

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais –
PPGE3M



***BIOSENSORES ESTRUTURADOS COM
POLÍMEROS CONDUTORES PARA DETECÇÃO DE
GLICOSE***

Marcele Arais Hocevar
Mestre em Engenharia

Porto Alegre
2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais –
PPGE3M

***BIOSENSORES ESTRUTURADOS COM POLÍMEROS
CONDUTORES PARA DETECÇÃO DE GLICOSE***

Marcele Arais Hocevar
Mestre em Engenharia

Tese para obtenção do título de
Doutora em Engenharia

Porto Alegre

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais –
PPGE3M

***BIOSENSORES ESTRUTURADOS COM POLÍMEROS
CONDUTORES PARA DETECÇÃO DE GLICOSE***

Marcele Arais Hocevar
Mestre em Engenharia

Trabalho realizado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGEM, dentro do Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Engenharia.

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre

2016

Marcele Arais Hocevar
Mestre em Engenharia

***BIOSENSORES ESTRUTURADOS COM POLÍMEROS
CONDUTORES PARA DETECÇÃO DE GLICOSE***

Orientador Prof. Dr. Carlos Arthur Ferreira

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Kátia Regina Lemos Castagno (IFSul)

Prof. Dr. Jarem Raul Garcia (UEPG)

Prof. Dr. Valdir Soldi (UFSC)

Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coordenador do PPGEM

“Ser Feliz não é viver apenas momentos de alegria. É ter coragem de enfrentar os momentos de tristeza e sabedoria para transformar os problemas em aprendizado.”

Padre Fábio de Melo.

Agradecimentos

Inúmeras pessoas contribuíram direta e indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho, para estas eu queria deixar meu eterno muito obrigada.

Primeiro gostaria de agradecer ao Professor Carlos Arthur Ferreira por me aceitar como sua aluna de doutorado, tornando possível desenvolver este trabalho no Lapol. Gostaria ainda de agradecer pela orientação, apoio e amizade durante toda a minha pós-graduação.

Aos professores Carlos Alemán e Elaine Armelin da Universitat Politècnica de Catalunya pela orientação, acolhida, amizade e pelo interesse no desenvolvimento de um trabalho inovador. Muito obrigada pelo incentivo e novas experiências proporcionadas.

Aos demais professores do PPGE3M que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento durante esta caminhada. Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais, ao Laboratório de Materiais Poliméricos, ao Departamento de Ingeniería Química (UPC) e em especial ao grupo de Innovación en Materiales e Ingeniería Molecular (IMEM) pela oportunidade de realizar as atividades de meu doutorado em suas dependências.

Agradeço ao CNPQ, CAPES e FINEP pela concessão das bolsas de estudo permitindo a realização de meu doutorado. Agradeço a UFRGS e UPC pelo suporte técnico e financeiro para a realização de meu doutorado.

Gostaria de agradecer as alunas de iniciação científica Natana Binotto e Gabriela Juliane Favero a amizade e a todos os momentos de dedicação auxiliando na realização de experimentos e sínteses.

Aos colegas do Lapol e do IMEM pela parceria, estímulo e auxílio nas atividades desenvolvidas. Aos amigos do Lapol e IMEM pelo companheirismo, ótimos momentos vividos e por tornar esta caminhada muitas vezes mais fácil e colorida. As minhas amigas que sempre estavam ao meu lado para o que desse e viesse fazendo com que a vida seja mais simples e feliz.

A minha família que sempre esteve do meu lado incentivando, em especial ao meu pai Luiz que sempre está por perto dando apoio, e a minha mãe Marly sendo fonte de luz em meu caminho. As minhas irmãs e cunhados que estão sempre me apoiando e dando carinho.

Ao meu esposo Bolivar pela sua cumplicidade, amizade, companheirismo e por enfrentar junto comigo novos desafios e superar seus medos para concretizar meus sonhos.

Muito obrigada a todos.

Publicações

Os resultados das pesquisas obtidas durante o período do doutorado foram publicados em revistas científicas ou divulgados em congressos de âmbito nacional e internacional, como apresentado a seguir:

[1] Nanometric polythiophene films with electrocatalytic activity for non-enzymatic detection of glucose; **Hocevar, M. A.**, Fabregat, G., Armelin, E., Ferreira, C. A., Alemán, C.; *European Polymer Journal* 79 (2016) 132-139.

[2] Obtenção de Polipirrol em Solução para Aplicação em Sensores; **Hocevar, M. A.**, Hansen, B., Binotto, N., Ferreira, C. A.; em: *XIV Latin American Symposium on Polymers, 2014, Ipojuca - Porto de Galinhas*.

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

[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] Produção de tintas condutoras a base de grafite e polímeros condutores; **Hocevar, M. A.**, Hansen, B., Binotto, N., Ferreira, C. A.; em: *20º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2012, Joinville*.

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

[7] 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*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1. Diabetes	26
3.2. Biossensores	27
3.3. Polímeros Intrinsecamente Condutores (PIC's)	33
3.3.1. Polipirrol	36
3.3.2. Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)	39
3.4. Enzimas	45
3.4.1. Glicose Oxidase	46
3.5. Biossensores Amperométricos de Glicose	49
3.5.1. Polímeros Condutores em Biossensores de Glicose	54
4. EXPERIMENTAL	58
4.1. Materiais	58
4.2. Métodos	58
4.2.1. Caracterização dos Polímeros Condutores e Sensores	59
4.2.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)	59
4.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	59
4.2.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)	59
4.2.2. Caracterização Eletroquímica dos Sensores	60
4.2.3. Biossensor Enzimático produzido com Polipirrol e Poli(óxido de etileno)	61
4.2.1.1. Síntese do Polipirrol	61
4.2.1.2. Tamanho de Partícula Sintetizada	63
4.2.4. Construção do Biossensor com PPi/PEO	63

4.2.5. Biossensor enzimático produzido com PEDOT	64
4.2.2.1. Espectroscopia RAMAN	66
4.2.6. Sensor produzido com PEDOT-OH	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1. Biossensor Enzimático desenvolvido com Polipirrol e Poli(óxido de Etileno) ...	68
5.1.1. Tamanho de Partícula	68
5.1.2. Construção do Biossensor com PPI/PEO	69
5.1.3. Caracterização do Biossensor de PPI/PEO	72
5.1.3.1. Espectroscopia FTIR	72
5.1.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio – X	73
5.1.4. Caracterização Eletroquímica do Biossensor de PPI/PEO	77
5.1.4.1. Voltametria Cíclica	77
5.1.4.2. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose...80	
5.1.4.3. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica do Biossensor de PPI/PEO	83
5.1.4.4. Detecção de Interferentes	85
5.2. Biossensor Enzimático desenvolvido com PEDOT e Tratamento Corona	87
5.2.1. Construção do Biossensor de PEDOT e Tratamento Corona	87
5.2.2. Caracterização do Biossensor de PEDOT/TC	90
5.2.2.1. Espectroscopia RAMAN	90
5.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio – X	92
5.2.2.3. Microscopia de Força Atômica	95
5.2.3. Caracterização Eletroquímica do Biossensor de PEDOT/TC	97
5.2.3.1. Voltametria Cíclica	97
5.2.3.2. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose...99	

5.2.3.3. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica do Biossensor de PEDOT/TC/GOx	102
5.2.3.4. Detecção de Interferentes	105
5.3. Sensor Não-Enzimático desenvolvido com PEDOT-OH.....	106
5.3.1. Construção do Sensor de PEDOT-OH	106
5.3.2.1. Espectroscopia FTIR.....	110
5.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio – X.....	112
5.3.2.3. Microscopia de Força Atômica	115
5.3.2. Caracterização Eletroquímica do Sensor de PEDOT-OH.....	117
5.3.3.1. Voltametria Cíclica.....	117
5.3.3.2. Eletroatividade do sensor com GOx imobilizada por Adsorção	120
5.3.3.3. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose no sensor com GOx imobilizada por Adsorção	121
5.3.3.4. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica para o Sensor PEDOT-OH.....	124
6. TESTES PRELIMINARES COM AMOSTRAS DE SANGUE	131
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
8. CONCLUSÃO	136
9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	138
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

Lista de Figuras

- Figura 1 - Esquema representativo da estrutura e princípio de operação de um biossensor.....29
- Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes métodos de imobilização enzimática, onde e=enzima e P=proteína inerte.....32
- Figura 3 - Polimerização química do PPI com FeCl_3 como agente oxidante.....37
- Figura 4 - Polimerização do PEDOT a partir do monômero EDOT.....40
- Figura 5 - Imagem ilustrando o tratamento corona sendo aplicado sobre eletrodo de carbono vítreo recoberto com PEDOT.....43
- Figura 6 - Síntese eletroquímica do monômero EDOT-OH em solução aquosa de LiClO_4 produzindo PEDOT-OH.....44
- Figura 7 - Estrutura da enzima GOx, destacando em cor de rosa o cofator FAD e em verde resíduos de carboidratos.....47
- Figura 8 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase. .48
- Figura 9 - Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos, (A) biossensores de primeira geração, (B) biossensores de segunda geração e (C) biossensor de terceira geração.49
- Figura 10 – (A) Resposta eletroquímica em diferentes potenciais a adição de 8×10^{-4} mol/L de H_2O_2 em PBS 0,1 M pH 6,9 nos biossensores (a) AuNPs/PAni/Nafion, (b) nanofibras de PAni, (c) filme convencional de PAni e (d) eletrodo GCE. (B) Resposta amperométrica do biossensor AuNPs/PAni/GOx/Nafion a adições subsequentes de 1×10^{-4} M de L-cisteína(Cys); 1×10^{-4} M de glutationa (GSH); 5×10^{-4} M ácido úrico (UA), 5×10^{-4} M de ácido ascórbico (AA) e 15, 20 e 30 μM de glicose em PBS 0,1 M a potencial de 600 mV vs SCE.....51
- Figura 11 - Visão ampliada da estrutura de uma tira eletroquímica comercial para monitoramento de glicose usada para o controle de diabetes, preenchida parcialmente no adesivo com uma gota de sangue.....52
- Figura 12 - (A) Voltametria cíclica da GOx imobilizada no biossensor de disco de papel em (A) PBS 0,1 M pH 7; (B) com Fc-COOH em PBS 0,1 M e (C) com Fc-COOH em PBS 0,1 M e glicose 5 mM em velocidade de varredura de 25 mV/s. (B) Efeito do potencial aplicado no biossensor de disco de papel com mediador Fc-COOH a resposta amperométrica com 5 mM de glicose em PBS 0,1 M.....53
- Figura 13 – (A) Voltametria cíclica dos biossensores GOx/CNT em diferentes concentrações de glicose de 0,1 à 2 mM. (B) Relação entre o pico de corrente produzido pelos biossensores GOx/CNT e concentração de glicose. Os experimentos foram realizados em PBS 1 M à velocidade de varredura de 10 mV/s.54

-
- Figura 14 – (A) Determinação do tempo de síntese do PPI com PEO por Uv-Vis. (B) dispersão de PPI e PEO após diálise de 24 horas.....62
- Figura 15 - Eletrodos impressos confeccionados pela empresa GSI Technologies, detalhe do eletrodo com eletrodo de trabalho com diâmetro de 3 mm.64
- Figura 16 - Eletrodos de Carbono Vítreo, da esquerda recoberto com PEDOT e tratado com tratamento corona e da direita recoberto com filme de PEDOT.....65
- Figura 17 - Sensor marca DropSens, modelo DRP-C110 com três eletrodos.....66
- Figura 18 - Determinação do tamanho de partícula da amostra PPI/PEO.68
- Figura 19 - Voltametria cíclica para determinação da quantidade de PPI/PEO no eletrodo de trabalho, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.70
- Figura 20 - Voltametria cíclica para determinação da concentração de GOx a ser aplicada sobre camada formada após a secagem dos 4 μ L de PPI/PEO, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.71
- Figura 21 - Espectros de FTIR do PPI e PEO e do PPI/PEO sintetizado aplicado sobre o eletrodo de trabalho, após espectro FTIR da enzima GOx e do sensor completo com a camada enzimática sobre a camada polimérica.....72
- Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos sensores recobertos com PPI/PEO em (A), (C) e (E); e com PPI/PEO/GOx em (B), (D) e (F).74
- Figura 23 - Espectro EDX das amostras representando as etapas de produção do biossensor, (A) PPI/PEO e (B) PPI/PEO/GOx.....75
- Figura 24 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do biossensor e com a presença de 3 mM de glicose no meio. As ciclagens foram realizadas em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.....77
- Figura 25 - Voltametria cíclica para a amostra PPI/PEO/GOx em PBS 0,1M em velocidades de varredura de 25 a 200 mV/s, e no detalhe relação entre as densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos nas diferentes velocidades de varredura, e linha de tendência com equação característica.78
- Figura 26 - Voltametria cíclica para detecção de diferentes concentrações de glicose, de 1 a 3 mM, pelo biossensor PPI/PEO/GOx em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s. No detalhe os picos anódicos dos sensores em cada concentração.....79
- Figura 27 – Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para o sensor PPI/PEO/GOx em solução de glicose 1 mM em PBS 0,1 M. Detalhe indica a corrente de estabilização para cada potencial verificado em 300 s.....81
- Figura 28 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PPI/PEO (sem GOx) e PPI/PEO/GOx (com Gox) em (A) -400 mV e (B) 100 mV, em PBS 0,1 M e adições de glicose 1 mM a cada 100s.....82
- Figura 29 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 100 s em potencial de 100 mV.83

