; YUE, C. Y. Layer-by-layer (LBL) assembly of graphene with p-phenylenediamine (PPD) spacer for high performance supercapacitor applications. **RSC Advances**, v. 4, p. 19908–19915, 2014.
- SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 2006.
- SONG, M. J. *et al.* Pt-polyaniline nanocomposite on boron-doped diamond electrode for amperometric biosensor with low detection limit. **Microchimica Acta**, v. 171, n. 3, p. 249–255, 2010.
- STEJSKAL, P. K. Polyaniline dispersions, 2. UV-Vis absorption spectra. **Synthetic Metals**, v. 61, p. 225–231, 1993.
- SUNDARAY, B.; CHOI, A.; PARK, Y. W. Highly conducting electrospun polyaniline-

- polyethylene oxide nanofibrous membranes filled with single-walled carbon nanotubes. **Synthetic Metals**, v. 160, n. 9–10, p. 984–988, 2010.
- TANG, W.; LI, L.; ZENG, X. A glucose biosensor based on the synergistic action of nanometer-sized TiO₂ and polyaniline. **Talanta**, v. 131, p. 417–423, 2015.
- THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Analytical Letters**, v. 34, n. 5, p. 635–659, 2001.
- TOGHILL, K. E.; COMPTON, R. G. Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: A perspective and an evaluation. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 9, p. 1246–1301, 2010.
- TRIVEDI, D. C. Polyanilines. In: NALWA, H. S. (Ed.). **Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers, Volume 2, Conductive Polymers: Synthesis and Electrical Properties**. New York: John Wiley, 1997. p. 888.
- TURNER, A. P. F. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 3184–3196, 2013.
- VIEIRA, N. **Biossensores de Glicose Nanoestruturados Baseados em Dendrímeros PAMAM e Filmes finos de In₂O₃:Sn**. [s.l.] Universidade Federal de Itajubá, 2006.
- WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 814–825, 2008.
- WISITSORAAT, A. *et al.* Graphene – PEDOT:PSS on screen printed carbon electrode for enzymatic biosensing. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 704, p. 208–213, 2013.
- WOHLFAHRT, G. *et al.* The chemical mechanism of action of glucose oxidase from *Aspergillus niger*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 260, n. 1, p. 69–83, 2004.
- WU, J.; YIN, L. Platinum nanoparticle modified polyaniline-functionalized boron nitride nanotubes for amperometric glucose enzyme biosensor. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 11, p. 4354–4362, 2011.
- XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 1–11, 2010.
- XU, G. *et al.* Electrodeposited conducting polymer PEDOT doped with pure carbon nanotubes for the detection of dopamine in the presence of ascorbic acid. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 188, p. 405–410, 2013.
- XU, H. *et al.* A glucose oxidase sensor based on screen-printed carbon electrodes modified by polypyrrole. In: Engineering in Medicine and Biology. 27., 2005, Shanghai. **Proceedings of the 2005 IEEE Annual Conference**, Shanghai: IEEE, 2005. p. 1917–1920.
- XU, Q. *et al.* Graphene/polyaniline/gold nanoparticles nanocomposite for the direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 190, p. 562–569, 2014.
- YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. **Sensors**, v. 10, p. 4558–4576, 2010.
- YU, Y. *et al.* Facile Synthesis of Polyaniline - Sodium Alginate Nanofibers. **Lagmuir**, n. 22, p. 3899–3905, 2006.
- ZAIDI, S. A.; SHIN, J. H. Recent developments in nanostructure based electrochemical glucose sensors. **Talanta**, v. 149, p. 30–42, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Chitosan coated on the layers' glucose oxidase immobilized on cysteamine/Au electrode for use as glucose biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 60, p. 271–276, 2014.

ZHANG, Z.-R.; BAO, W.-F.; LIU, C.-C. Electrochemical properties of benzoquinone and ferrocene monocarboxylic acid at a polyaniline coated platinum electrode for glucose sensing. **Talanta**, v. 41, n. 6, p. 875–879, 1994.

ZHONG, H. *et al.* In situ chemo-synthesized multi-wall carbon nanotube-conductive polyaniline nanocomposites: Characterization and application for a glucose amperometric biosensor. **Talanta**, v. 85, n. 1, p. 104–111, 2011.

ZHU, J. *et al.* Preparation of polyaniline–TiO₂ nanotube composite for the development of electrochemical biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 450–457, 2015.