-
- Figura 30 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.84
- Figura 31 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de 100 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s.86
- Figura 32 - Eletropolimerização do EDOT no eletrodo de carbono vítreo em potencial constante de 1,4 V durante 6 s, em solução de acetonitrila contendo 10 mM de monômero EDOT e 0,1 M de LiClO₄.87
- Figura 33 – Voltametria cíclica para determinação do tempo de tratamento corona sobre a superfície do eletrodo polimerizado com PEDOT, em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.88
- Figura 34 – Voltametria cíclica para determinação da quantidade de GOx imobilizada no eletrodo de trabalho recoberto com PEDOT submetido ao tratamento corona, em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.89
- Figura 35 - Espectroscopia RAMAN das amostras PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx, representando todas as etapas de produção do biossensor. ...90
- Figura 36 - Micrografias obtidas por MEV da superfície dos sensores recobertos com PEDOT em (A), (D) e (G); PEDOT com tratamento corona em (B), (E) e (H); e PEDOT/TC/GOx em (C), (F) e (I).92
- Figura 37 – Espectro EDX das amostras representando as etapas de produção do biossensor, (A) PEDOT, (B) PEDOT/TC e (C) PEDOT/TC/GOx.94
- Figura 38 - Microscopia topográfica obtidas por AFM das superfícies dos biossensores durante as etapas de construção, (A) PEDOT, (B) PEDOT/TC e (C) PEDOT/TC/GOx.96
- Figura 39 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do biossensor e com a adição de 3 mM de glicose no meio. A ciclagem foi realizada em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.98
- Figura 40 - Voltametria cíclica para a amostra PEDOT/TC/GOx em PBS 10 mM pH 7,4, em (A) diferentes velocidades de varredura, de 25 a 200 mV/s; e em (B) diferentes concentrações de glicose, de 1 a 3 mM e velocidade de varredura de 50 mV/s.99
- Figura 41 - Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para os sensores de PEDOT/TC/GOx em PBS 10 mM com adições de glicose 1 mM a cada 100 s. 100
- Figura 42 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PEDOT/TC (sem GOx) e PEDOT/TC/GOx (com Gox) em (A) -700 mV, (B) -600 mV e (C) -500 mV, em PBS 10 mM e adições de glicose 1 mM a cada 100s. 101
- Figura 43 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 10 mM, com adições de glicose 1 mM a cada 50 s em potencial de -500 mV. 103

-
- Figura 44 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicada no eletrodo e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor. 103
- Figura 45 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 10 mM e potencial de -500 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s. 105
- Figura 46 – Voltametria cíclica de polimerização do PEDOT-OH a partir do monômero EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO₄ e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens e velocidade de varredura de 50 mV/s. 106
- Figura 47 - Eletropolimerização do EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO₄ e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens... 107
- Figura 48 – Voltametria cíclica dos sensores recobertos com PEDOT-OH e GOx sintetizados com diferentes tempos de polimerização, em PBS 0,1 M e velocidade de varredura de 50 mV/s..... 107
- Figura 49 - (A) Eletropolimerização do EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO₄ e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens. (B) Voltametria cíclica dos sensor recoberto com PEDOT-OH e GOx durante 10 s de polimerização, em PBS 0,1 M e velocidade de varredura de 50 mV/s..... 108
- Figura 50 - Voltametria cíclica para determinação da quantidade de GOx imobilizada no eletrodo de trabalho recoberto com PEDOT-OH, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s..... 109
- Figura 51 - Espectros de FTIR do PEDOT-OH sintetizado sobre o eletrodo de trabalho, após da enzima GOx, e das amostras PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx.... 111
- Figura 52 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os sensores recobertos com PEDOT-OH em (A), (D) e (G); PEDOT-OH/GOx em (B), (E) e (H); e PEDOT-OH+GOx em (C), (F) e (I). 112
- Figura 53 - Espectroscopia de EDX das amostras (A) PEDOT-OH, (B) PEDOT-OH/GOx, e (C) PEDOT-OH+GOx. 114
- Figura 54 - Microscopia topográfica das superfícies dos biossensores durante as etapas de construção, (a) PEDOT-OH, (b) PEDOT-OH/GOx e (c) PEDOT-OH+GOx. 116
- Figura 55 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do sensor para as duas condições de imobilização da GOx. A ciclagem foi realizada em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s. 118
- Figura 56 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do sensor para as duas condições de imobilização da GOx adicionando glicose 1 mM ao meio. A ciclagem foi realizada em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s..... 119
- Figura 57 - Voltametria cíclica para a amostra PEDOT-OH/GOx em PBS 0,1M em velocidades de varredura de 25 a 300 mV/s, e no detalhe relação entre as

-
- densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos e diferentes velocidades de varredura, e linha de tendência com equação característica. 120
- Figura 58 - Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para o sensor construído com PEDOT-OH/GOx em PBS 0,1 M. Detalhe indica a densidade de corrente de estabilização para cada potencial verificado em 200 s. 121
- Figura 59 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PEDOT-OH (sem GOx) e PEDOT-OH/GOx (com GOx) em -600 mV PBS 0,1 M e adições de glicose 1 mM a cada 100s. 122
- Figura 60 - Cronoamperometria para detecção de PBS e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de -600 mV. Cada perturbação ocorreu na concentração de 1mM a cada 100 s. 123
- Figura 61 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de -600 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s. 124
- Figura 62 – Ilustração de célula eletroquímica com três eletrodos ligados a um potenciostato, e no detalhe o eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono recobertos com níquel, que catalisam a oxidação da glicose. 125
- Figura 63 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 100 s em potencial de -600 mV. 126
- Figura 64 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor. 127
- Figura 65 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 50 s, representadas pelas flechas pretas no sensor de PEDOT-OH+GOx. 129
- Figura 66 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor. 130
- Figura 67 - Detecção de glicose em duas amostras sanguíneas de dois indivíduos diferentes depositadas na superfície do sensor de PEDOT-OH em potencial de -600 mV. No detalhe são mostrados os valores para cálculo da concentração equivalente a densidade de corrente obtida e as medidas obtidas com o sensor comercial OneTouch UltraMini ®. 131

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de diabetes.....	27
Tabela 2 - Estrutura química dos principais polímeros condutores.....	34
Tabela 3 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e quantidades de reagentes utilizados.....	71
Tabela 4 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PPI/PEO e PPI/PEO/GOx obtidas por EDX.....	76
Tabela 5 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e condições de construção.....	90
Tabela 6 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx obtidas por EDX.....	95
Tabela 7 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e quantidades de reagentes utilizados.....	110
Tabela 8 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PEDOT-OH, PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx obtidas por EDX.....	115
Tabela 9 - Comparação entre os resultados analisados através do sensor desenvolvido com PEDOT-OH e o sensor comercial OneTouch UltraMini® da empresa Johnson & Johnson para cinco amostras de sangue.....	132
Tabela 10 – Performance de diferentes sensores eletroquímicos para detecção de glicose.....	133

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AA	Ácido Ascórbico
AFM	Microscopia de Força Atômica
Ag/AgCl	Eletrodo de Referência de Prata / Cloreto de Prata
AU	Ácido Úrico
CE	Contra eletrodo
Da	Dalton
DA	Dopamina
DLS	Dinâmica de Espalhamento de Luz
<i>e</i>	Enzima
<i>E</i>	Potencial Elétrico (V)
<i>E_a</i>	Energia de ativação
EDOT	3,4-etilenodioxitiofeno
EDOT-OH	Hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno)
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
<i>E_i</i>	Potencial inicial
<i>E_{max}</i>	Potencial máximo
FAD	Cofator Dinucleótido de Flavina-adenina
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
GLU	Glicose
GOx	Glicose Oxidase
<i>I</i>	Corrente elétrica (A)
IDF	Federação Internacional de Diabetes
<i>j</i>	Densidade de Corrente (A/cm ²)
<i>K_m</i>	Constante de Michaelis-Mentem
LED	Diodos emissores de luz
LOD	Limite de Detecção
Med	Mediador
Med _{ox}	Mediador oxidado

Med _{red}	Mediador reduzido
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MWCO	Peso molecular de retenção das membranas de ultrafiltração
PAni	Polianilina
PBS	Tampão fosfato salino
PCs	Polímeros condutores
PEDOT	Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)
PEDOT-OH	Poli (hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno)
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEO	Poli (óxido de etileno)
PIC's	Polímeros intrinsecamente condutores
PPi	Polipirrol
PSA	Persulfato de Amônia
PSS	Poliestireno sulfonado
PT	Politiofeno
Pt	Platina
PVA	Poli (álcool vinílico)
PVC	Poli (cloreto de vinila)
<i>r</i>	Rugosidade
R ²	Fator de correção
S	Substrato
U	Unidade enzimática
<i>v</i>	Velocidade de varredura (mV/s)
V _{max}	Velocidade máxima atingida
v _o	Velocidade inicial de reação
w	Espessura (cm)

Resumo

A monitorização da glicemia é a forma mais popular de acompanhar o tratamento do diabetes e entender o funcionamento do organismo em relação a certos alimentos, à prática de atividades físicas e à administração de medicamentos. O presente trabalho teve como objetivo a produção de sensores para detecção de glicose, utilizando polipirrol (PPi) disperso, poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) submetido a tratamento corona ou poli(hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT-OH) como transdutores e glicose oxidase (GOx) como enzima responsável pela catálise da glicose. O polipirrol foi obtido em dispersão através de síntese química com poli (óxido de etileno) (PEO), para facilitar o método de aplicação no sensor por *casting*, enquanto que o PEDOT e o PEDOT-OH foram sintetizados eletroquimicamente proporcionando excelente cobertura do eletrodo de trabalho. A enzima GOx foi imobilizada por adsorção sobre os três diferentes sensores produzidos com PPi/PEO, PEDOT ou PEDOT-OH, ainda foi produzido um biossensor com GOx imobilizada por *entrapment* ou confinamento durante a síntese eletroquímica do PEDOT-OH, com o propósito de avaliar o melhor método de imobilização enzimática para a produção de um biossensor sensível e seletivo. A morfologia e as estruturas dos biossensores foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva de raios-X, microscopia de força atômica, espectroscopia no infravermelho e espectroscopia RAMAN. A eletroatividade dos polímeros e das etapas de desenvolvimento dos sensores foi verificada com voltametria cíclica. Provou-se, através de análises de cronoamperometria, que os sensores desenvolvidos são capazes de detectar diferentes concentrações de glicose, além de obter a equação característica, que determina a densidade de corrente elétrica em função da concentração de substrato utilizado. O sensor de PEDOT-OH não necessitou da enzima GOx para a detecção de glicose, inclusive em amostras sanguíneas.

Abstract

Blood glucose monitoring is the most popular way of monitoring the treatment of diabetes and understanding the functioning of the body in relation to certain foods, the practice of physical activity and medication administration. This study aimed to produce sensors for glucose detection using dispersed polypyrrole (PPI), poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) subjected to corona treatment or poly(hydroxymethyl-3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT -OH) as transducers and glucose oxidase (GOx) as the enzyme responsible for the catalysis of glucose. The polypyrrole dispersion was obtained by chemical synthesis with poly(ethylene oxide) (PEO), in order to facilitate the application method in the sensor by casting, while the PEDOT and PEDOT-OH were synthesized electrochemically providing excellent cover to work electrode. The GOx enzyme was immobilized by adsorption on three different sensors made with PPI/PEO, PEDOT or PEDOT-OH; it was also produced a biosensor with GOx immobilized by entrapment during the electrochemical synthesis of PEDOT-OH, with the purpose of evaluating the best method for enzyme immobilization for producing a sensitive and selective biosensor. The morphology and structures of biosensors were analyzed by scanning electron microscopy, energy dispersive X-ray, atomic force microscopy, infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. The electroactivity of polymers and sensor development stages was checked with cyclic voltammetry. It has been proven through analysis of chronoamperometry that it was developed sensors capable of detecting different concentration of glucose and allow the obtaining of the characteristic equation, which determines the current density as a function of the substrate concentration used. The PEDOT-OH sensor does not require the GOx enzyme for the detection of glucose, including blood samples.

1. INTRODUÇÃO

O número de casos de diabetes vem crescendo com o passar dos anos. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) indica que no ano de 2015, 415 milhões de pessoas vivem com diabetes no mundo e estima que no ano de 2040, 642 milhões de pessoas serão portadoras desta doença. (DIABETES, 2015) Como até hoje não possui cura, as pessoas portadoras de diabetes necessitam saber conviver e monitorar diariamente o teor de glicose.

A monitorização da glicemia é a principal forma de acompanhar o tratamento do diabetes e entender o funcionamento do organismo em relação a certos alimentos, à prática de atividades físicas e à administração de medicamentos. É recomendado aos pacientes portadores de diabetes a verificação de seus níveis glicêmicos várias vezes durante o dia para ter uma ideia da eficácia do tratamento proposto e da necessidade de mudanças. A recomendação das sociedades médicas é checar a glicose sanguínea em jejum, além de antes e após duas horas das principais refeições (café da manhã, almoço e jantar), antes de deitar e no meio da madrugada.

Atualmente, o mercado farmacêutico disponibiliza vários modelos de monitores de glicemia, ou tiras teste de glicose, como são mais conhecidas. Estas tiras representam 85% da indústria de biossensores e cerca de 5 bilhões de dólares ao ano. (NEWMAN; TURNER, 2005) A grande maioria das tiras teste de glicemia encontradas no mercado são produzidas por empresas multinacionais, tornando seu custo bastante elevado. Além destes gastos, as pessoas e famílias comprometem seus recursos com o uso da insulina e outros medicamentos essenciais, porém muitas vezes estes são fornecidos pelo sistema público de saúde, que ainda sofre com os impactos devido ao aumento da utilização de serviços de saúde para tratar complicações relacionadas a diabetes como insuficiência renal, cegueira ou problemas cardíacos. Os gastos com diabetes representam de 5 a 20% da despesa total em saúde. (DIABETES, 2015) Com um custo tão elevado para monitoramento, tratamento e controle, a doença é um desafio significativo para os sistemas de saúde.

Por estes fatores a pesquisa nesta área torna-se cada vez mais necessária, onde são buscados testes cada vez mais compactos, precisos, sensíveis, seletivos e baratos. Para alcançar estas características vem sendo testados diferentes materiais, como polímeros condutores que transmitem sinais elétricos e podem servir de matriz para a imobilização de enzimas sem proporcionar a sua desnaturação.

Entre estes polímeros destacam-se o polipirrol e o poli(3,4-etilenodioxitiofeno), os quais vem atraindo uma atenção especial para a aplicação em biossensores amperométricos de glicose. O polipirrol apresenta-se estável em condições ambientes, o monômero é oxidado facilmente e pode ser preparado a partir de soluções aquosas e neutras, facilitando o aprisionamento das biomoléculas e evitando a sua lixiviação. Já o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) possui alta condutividade, transparência quando forma filme no estado oxidado e grande estabilidade. (AUGUSTO, 2012) Além destas características pode ser destacado que para ambos os polímeros quando obtidos na forma de nanoestruturas, ocorre um aumento considerável da área superficial do eletrodo de trabalho dos biossensores melhorando sua sensibilidade.

Neste estudo buscou-se o desenvolvimento da metodologia de produção de biossensores amperométricos de glicose com polipirrol ou poli(3,4-etilenodioxitiofeno) como transdutor e glicose oxidase como agente sensor. Os polímeros foram sintetizados de diferentes formas para estudo de técnicas de imobilização enzimática e de produção dos biossensores. O polipirrol foi obtido em sua forma condutora através de síntese química, disperso em um meio viscoso para facilitar a aplicação e a formação de filme, na forma de nanoestruturas para aumentar a área superficial de detecção e permitir a imobilização da enzima diretamente sobre a dispersão polimérica, produzindo um biossensor de fácil fabricação, simples e de baixo custo. O poli(3,4-etilenodioxitiofeno) ou seu derivado poli(hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno) foram polimerizados eletroquimicamente diretamente sobre o eletrodo de trabalho do biossensor. A enzima foi imobilizada de duas formas, a primeira, através de *entrapment* diretamente durante a síntese eletroquímica, e a segunda diretamente sobre o polímero formado sobre o eletrodo, confrontando diferentes formas de imobilização enzimática. Além disso foram ainda verificadas a sensibilidade e seletividade dos diferentes protótipos desenvolvidos.

O desenvolvimento deste trabalho conta com a fabricação e estudo de três dispositivos distintos, construídos de forma semelhante quanto a sua estrutura, mas a partir de técnicas diferentes. Estes dispositivos referem-se a um biossensor enzimático produzido com um polímero condutor obtido por síntese química, um biossensor enzimático produzido com polímero condutor e submetido a tratamento corona e um biossensor não enzimático produzido com polímero condutor obtido por síntese eletroquímica.

Como estratégia de organização da tese, o capítulo inicial de revisão bibliográfica foi tratado de forma conjunta, enquanto que na parte experimental e apresentação dos resultados, os dispositivos foram tratados separadamente com exceção aos aspectos comuns a ambos os biossensores. Assim, o trabalho foi organizado basicamente em três partes, onde, no primeiro capítulo, serão introduzidos e abordados os conceitos utilizados no estudo. No capítulo seguinte, encontra-se uma descrição detalhada dos procedimentos experimentais utilizados, culminando com a descrição das técnicas de caracterização dos materiais e sensores produzidos. O último capítulo abordará os resultados obtidos para cada biossensor desenvolvido, referente aos diferentes métodos de síntese e imobilização estudados, além da sensibilidade, linearidade, limites de detecção de concentrações de glicose, obtendo a curva de calibração dos biossensores.

2. OBJETIVOS

Estudar a detecção de glicose em um biossensor amperométrico simples, de baixo custo, eficiente, de fácil reprodução em escala e utilizando um polímero condutor (polipirrol, poli(3,4-etilenodioxitiofeno) ou poli(hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno)) e glicose oxidase como enzima.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica contempla os conceitos utilizados para o desenvolvimento deste estudo, bem como uma revisão sobre o cenário atual referente a biossensores produzidos com polímeros condutores.

3.1. Diabetes

A cada ano mais pessoas são portadoras de diabetes, além dos 415 milhões de adultos que atualmente estima-se que apresentam diabetes, existem 318 milhões de adultos com intolerância à glicose, o que os torna grandes candidatos a desenvolver a patologia no futuro. Muitos países ainda não estão conscientes do impacto social e econômico desta enfermidade. (DIABETES, 2015)

A diabetes é uma doença crônica caracterizada pela elevação da glicose no sangue (hiperglicemia), devido a defeitos na secreção do hormônio insulina pelo pâncreas, ou pela incapacidade de utilização do hormônio pelo corpo. Devido a insuficiência ou incapacidade de utilização da insulina, que é responsável pelo controle da entrada de glicose nas células do organismo para utilização nas atividades celulares, a glicose acumula-se no sangue aumentando seus níveis. (DIABETES, 2014; SBEM, 2014) Existem três principais tipos de diabetes, como pode ser observada na Tabela 1.

Os níveis normais de glicose no sangue podem variar de 4 – 8 mM (70 – 120 mg/dL), e em condições patológicas de 2 – 30 mM (30 – 500 mg/dL). Em índices hipoglicêmicos, pode causar episódios de desmaio e ser inclusive fatal, enquanto em índices hiperglicêmicos pode causar doenças circulatórias, acidentes vasculares cerebral, amputações, cegueira, insuficiência renal, dificuldade de cicatrização, degeneração do nervo ótico entre outros. (HELLER; FELDMAN, 2010; SCOGNAMIGLIO, 2013) Geralmente estes efeitos são consequência de um tratamento mal executado pelos portadores da doença.

Tabela 1 - Tipos de diabetes.

	Tipo 1	Tipo 2	Gestacional
Causas	Caracteriza-se por ser uma doença autoimune diagnosticada na infância ou adolescência causada pela falta de insulina;	Fatores genéticos ou maus hábitos de vida como sedentarismo, obesidade;	Aparece durante a gravidez;
Tratamento	Uso diário de insulina, alimentação sem açúcar e com baixa quantidade de carboidratos e pratica de exercícios;	Não é necessário uso diário de insulina. É controlada com remédios orais, alimentação adequada e exercício físico regular;	Alimentação adequada e exercícios. Tende a desaparecer após o nascimento o bebê.

Fonte: Adaptado de Atlas da Diabetes (2015, p. 12).

Portanto os portadores de diabetes necessitam realizar um controle dos níveis glicêmicos a fim de evitar possíveis complicações mais severas. Para o controle destes níveis a comunidade de pesquisa vem desenvolvendo importantes ferramentas de diagnóstico inteligente que sejam capazes de satisfazer um acompanhamento contínuo, não invasivo, de alta precisão, baixo custo, simples e confiáveis como os biossensores de glicose ou tiras de teste rápido.

3.2. Biossensores

Biossensores são dispositivos capazes de detectar variações físicas e/ou químicas de um sistema quando exposto a um determinado tipo de substância biológica. Estas variações são recebidas como mudanças de concentração ou polaridade na forma de um sinal elétrico como condutividade elétrica, diferença de potencial ou frequência de ressonância. (GREENSHIELDS, 2011) Desta forma, são utilizados para medição direta de um analito ou substrato em uma amostra, sendo o sinal gerado proporcional à concentração de substrato. (LOJOU; BIANCO, 2006)

Os biossensores, assim como os demais dispositivos eletrônicos, apresentam características específicas que determinam a sua qualidade, como a sensibilidade, seletividade, baixo tempo de resposta, precisão, estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados. Além destas, podem ser listadas algumas características desejadas que facilitam o seu manuseio e uso, como pequenas dimensões, funcionamento em temperatura ambiente, tempo de vida útil, baixo consumo de energia e baixo custo. (QUINTINO, 2003)

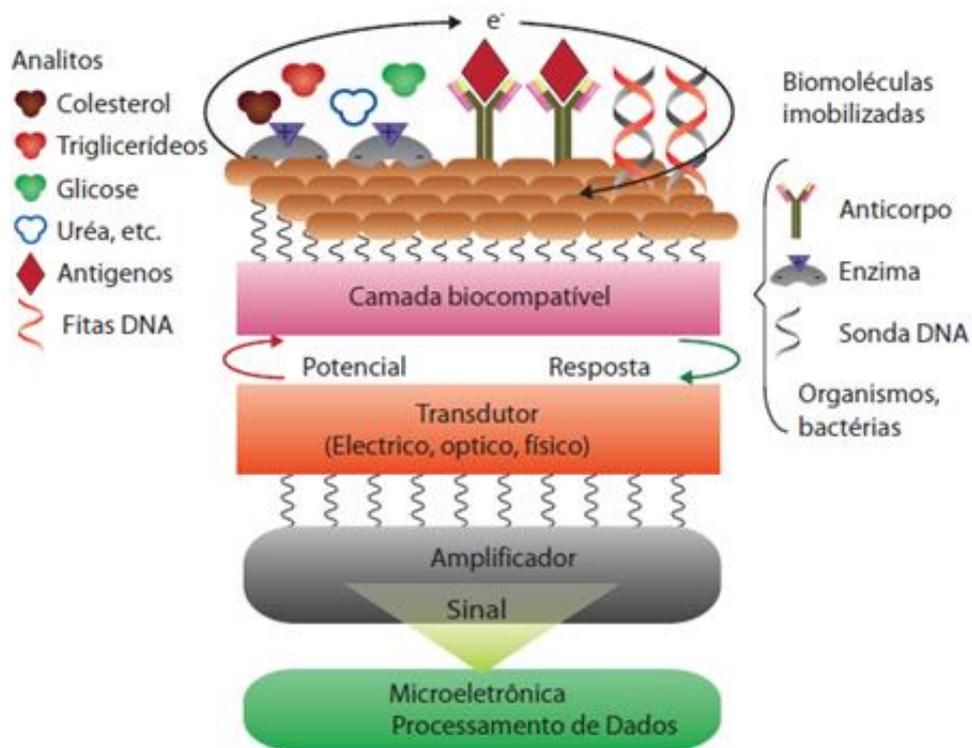
Sensores eletroquímicos são compostos de três eletrodos: um de trabalho, um de referência e um contra eletrodo. Em biossensores eletroquímicos, sobre o eletrodo de trabalho encontra-se dois elementos intimamente associados, o bioreceptor, que é um elemento sensível biologicamente responsável pelo reconhecimento do analito de interesse, imobilizado em um elemento transdutor, responsável pelo transporte e conversão do sinal produzido pela reação da substância de interesse em contato com o elemento sensório ou bioreceptor. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012)

A escolha do elemento sensório, ou bioreceptor, e do transdutor adequado, depende de cada amostra e do tipo de medida que se tem interesse. O bioreceptor determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor, e faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal químico, que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação. O elemento sensório, na maior parte das vezes é constituído de enzimas ou anticorpos imobilizados, que melhoram a seletividade destes dispositivos, pois realizam interações específicas com o analito avaliando a sua concentração na amostra. Estes caracterizam o elemento chave do biossensor. (LOJOU; BIANCO, 2006; QUINTINO, 2003)

Já para a escolha do transdutor existem requisitos básicos que devem ser considerados como: o material deve ser adequado para adaptação do bioreceptor imobilizado; altamente específico para o substrato de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação química e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada; apresentar resposta rápida além de ser econômico. (MELLO; KUBOTA, 2007; MELO, 2008)

Dependendo de como o sinal químico é detectado e transmitido, os biossensores podem ser amperométricos (medidas de corrente), condutimétricos (medidas de mudança de condutividade), ópticos (medidas de absorção ou emissão de luz), calorimétricos (medidas de variação de entalpia), potenciométricos (medidas de potencial), entre outros. (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007) A utilização de sensores com polímeros condutores como transdutores pode ocorrer na qualificação ou quantificação de um grande número de substâncias químicas e biológicas e para aplicações que variam desde o controle da qualidade de alimentos e bebidas, em indústrias farmacêuticas, ao diagnóstico clínico e detecção de armas químicas e biológicas. (GREENSHIELDS, 2011) Na Figura 1 pode ser contemplado um esquema representativo da estrutura de um biossensor.

Figura 1 - Esquema representativo da estrutura e princípio de operação de um biossensor.



Fonte: Solanki et al., (2011, p. 17).

Os biossensores amperométricos medem a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto ou reagente geralmente na aplicação de um potencial constante. Dependem tipicamente de um elemento sensatoivo que converta

cataliticamente substratos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo. (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; MELO, 2008)

A eficiência de um biossensor amperométrico é mensurada a partir de alguns critérios de desempenho. O conhecimento destes torna-se importante para indicar a natureza dos passos limitantes e realizar a otimização do biossensor. Muitos destes critérios de desempenho são mensurados através de técnicas de voltametria cíclica ou cronoamperometria, as quais auxiliam na determinação da equação característica de resposta do biossensor frente a perturbações do sistema pela adição do substrato em análise. Com a determinação da equação característica do protótipo pode-se determinar a concentração de certo substrato em determinada amostra através de medidas de corrente elétrica.

A equação característica ou curva de calibração para o biossensor é definida por uma equação de reta no formato da equação (1):

$$y = a \times x + b \quad (1)$$

Onde y representa a corrente elétrica medida; a é a inclinação da curva de calibração e indica a sensibilidade do biossensor; x representa a concentração de substrato analisado e b é o ponto onde a curva corta o eixo y do gráfico.

O intervalo de concentrações onde a curva possui comportamento linear representa os limites inferior e superior de quantificação da concentração do substrato de interesse. (THÉVENOT et al., 2001)

Outros parâmetros de interesse são o limite de detecção (LOD) e a constante cinética de Michaelis-Menten (K_m). O LOD expressa a mais baixa concentração de substrato, ou analito, que o processo analítico pode detectar de forma fidedigna. (MOCÁK et al., 1997) Já a constante cinética de Michaelis-Menten foi determinada em 1913 por Leonor Michaelis e Maud Menten como uma estimativa da constante de

dissociação aparente do complexo enzima-substrato para enzima-produto, representando uma estimativa da velocidade de dissociação do substrato pela enzima e formação de produto. Quanto maior o valor de K_m menor a probabilidade de formação de produto, significando que pode existir um obstáculo entre a amostra e a camada de reação prejudicando a difusão do substrato ou a velocidade de reação da enzima-substrato é aumentada. A determinação da K_m pode ser realizada pela equação de Lineweaver-Burke, equação (2):

$$i_p^{-1} = i_{max}^{-1} + (K_m i_{max}^{-1}) \times (conc\ subs)^{-1} \quad (2)$$

Onde i_{max} é a corrente máxima quando o meio esta saturado de substrato, i_p é a corrente no estado estacionário após a adição do substrato de interesse e **conc subs** é a concentração do substrato.

Construindo o gráfico **1/concentração de substrato x 1/corrente**, e determinando a equação da reta, pode-se determinar o K_m , pela divisão da inclinação da reta pelo ponto de interseção no eixo y, que representa a corrente máxima. (FENG et al., 2015; MOHAMMADI et al., 2009)

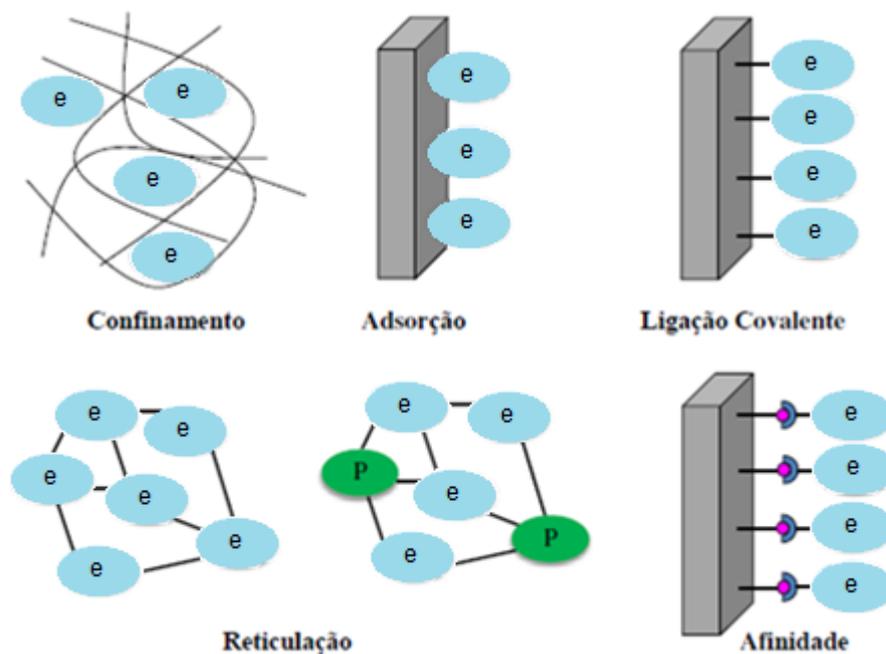
Desta forma para a produção de um biossensor amperométrico enzimático é necessário realizar a imobilização da enzima na superfície do eletrodo de forma que esta apresente o maior número de sítios ativos disponíveis, desenvolvendo um dispositivo eficiente e com elevada performance, como estabilidade operacional e de armazenamento, alta sensibilidade e seletividade, tempo de resposta curto e alta reprodutibilidade. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012)

As enzimas quando imobilizadas possuem uma maior estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura, porém o processo de imobilização sempre resulta em um decréscimo de sua atividade catalítica, pela desnaturação da enzima ou por alterações conformacionais modificando a sua estrutura ou seu sítio ativo, provocando uma perda na sensibilidade do sensor. (D'SOUZA; GODBOLE, 2002; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012) Assim, as biomoléculas necessitam manter sua estrutura e função para manter a atividade biológica após a imobilização, além de permanecer fortemente ligadas a superfície do eletrodo garantindo que não sejam

dessorvidas durante a utilização do biossensor. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012)

Existem muitas técnicas de imobilização de enzimas, entre elas podemos destacar a adsorção, ligação covalente, reticulação, afinidade ou confinamento (Entrapment) (Figura 2).

Figura 2 - Esquema representativo dos diferentes métodos de imobilização enzimática, onde e=enzima e P=proteína inerte.



Fonte: Sassolas et al., (2012, p. 491).

Nos processos mais simples como adsorção e confinamento, ocorrem poucas perturbações sobre o suporte e a estrutura da enzima, havendo apenas ligações físicas da enzima com a matriz inerte. Nos processos que envolvem reações químicas como as ligações covalentes ou reticulações, as alterações são mais drásticas, podendo levar a uma perda da atividade enzimática quando a ligação da enzima na matriz ocorre através do sítio ativo, mas geralmente, conferem ao biossensor melhor estabilidade operacional. Todos os métodos apresentam vantagens e desvantagens, a escolha da técnica mais apropriada depende da natureza da enzima, do transdutor e do modo de detecção associado. (TEMOÇIN; YIĞITOĞLU, 2009; YEŞILOĞLU, 2005)

Para a escolha do suporte de imobilização nos biossensores amperométricos enzimáticos devem ser observadas algumas propriedades, como: resistência, grau de porosidade, grupos funcionais passíveis de modificação, estabilidade mecânica, custo-benefício, entre outros. (YOO; LEE, 2010) A escolha correta do transdutor, que favorece a imobilização das enzimas orientadas sobre a sua superfície para a exposição do sítio ativo para a solução de análise, permite a obtenção de um sensor com elevada sensibilidade. (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012)

Entre os suportes para a imobilização das enzimas ou transdutores destacam-se os polímeros condutores. Estes integram os sinais químicos produzidos pelos elementos de detecção com a solução de interesse e transmitem o mesmo na forma de sinal elétrico. (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007) Os polímeros condutores apresentam maior utilização em sensores amperométricos, e são capazes de transmitir os elétrons produzidos pela reação redox do substrato com a enzima a um potencial constante até o eletrodo final devido a capacidade de condução de sua cadeia polimérica com ligações duplas conjugadas.

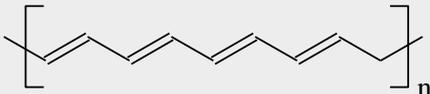
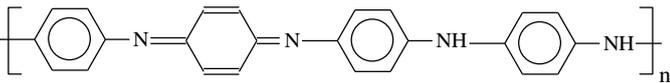
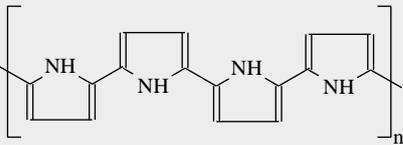
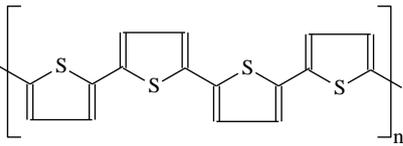
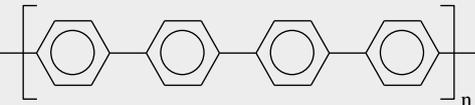
3.3. Polímeros Intrinsecamente Condutores (PIC's)

O interesse pelos polímeros intrinsecamente condutores (PIC) surgiu em 1977, quando Chiang et al. (1977) descobriram que ao tratar poliacetileno com ácido ou base de Lewis, a condutividade poderia aumentar em até onze ordens de grandeza, devido a remoção ou inserção de elétrons na cadeia, dopando o polímero. (MAIA et al., 2000) Desde então estes materiais tem atraído o interesse de inúmeros grupos de pesquisa, devido a apresentarem o comportamento elétrico, óptico e magnético semelhante ao dos semicondutores inorgânicos mas pertencer a classe dos polímeros. Nos últimos anos ocorreu um impulso nas utilizações e aplicações tecnológicas destes materiais, empregando-os na construção de baterias recarregáveis, sensores químicos e térmicos, biossensores e ainda em proteção contra corrosão e recobrimento de materiais. (MATTOSO, 1996)

As cadeias dos PIC's contêm anéis aromáticos ou cadeias lineares contendo duplas ligações C=C conjugadas, compostas por uma ligação *sigma* (σ), ligação forte, e uma ligação *pi* (π), menos localizada e fraca. Essa ligação dupla é perturbada pela

remoção (oxidação) ou adição (redução) de elétrons o que permite a formação de íons. A oxidação/redução da cadeia polimérica ocorre por agentes de transferência de carga (dopantes) os quais convertem o polímero de isolante em condutor. (FAEZ et al., 2000; FRANÇA; DALL'ANTONIA, 2007; LANGE; ROZNYATOVSKAYA; MIRSKY, 2008) Na Tabela 2 podem ser visualizadas as estruturas químicas neutras dos principais polímeros condutores e seus valores de condutividade elétrica.

Tabela 2 - Estrutura química dos principais polímeros condutores.

Polímero	Estrutura Química	Condutividade (S.cm ⁻¹)
Poliacetileno		10 ³ a 10 ⁶
Polianilina		10 a 10 ³
Polipirrol		600
Politiofeno		200
Poli(p-fenileno)		500

Fonte: Adaptado de Faez et al, (2000, p. 2).

As reações de oxidação ou redução da cadeia polimérica têm como consequência a formação de cargas positivas ou negativas deslocalizadas, as quais são neutralizadas pela incorporação de ânions ou cátions chamados de dopantes. Estes não fazem parte da estrutura, e são inseridos entre as cadeias poliméricas durante a síntese, podendo ser removidos através da aplicação de um potencial

elétrico, tornando a dopagem um processo reversível. Os agentes de transferência de carga, ou dopantes, são adicionados nos polímeros em concentrações de até 50% da massa total do composto, e pelo grau de dopagem os valores de condutividade do polímero podem variar de isolante até condutor. (DAVOGLIO, 2009; FAEZ et al., 2000; MATTOSO, 1996)

Essa classe de polímeros pode ser sintetizada por dois diferentes métodos: químico e eletroquímico. A que mais se destaca é a síntese química, devido à possibilidade de produção de grandes quantidades de polímeros em pó ou filmes espessos, sendo favorável para escala industrial, por possuir diversas rotas de síntese, sendo muitas delas muito simples para produção de uma variedade de PIC's. Já a síntese eletroquímica produz filmes finos os quais são muito difíceis de serem retirados da superfície de eletrodos de natureza variada. As propriedades elétricas e físico-químicas do material eletrossintetizado são fortemente dependentes das condições operacionais da síntese, como a natureza do meio eletrolítico, concentração do monômero, densidade de corrente, temperatura entre outras. (FAEZ et al., 2000; GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007; MATTOSO, 1996)

As condições de polimerização utilizadas não só determinam a composição do polímero, mas também influenciam sua estrutura a nível molecular e microscópico. Conforme a técnica utilizada é possível a obtenção de nanoestruturas de diferentes tamanhos, distribuição e para diversas áreas de aplicação. Uma área de aplicação dos nanomateriais poliméricos que vem despertando interesse é a detecção de espécies biológicas, devido ao elevado desempenho obtido pela maior área de superfície exposta quando comparado a polímeros com estruturas de tamanhos convencionais. (RAJESH; AHUJA; KUMAR, 2009; RAO; GECKELER, 2011)

As nanoestruturas de PIC's podem apresentar uma estrutura porosa que proporciona maiores interações do polímero com o meio, fazendo com que o tempo de resposta seja significativamente mais rápido. Como resultado, apresentam um desempenho muito superior quando comparado a polímeros obtidos por síntese convencional, principalmente em sensores químicos, que exigem grande sensibilidade e interações com o meio-ambiente. (HUANG et al., 2004; KUO; WEN, 2008; XIA; WEI; WAN, 2010)

Com a descoberta desta classe de polímeros inúmeros materiais puderam ser desenvolvidos, principalmente com polianilina, que apresenta fácil processabilidade e baixo custo, mas produz produtos de degradação tóxicos limitando suas aplicações; politiofeno, que é mais amigável mas insolúvel e infusíveis e polipirrol. (GROENENDAAL et al., 2000)

3.3.1. Polipirrol

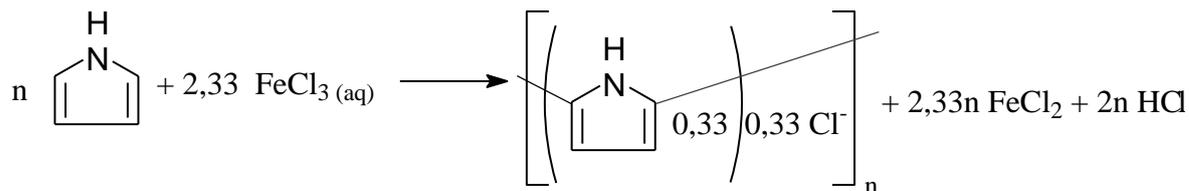
O polipirrol (PPI) está dentre os polímeros condutores mais conhecidos, sendo tema de muitos estudos devido a sua elevada condutividade elétrica, boa estabilidade ambiental obtida pelo baixo potencial de oxidação, versatilidade de síntese, além de ser o polímero mais frequentemente utilizado em aplicações industriais, pois apresenta longa estabilidade de sua condutividade e a possibilidade de formar homopolímeros ou compósitos com ótimas propriedades mecânicas. (SAUNDERS; FLEMING; MURRAY, 1995) O polipirrol podem ser obtido em solução pelo uso de um oxidante químico na polimerização química, ou por oxidação em um substrato condutor na polimerização eletroquímica. (NALWA, 1997)

O processo de dopagem do polipirrol ocorre simultaneamente com a oxidação da cadeia, onde elétrons são retirados durante a oxidação e há a inserção de contra íons dopantes para balancear a carga. A dopagem é do tipo-p, onde a remoção inicial de um elétron da cadeia leva à formação do estado eletrônico *polaron* e, conseqüentemente, à distorção da cadeia da forma aromática para a forma quinoide que se estende por quatro anéis pirrólicos. Com a perda de mais elétrons formam-se os *bipolarons* com duas cargas positivas localizadas na mesma região inicialmente distorcida. Ocorre então uma maior relaxação da rede cuja distorção encontra-se altamente localizada sobre quatro anéis pirrólicos. A forma oxidada é condutora, enquanto que a forma reduzida é isolante para o polipirrol. (BREDAS; STREET, 1985; DE OLIVEIRA; DOS SANTOS, 2000; FAEZ et al., 2000; MÜNSTEDT et al., 1987)

O PPI pode ser preparado através de síntese química ou eletroquímica. A polimerização química é um processo simples e rápido, produzindo grandes quantidades de pó de PPI através da polimerização oxidativa do monômero por agentes oxidantes químicos em solventes aquosos ou não aquosos. O cloreto férrico

(FeCl₃) destaca-se como agente oxidante e a água como solvente para a polimerização química e produção de um polímero com desejável condutividade. (ANSARI, 2006) Na Figura 3 pode ser visualizada a reação estequiométrica global resultante da polimerização química do PPI com o oxidante FeCl₃.

Figura 3 - Polimerização química do PPI com FeCl₃ como agente oxidante.



Fonte: Adaptado de Ansari (2006, p. 187).

Nalwa (1997) e Machida; Miyata e Techagumpuch (1989) afirmam que o PPI ao ser sintetizado a baixas temperaturas, entre 0 e 4°C, apresenta valores de condutividade elétrica, quando em solução aquosa, superiores as realizadas a temperatura ambiente. Ao ser sintetizado com sais oxidantes como FeCl₃ o polímero já é obtido no estado oxidado e dopado, pois o Fe(III) atua como oxidante, e o contra íon Cl⁻ é incorporado a matriz polimérica como dopante, mantendo a eletroneutralidade da matriz do polímero. (ANSARI, 2006)

A melhor razão molar entre o Fe(III) e monômero de pirrol é de aproximadamente 2,33. Concentrações altas de sal de ferro resultam em queda nos valores de condutividade. O mesmo ocorre com o aumento do tempo de reação, tempos de reação muito extensos prejudicam a condutividade do polímero. (NALWA, 1997)

A síntese eletroquímica do PPI ocorre através da perda de íons de hidrogênio do anel que se combinam formando dímeros, e sofrem re-oxidação ocorrendo a propagação da cadeia pela combinação de radicais até não haver mais monômeros disponíveis. Uma polimerização eletroquímica típica é realizada com a adição de dopante/eletrólito como o perclorato de lítio (LiClO₄) em acetonitrila, a qual produz filmes de boa qualidade. O contra íon utilizado é responsável pela condutividade, solubilidade, morfologia e propriedades mecânicas do polipirrol formado. (MEDEIROS et al., 2012; SAVILLE, 2005)

Atualmente as pesquisas com o polipirrol estão voltadas para a obtenção de nanoestruturas na forma de nanofibras, (AL-MASHAT et al., 2008; FENG; YAN; ZHANG, 2009) nanopartículas, (YANG; LIU, 2010) nanofios, nanoredes, (LI; BAI; SHI, 2009) as quais proporcionam um aumento na área superficial e uma boa condutividade elétrica devido ao rápido transporte iônico dentro da matriz, além de serem favoráveis para a imobilização de componentes biologicamente ativos. (BISWAS; DRZAL, 2010)

A formação de nanoestruturas pode ser influenciada pela incorporação de um componente secundário, formando um nanocompósito. Esta incorporação torna-se interessante quando as propriedades dos PIC's são ampliadas, ocorrendo um incremento nas propriedades químicas, físicas e biológicas. (LU et al., 2011)

A utilização de polímeros convencionais solúveis em água como o poli(óxido de etileno) (PEO), polietilenoglicol (PEG) e o poli(álcool vinílico) (PVA) na síntese de polímeros condutores, facilita a estabilização e a formação de uma dispersão durante o processo de polimerização. (CUTLER; BOUGUETTAYA; REYNOLDS, 2002; LI; JING, 2009; PERCEC et al., 2012) Estes polímeros produzem um meio de reação de alta viscosidade, o que dificulta a transferência de massa entre as espécies influenciando no tempo de reação, na morfologia e no tamanho das nanoestruturas. (LI; JING, 2009)

Por outro lado, ao adicionar polímeros convencionais como os citados ao meio de síntese de polímeros condutores, os quais são isolantes, pode diminuir a eletroatividade, mas facilitar a aplicação sobre a superfície de sensores através da formação de filme permitindo a atuação como transdutores.

Percec et al. (2012) estudaram a obtenção de PPI na forma de nanoestruturas pelo processo de polimerização em água com polímeros solúveis, como o PVA, PEO, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulose, entre outros. Relataram que ao sintetizar PPI em PVA usando como oxidante $FeCl_3$, ocorreu a formação da dispersão mais estável e a presença de nanopartículas de menor tamanho quando comparado a síntese do PPI com os demais polímeros solúveis pesquisados. Os autores ainda observaram um aumento na taxa de reação com o aumento do peso molecular e concentração de PVA, e que o tamanho das partículas de PPI produzidas são inversamente proporcionais a velocidade de polimerização.

Sensores para detecção de metanol foram produzidos com PPI-PEO por Lin; Yang e Hwang (1999). Estes sensores apesar de apresentarem uma resposta mais lenta para altas concentrações de metanol, mostraram uma sensibilidade maior que os mesmos sensores produzidos apenas com PPI, além de proporcionarem uma melhora na estabilidade do sensor em condições ambientes.

Hwang (1999) produziu sensores para detecção de etanol na forma de gás por síntese eletroquímica de PPI-PEO. Este relatou que a incorporação de PEO ao polímero condutor aumenta a constante de equilíbrio de adsorção e altera a resistência da camada sensora, proporcionando um aumento na sensibilidade destes sensores.

3.3.2. Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)

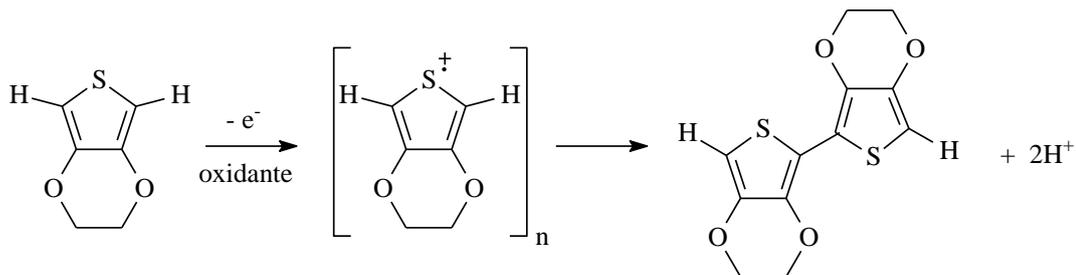
Para superar a insolubilidade do politiofeno, polianilina e polipirrol, a Bayer®, motivada pela busca de um polímero condutor facilmente oxidável, solúvel e estável, produziu o poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT). O derivado do politiofeno foi preparado usando o método padrão de oxidação química ou polimerização eletroquímica e apresenta uma condutividade perto de 300 S/cm e grande estabilidade no estado oxidado mas continua apresentando o mesmo inconveniente, é insolúvel e não pode ser reprocessado. (GROENENDAAL et al., 2000)

O polímero condutor produzido atraiu um interesse considerável por apresentar um baixo potencial de oxidação, alta condutividade elétrica, boa transparência óptica e excepcional estabilidade ambiental, permitindo sua aplicação em atuadores mecânicos, optoeletrônica, detecção bioquímica e química, liberação de fármacos, aparelhos de estimulação neurológica. Assim, conforme a utilização do PEDOT deve-se determinar o tipo de síntese e o agente oxidante utilizado, os quais são responsáveis por afetar características do material, como morfologia, cristalinidade, condutividade e propriedades mecânicas, especialmente quando busca-se aplicações biomédicas. (FABREGAT et al., 2014; LYUTOV et al., 2016)

O monômero 3,4-etilenodioxitiofeno (EDOT) é constituído por um anel de tiofeno com suas posições β , correspondentes aos carbonos 3 e 4 do anel heterocíclico, bloqueadas para outras adições ou acoplamentos por um dioxietileno, o

que origina um esqueleto polimérico regular que permite polymerizações apenas na posição α , ou correspondentes aos carbonos 2 e 5. (CASSEMIRO, 2013; TRAN-VAN et al., 2001) A estrutura do monômero EDOT e o processo de polymerização e formação do PEDOT podem ser contemplados na Figura 4.

Figura 4 - Polymerização do PEDOT a partir do monômero EDOT.



Fonte: Adaptado de Fabretto et al., (2009, p. 7873).

A síntese do PEDOT e seus derivados pode ser realizada de três diferentes formas: polymerização por oxidação química do monômero EDOT, polymerização eletroquímica do monômero EDOT e pelo acoplamento de derivados de EDOT mediados por metais de transição. A polymerização química pode ser realizada pela utilização de inúmeros métodos e oxidantes, destacando-se como agente oxidante o $FeCl_3$ ou ferro III p-toluenosulfonato ($Fe(OTs)_3$). Como produto da reação resulta um composto negro, insolúvel que dificilmente pode ser caracterizado e aplicado. (FABRETTO et al., 2009; GROENENDAAL et al., 2000; OH; IM, 2002)

Para resolver o problema da solubilidade, o PEDOT passou a ser sintetizado na presença de poli(estireno sulfonato) (PSS), um poliânion solúvel em soluções aquosas, que funciona como dopante pela incorporação de polications nas cadeias do PEDOT, compensando a diferença de carga. A produção do PEDOT:PSS permite a formação de uma dispersão coloidal que facilita a deposição de filmes finos, podendo ser utilizados como eletrodos de diodos emissores de luz (LEDs), em sensores, em energia fotovoltaica, entre outros, porém devido a esta solubilidade em água, são altamente higroscópicos, tornando-se instáveis o que reduz a condutividade. (AUGUSTO, 2012; NARDES et al., 2008)

Em contrapartida a polimerização do PEDOT pode ser realizada pelo método eletroquímico, o qual requer pequenas quantidade de monômero, tempos de polimerização curtos, permite o controle da espessura do filme e a garantia de formação de filmes homogêneos, condutores, de boa qualidade e reprodutíveis em todos os eletrodos. (BELAIDI et al., 2015; GROENENDAAL et al., 2000)

Na sua grande maioria, os filmes de PEDOT são produzidos com a utilização de solventes orgânicos, pois o EDOT é pouco solúvel em água. Desta forma, os filmes podem ter suas propriedades afetadas durante a síntese eletroquímica com a alteração do solvente utilizado, do material do eletrodo e da metodologia de síntese. (RIBEIRO, 2015)

Biossensores para detecção de glicose foram desenvolvidos por Nien; Tung e Ho (2006) Estes foram construídos utilizando PEDOT como matriz para imobilização da enzima catalisadora da glicose, a qual foi simultaneamente aprisionada durante a eletropolimerização sobre eletrodos de platina. Como solução de análise para detecção de glicose Nien; Tung e Ho utilizaram tampão fosfato salino (PBS) com glicose e ferroceno como mediador. O biossensor desenvolvido apresentou intervalo linear de detecção de 0,1 a 10 mM de glicose e um tempo de resposta de 4 a 10 s.

Nien; Tung e Ho (2006) ainda relataram que Fabiano et al. (2002) utilizaram pela primeira vez PEDOT como uma matriz para imobilização de enzima catalisadora da glicose. O biossensor produzido apresentou um tempo de resposta de 2 a 5 s e uma resposta linear de 0,2 a 8 mM de glicose, porém, apresentou uma perda de estabilidade do sinal elétrico de 40% em 30 dias. O sensor foi construído com PEDOT:PSS como matriz para imobilização enzimática, e esta ocorreu durante a polimerização.

A produção de biossensores com PEDOT por métodos eletroquímicos desenvolveu imenso interesse devido à alta sensibilidade, excelente seletividade, resposta rápida e boa confiabilidade. Por outro lado, a necessidade de uso de um dopante como o PSS para facilitar o processo de imobilização e a baixa estabilidade destes biossensores, reduzindo seu tempo de prateleira, levaram os pesquisadores a utilização de diferentes técnicas, materiais e inclusive o desenvolvimento de sensores não enzimáticos para a produção de promissores sensores para a detecção de glicose. (HUI et al., 2015)

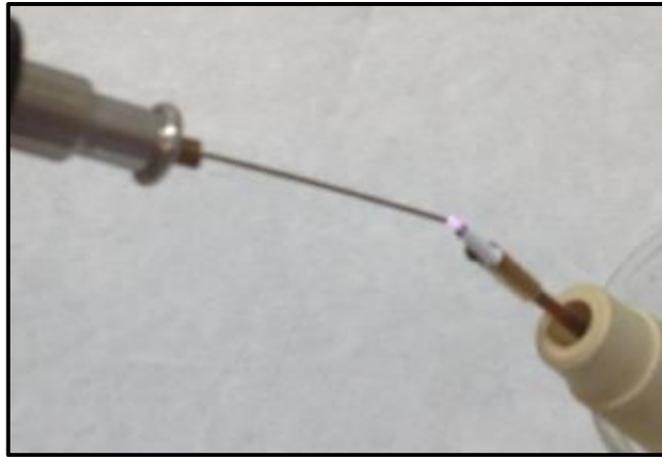
A fim de melhorar o desempenho dos biossensores e a eficiência de imobilização enzimática, as plataformas de detecção passaram a ser produzidas com nanofios de polímeros, nanotubos de carbono, óxido de grafeno e nanopartículas metálicas. O óxido de grafeno apresenta alta hidrofiliabilidade e grande área superficial aumentando a transferência de elétrons. (CHOE; AHMED; JEON, 2016) As nanopartículas metálicas permitem aumentar a transferência de elétrons entre o centro redox das enzimas e a superfície do eletrodo, entre estas as que mais se destacam são as nanopartículas de ouro devido a suas altas atividades catalíticas, condutividade e estabilidade. (PHONGPHUT et al., 2013; SABURY; KAZEMI; SHARIF, 2015; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012) Porém ao adicionar estes materiais ocorre um aumento considerável no custo dos biossensores.

Fomentando a ideia de melhoria de desempenho dos biossensores existem algumas alternativas que podem ser buscadas além da incorporação de nanopartículas metálicas e grafeno, uma destas seria a realização de um tratamento da superfície do polímero condutor aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Um tratamento superficial que pode trazer benefícios para o desenvolvimento de um biossensor é o tratamento corona.

O tratamento corona é um processo onde aplica-se uma elevada tensão elétrica rompendo o dielétrico e ionizando o ar até a superfície a ser tratada. A descarga elétrica geralmente desenvolve um arco azulado quando realizada a pressão atmosférica. O campo elétrico criado acelera os elétrons que colidem e atacam continuamente a superfície arrancando elétrons e deixando as moléculas excitadas, as quais se decompõem espontaneamente em radicais, íons e fótons, produzindo átomos quimicamente ativos. (CARRADÒ et al., 2011; ZHANG; SUN; WADSWORTH, 1998)

A descarga corona é produzida entre dois eletrodos metálicos, por exemplo, uma ponta e um plano, sendo o polímero, o qual sofre o tratamento, inserido sobre o eletrodo plano. As propriedades superficiais dos filmes tratados são influenciadas pela tensão aplicada na descarga, a distância entre a ponta e o filme, o tempo de tratamento, a atmosfera utilizada, a umidade relativa e a temperatura. (SELLIN, 2002) Na Figura 5 pode ser contemplado o arco formado pelo tratamento corona sendo aplicado sobre eletrodo de carbono vítreo recoberto com PEDOT.

Figura 5 - Imagem ilustrando o tratamento corona sendo aplicado sobre eletrodo de carbono vítreo recoberto com PEDOT.



Fonte: Foto de experimento realizado pela autora.

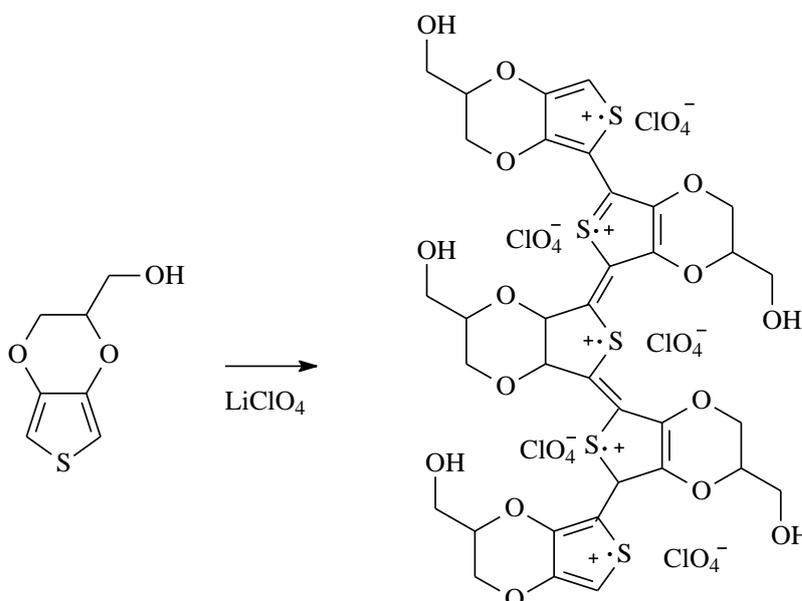
A descarga corona na presença de ar atmosférico é composta de íons carregados positivamente, elétrons e espécies excitadas de oxigênio e nitrogênio. As energias das partículas são suficientes para quebrar ligações C - C e C - H e gerar radicais livres na superfície do polímero, os quais podem reagir com átomos de oxigênio e formar grupos polares na superfície. (FARLEY; MEKA, 1994)

Este tratamento implica em modificações morfológicas e químicas importantes como alterações na aparência externa e a formação de grupos funcionais. Como resultado do tratamento, a superfície sofre um aumento na tensão superficial devido a introdução de grupo polares pela oxidação do material, um aumento do número de poros e conseqüentemente da rugosidade da superfície e uma melhora na molhabilidade, fatores que podem favorecer a imobilização enzimática e permitir o transporte de elétrons. (CARRADÒ et al., 2011; SELLIN, 2002)

Outra alternativa muito mais simples para otimizar os biossensores produzidos com PEDOT seria a utilização de algum de seus derivados que apresentam características especiais devido a funcionalização do anel de dioxano com substituintes capazes de interagir com outras moléculas. Um destes derivados é o poli(hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT-OH).

Poli(hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno) apresenta um pequeno e flexível substituinte polar, um grupo funcional –OH, ligado no anel dioxano que proporciona solubilidade ao polímero em solventes aquosos além de permitir a interação com outras moléculas através de pontes de hidrogênio. Sua síntese eletroquímica ocorre a um potencial de oxidação menor quando comparado ao monômero do PEDOT, além de ser possível utilizar água como meio de síntese, mais viável do ponto de vista ecológico e econômico. (HSIAO et al., 2010; LU et al., 2012) A síntese eletroquímica do PEDOT-OH pode ser visualizada na Figura 6, onde o meio de síntese é uma solução aquosa de LiClO_4 .

Figura 6 - Síntese eletroquímica do monômero EDOT-OH em solução aquosa de LiClO_4 produzindo PEDOT-OH.



Fonte: Adaptado de Wen et al. (2012 p. 462).

O filme obtido pela síntese eletroquímica do monômero hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno (EDOT-OH) mantém inalteradas as características eletrônicas do PEDOT, definidas pelo sistema p-conjugado, e a seletividade em análises sensoras. Ainda apresenta melhor condutividade ($\sim 700 \text{ S/cm}$), melhores propriedades eletroquímicas, electro-ópticas, melhor biocompatibilidade, podendo ser aplicados em sondas neurais, dispositivos fotovoltaicos e biossensores, que seu precedente. (FABREGAT et al., 2014; WEN et al., 2012)

Definidos os polímeros condutores utilizados como transdutores nos sensores, seus meios de síntese e tratamento para melhoria de desempenho, necessita-se conhecer os elementos participantes da camada sensora, responsáveis pela catalise do analito de interesse na amostra a ser analisada. A camada sensora na maioria dos casos é composta por enzimas.

3.4. Enzimas

As enzimas são proteínas de elevado peso molecular, especializadas na catálise de reações biológicas, com extraordinária especificidade e poder catalítico. Possuem uma estrutura tridimensional complexa de uma ou várias cadeias polipeptídicas, ou ainda, de resíduos de carboidratos. Elas catalisam certa espécie de reação química com um único reagente ou um número de reagentes estruturalmente similares. As reações catalisadas por enzimas podem ser usadas para a determinação de substratos, ativadores, inibidores e, também, da própria enzima. (NELSON; COX, 2006)

As enzimas convertem uma substância, substrato, em outra, produto, realizando a catalise de um só tipo de reação química. A velocidade da reação é aumentada devido ao abaixamento da energia de ativação (E_a) necessária para converter o substrato em produto não alterando o equilíbrio químico da reação. (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006) Embora a enzima participe da sequência da reação, ela não sofre nenhuma transformação com o decorrer desta, ou seja, a enzima catalisa o substrato, volta ao seu estado original e está pronta para converter outra molécula de substrato em produto.

A velocidade inicial de uma reação enzimática é diretamente proporcional ao número de sítios ativos (estrutura presente na enzima que se liga ao substrato), quando a concentração de substrato não está em níveis de saturação. (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006) A ação enzimática pode ser afetada por alguns fatores, os quais atuam no mecanismo cinético das reações aumentando ou diminuindo a velocidade reacional pela modificação na estrutura dos sítios ativos alterando a atividade catalítica. Entre estes destacam-se:

- *Temperatura*: as enzimas possuem temperaturas ótimas, nas quais apresentam um máximo de atividade. Em temperaturas baixas as enzimas encontram-se muito rígidas e em temperaturas altas (maior que 50°C) a atividade cai bruscamente devido a desnaturação da enzima;

- *pH*: cada enzima apresenta um pH ótimo de máxima atividade. Sua variação pode alterar os aminoácidos com grupos ionizados ou não-ionizados do sítio ativo enzimático, provocando conformações da enzima ou desnaturação da mesma;

- *Cofatores*: componentes não proteicos que se associam à enzima para sua ativação. Os cofatores podem ser íons metálicos como o Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} ou moléculas orgânicas derivadas de vitaminas;

- *Inibidores*: são moléculas que podem inibir a ação catalítica de uma enzima pela ocupação temporária do centro ativo, através de uma semelhança estrutural com o substrato original, caracterizando os inibidores competitivos, ou pela alteração da conformação espacial da enzima pela ligação do inibidor em sítio ativo diferente ao do substrato, impedindo a ocorrência da reação, caracterizando o inibidor não competitivo. (NELSON; COX, 2006)

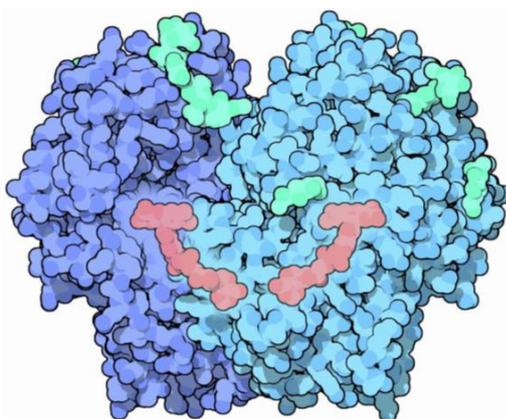
Muitas enzimas são produzidas a partir de fungos, entre estas podemos destacar a glicose oxidase (GOx), enzima responsável pela oxidação da glicose em ácido glucônico, utilizando oxigênio molecular como acceptor de elétrons e produzindo simultaneamente peróxido de hidrogênio. Esta enzima apresenta inúmeras aplicações comerciais como a remoção de oxigênio de sucos de frutas e bebidas em latas, em maionese industrial para evitar sua deterioração, até a detecção e estimativa de glicose em soluções industriais ou em fluidos corporais como sangue e urina. (BANKAR et al., 2009)

3.4.1. Glicose Oxidase

A glucose oxidase (GOx) é uma enzima obtida de fungos como o *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium amagasakiense* e *Penicillium purpurogenum*, mas a sua principal obtenção é do fungo *Aspergillus niger*. (HATZINIKOLAOU; MACRIS, 1995) Estruturalmente é composta de uma glicoproteína dimérica constituída por duas cadeias de polipeptídios ligadas covalentemente por

pontes de sulfeto. Seu peso molecular varia de 130 a 175 KDa. (HELLMUTH et al., 1995) Na Figura 7 pode ser visualizada a estrutura da GOx, que para funcionar como catalisador da glicose apresenta um cofactor, o dinucleótido de flavina-adenina (FAD) representado pelas estruturas de coloração rosa, responsáveis pelas reações redox na enzima.

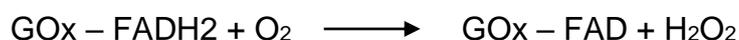
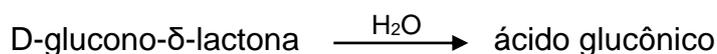
Figura 7 - Estrutura da enzima GOx, destacando em cor de rosa o cofator FAD e em verde resíduos de carboidratos.



Fonte: The Scripps Research Institute (GOODSELL, 2006).

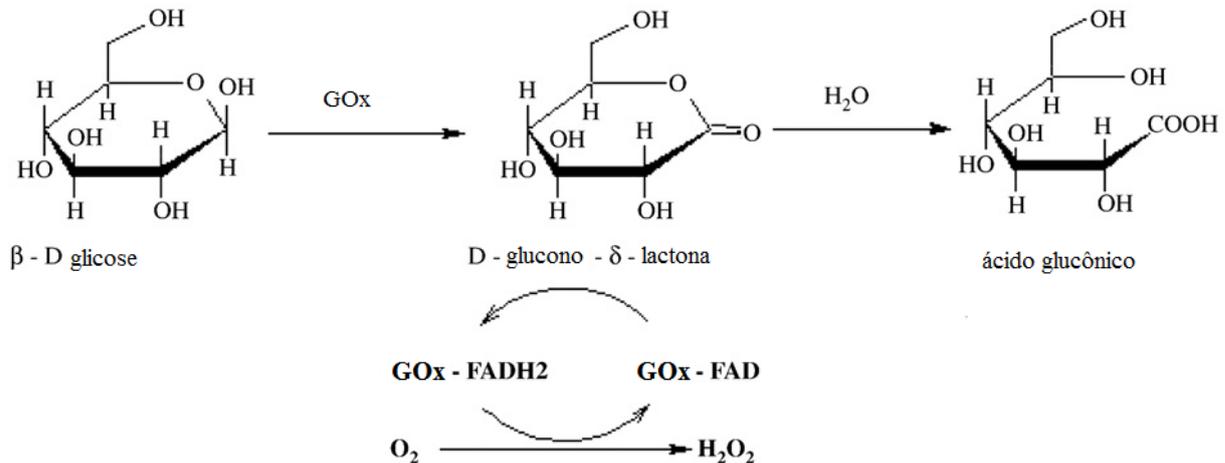
A GOx é uma enzima da classe das oxirredutases que catalisam reações por trocas de cargas ou de oxirredução utilizando o oxigênio molecular como acceptor de elétrons e gerando como subproduto peróxido de hidrogênio. É uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose pela redução do cofator FAD para FADH₂ em D-glucono- δ -lactona, que espontaneamente, sem a ação enzimática, se hidrolisa em ácido glucônico. O cofator FADH₂ é regenerado por meio da reação com oxigênio a FAD e produz peróxido de hidrogênio como pode ser observado na Figura 8. (BANKAR et al., 2009)

A reações podem ser escritas da seguinte forma:



O H_2O_2 é oxidado liberando dois elétrons. O fluxo de elétrons é proporcional ao número de moléculas de glicose presentes na amostra. (YOO; LEE, 2010)

Figura 8 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase.



Fonte: Bankar et al., (2009, p. 490)

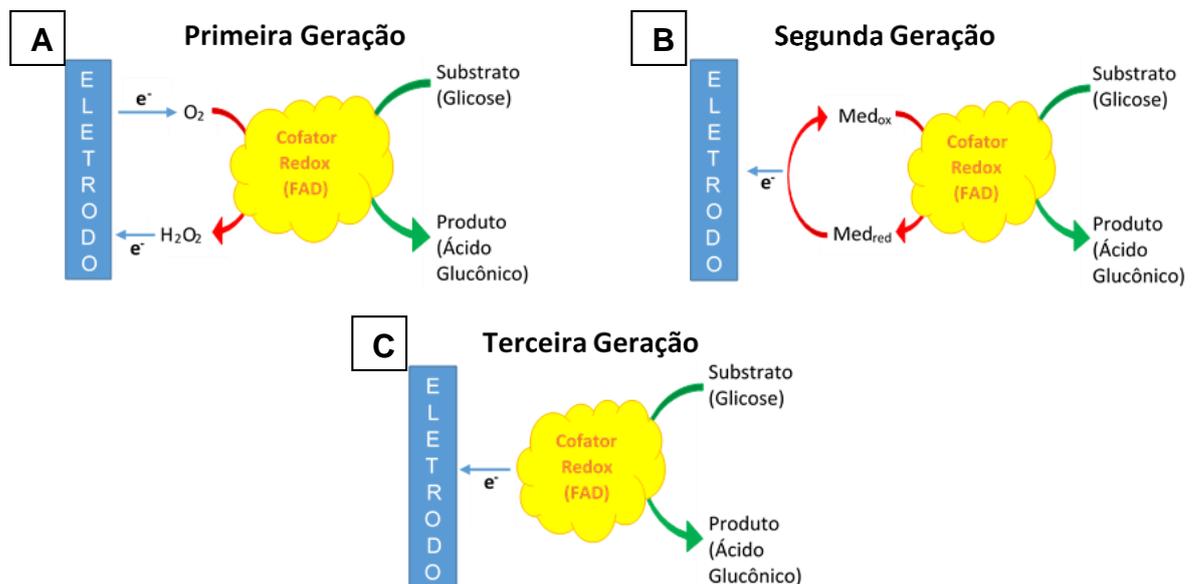
A GOx é uma enzima altamente específica para a β -D-glicose, desta forma a atividade enzimática é dependente da manutenção de sua conformação adequada. Para isto são necessários alguns cuidados: o pH ótimo da GOx é 5,5, mas possui um intervalo de pH entre 4 e 7 que mantém sua atividade; temperatura ambiente é ideal para não ocorrer a sua desnaturação e, deve-se evitar a presença de alguns inibidores do sítio ativo, como Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , bissulfato de sódio, hidroxilamina, entre outros. (YOO; LEE, 2010)

Esta enzima representa grande interesse e importância para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e em pesquisas científicas. Ainda é utilizada em análises clínicas como principal reagente para a determinação dos níveis de glicose sanguínea devido ao custo relativamente baixo e a boa estabilidade. Conhecidos e determinados os componentes dos biossensores de glicose pode-se explorar o funcionamento e particularidades.

3.5. Biossensores Amperométricos de Glicose

O primeiro sensor amperométrico de glicose foi desenvolvido em 1973, onde foi oxidado o peróxido de hidrogênio produzido pela reação da glicose com a enzima. A enzima GOx foi considerada como a ideal para a oxidação da glicose devido à alta seletividade, sensibilidade e estabilidade. Com o desenvolvimento das pesquisas foi possível obter sensores que detectam a glicose de diferentes formas, dependendo do transdutor empregado, e assim foram classificados de acordo com o processo de transferência de cargas em biossensores amperométricos de primeira, segunda e terceira geração. (TOGHILL; COMPTON, 2010) Na Figura 9 está apresentado um esquema dos biossensores de primeira, segunda e terceira geração.

Figura 9 - Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos, (A) biossensores de primeira geração, (B) biossensores de segunda geração e (C) biossensor de terceira geração.



Fonte: Adaptado de Das et al., (2016, p. 387).

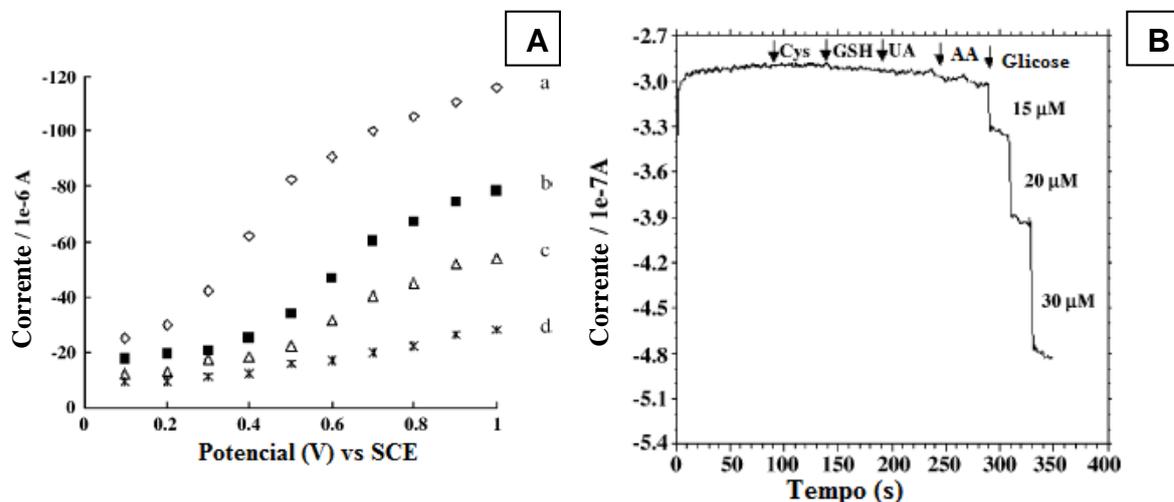
Os biossensores de glicose de primeira geração estão baseados na utilização de um co-substrato, o oxigênio natural, para a detecção de peróxido de hidrogênio. A reação biocatalítica envolve a redução do cofator FAD da enzima, pela reação com a glicose, a FADH₂, seguida pela reoxidação do FADH₂ com oxigênio molecular para

regenerar a forma oxidada da enzima GOx e produzir peróxido de hidrogênio. (TOGHILL; COMPTON, 2010; WANG, 2008; YOO; LEE, 2010)

As medições de peróxido de hidrogênio têm a vantagem de ser bem mais simples pois além de ser um produto da oxidação da GOx com a glicose, ele se oxida em um potencial específico liberando dois elétrons. O problema desta medição amperométrica é que o potencial de operação da reação de oxirredução do H₂O₂ é elevado, como por exemplo para o eletrodo de platina vs Ag/AgCl o potencial anódico é de 0,6V, potencial onde ocorre a oxidação de outros compostos presentes no sangue, como o ácido úrico e o ácido ascórbico, tornando necessário uma elevada seletividade do biossensor. Além disso depende de níveis estáveis de oxigênio livre como catalisador da reação enzimática. (TOGHILL; COMPTON, 2010; WANG, 2008)

Xian et al. (2006) desenvolveram biossensores com compósitos de nanopartículas de ouro (AuNPs), nanofibras de PANi (PANi), Nafion e GOx, sensíveis e seletivos a detecção de glicose pela oxidação eletroquímica de H₂O₂. Para definição do potencial utilizado para a detecção da glicose através da oxidação eletroquímica do H₂O₂, foram realizados experimentos com biossensores modificados, sem a presença da GOx imobilizada, em soluções de 8x10⁻⁴ mol/L de H₂O₂ (Figura 10 (A)). A corrente anódica aplicada para cada potencial elétrico estudado apresentou um aumento considerável no biossensor com AuNPs/PANi/Nafion a partir do potencial de 0,4 V. Os autores escolheram o potencial de 0,6 V como garantia da oxidação eletroquímica do H₂O₂. O biossensor obteve uma curva de calibração linear ao longo de intervalo de 1x10⁻⁶ a 8x10⁻⁴ mol/L, e a seletividade a agentes interferentes foi atribuída a permeabilidade seletiva da membrana Nafion (Figura 10 (B)).

Figura 10 – (A) Resposta eletroquímica em diferentes potenciais a adição de 8×10^{-4} mol/L de H_2O_2 em PBS 0,1 M pH 6,9 nos biossensores (a) AuNPs/PAni/Nafion, (b) nanofibras de PAni, (c) filme convencional de PAni e (d) eletrodo GCE. (B) Resposta amperométrica do biossensor AuNPs/PAni/GOx/Nafion a adições subsequentes de 1×10^{-4} M de L-cisteína(Cys); 1×10^{-4} M de glutatona (GSH); 5×10^{-4} M ácido úrico (UA), 5×10^{-4} M de ácido ascórbico (AA) e 15, 20 e 30 μ M de glicose em PBS 0,1 M a potencial de 600 mV vs SCE.



Fonte: Adaptado de Xian et al. (2006).

Devido a esta dependência de oxigênio observada nos biossensores de glicose de primeira geração foram desenvolvidos os biossensores de glicose de segunda geração, onde são utilizados mediadores redox que facilitam a transferência de elétrons pois o mediador é reduzido quando a enzima reoxida da forma $FADH_2$ para FAD ao invés de produzir peróxido de hidrogênio. Em seguida o mediador é reoxidado pelo potencial aplicado no eletrodo resultando em uma corrente elétrica quantificável. Estes mediadores podem ser ferricianetos, metais de transição, azul de metileno, entre outros. A facilidade em utilizar mediadores é devida à possibilidade de utilizar um potencial redox inferior, o que evita a oxidação de espécies interferentes, além de apresentarem baixa toxicidade e elevada estabilidade. (TOGHILL; COMPTON, 2010; YOO; LEE, 2010) Na Figura 11 pode ser visualizado um biossensor de glicose comercial de segunda geração indicando todas as partes de sua estrutura.

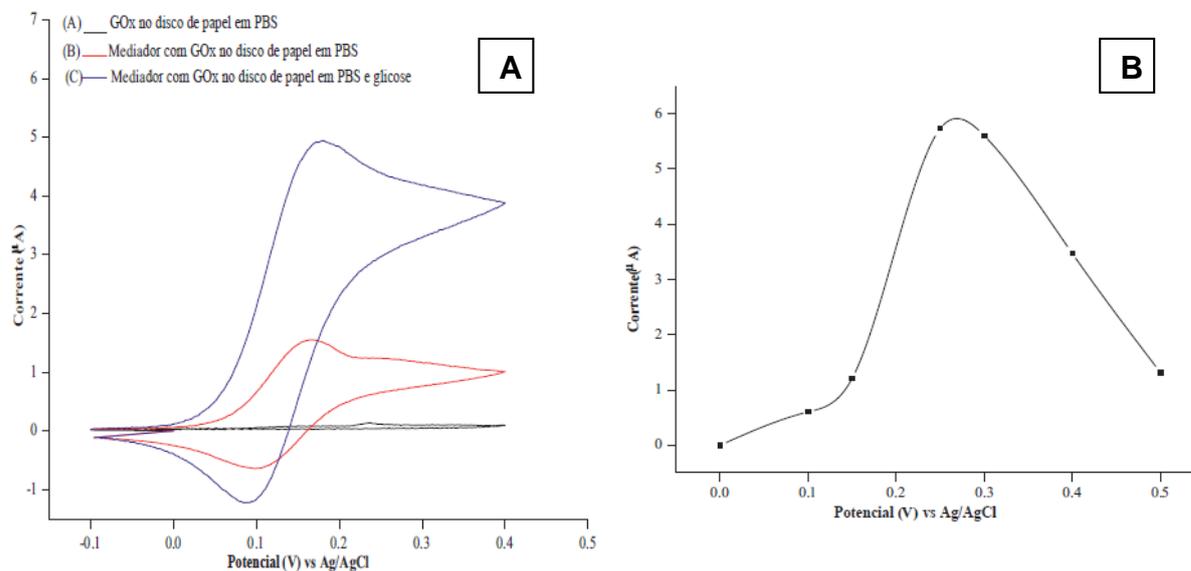
Figura 11 - Visão ampliada da estrutura de uma tira eletroquímica comercial para monitoramento de glicose usada para o controle de diabetes, preenchida parcialmente no adesivo com uma gota de sangue.



Fonte: Heller and Feldman, (2008, p. 2493).

Lawrence, Tan e Floresca (2014) desenvolveram biossensores amperométricos para glicose a partir de eletrodos de carbono, obtidos por *silk-screen*, recobertos com um disco hidrofílico de papel de celulose no qual foi aplicado o mediador ácido ferroceno monocarboxílico (Fc-COOH) e a enzima GOx. Para determinar o potencial da resposta amperométrica para detecção de glicose, primeiramente foram realizadas voltametrias cíclicas (Figura 12 (A)), onde foi possível observar que a oxidação da glicose é dependente da proximidade do mediador e da GOx para permitir uma mediação eficiente da reação enzimática. Definido o intervalo de potenciais onde ocorre a oxidação do ferroceno, foi possível verificar através de resposta cronoamperométrica (Figura 12 (B)) o potencial de 0,25 V vs Ag/AgCl, onde o ferroceno apresentou maiores valores de corrente de oxidação para detecção da glicose com maior sensibilidade. Os biossensores detectaram glicose no intervalo de concentração de 1 a 5 mM com um limite de detecção de 0,18 mM.

Figura 12 - (A) Voltametria cíclica da GOx imobilizada no biossensor de disco de papel em (A) PBS 0,1 M pH 7; (B) com Fc-COOH em PBS 0,1 M e (C) com Fc-COOH em PBS 0,1 M e glicose 5 mM em velocidade de varredura de 25 mV/s. (B) Efeito do potencial aplicado no biossensor de disco de papel com mediador Fc-COOH a resposta amperométrica com 5 mM de glicose em PBS 0,1 M.



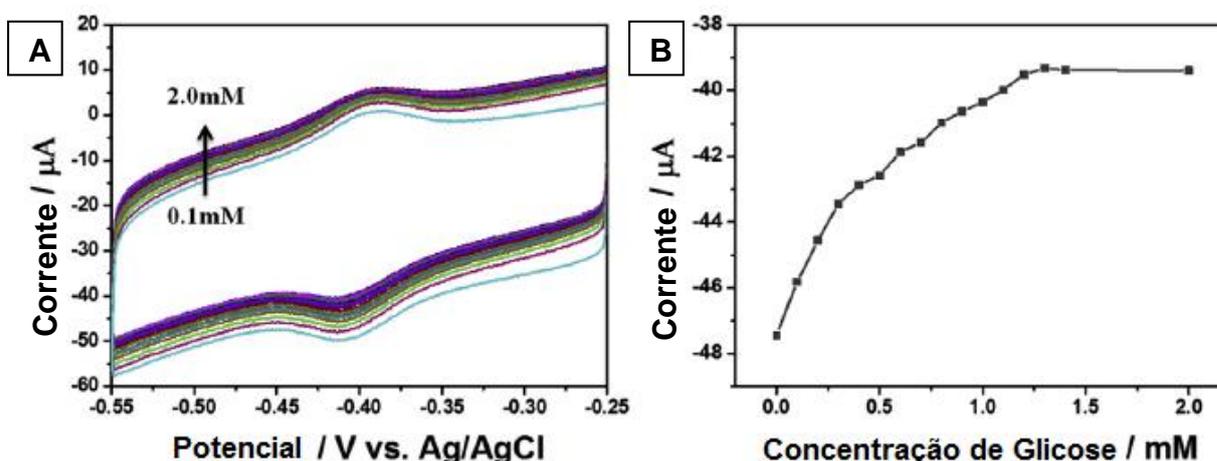
Fonte: Adaptado de Lawrence, Tan e Floresca, (2014, p. 538).

Os biossensores de terceira geração foram desenvolvidos com o intuito de eliminar o mediador, não depender de oxigênio livre e diminuir o potencial de operação do sensor a fim de não detectar interferentes. Para isso, o sensor passou a operar em potenciais de oxidação-redução da enzima. Neste tipo de biossensor enzimático os elétrons são transferidos diretamente da reação de oxidação da enzima da forma FADH₂ para FAD pelo potencial aplicado no eletrodo. Para que ocorra essa transferência é necessário garantir que a distância entre estes seja a mais curta possível. Para diminuir essa distância podem ser utilizados materiais condutores orgânicos como complexos de transferência de carga. O sistema polipirrol/GOx é um exemplo de biossensor de terceira geração pois a GOx fica imobilizada entre as estruturas do polímero facilitando o transporte de elétrons. (WANG, 2008; YOO; LEE, 2010) Este sistema seria o mais perfeito pois seriam melhoradas a seletividade e sensibilidade do biossensor, trabalhando apenas com o potencial de oxidação da enzima imobilizada.

Hyun et al. (2015) desenvolveram biossensores sensíveis a glicose a partir da imobilização da GOx por adsorção em nanotubos de carbono (CNT). Os autores

verificaram através de voltametria cíclica (Figura 13(A)) a atividade catalítica e a detecção de glicose através das reações eletroquímicas diretas da enzima GOx, pelo aumento do pico da corrente de oxidação com o aumento da concentração de glicose. A relação entre a corrente de oxidação e a concentração de glicose (Figura 13(B)) demonstra que com o aumento na concentração de glicose ocorre a redução do cofator FAD para FADH₂ aumentando sua concentração, e durante as medidas do voltamograma ocorre a reoxidação aumentando os valores de corrente.

Figura 13 – (A) Voltametria cíclica dos biossensores GOx/CNT em diferentes concentrações de glicose de 0,1 à 2 mM. (B) Relação entre o pico de corrente produzido pelos biossensores GOx/CNT e concentração de glicose. Os experimentos foram realizados em PBS 1 M à velocidade de varredura de 10 mV/s.



Fonte: Adaptado de Hyun et al. (2015, p. 2204).

3.5.1. Polímeros Condutores em Biossensores de Glicose

Com a descoberta da compatibilidade de polímeros condutores com moléculas usadas em biossensores na década de 1980 as pesquisas nesta área expandiram enormemente. A partir deste momento foi verificado que os PIC's podem ser depositados em eletrodos para biossensores e podem se ligar com biomoléculas para proporcionar um mecanismo de transdução mais eficaz. O PPI foi um dos primeiros PIC's estudados devido a facilidade em suportar a adesão celular e o crescimento de diferentes tipos de células. (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007)

A maioria das pesquisas realizadas com o uso de PPI em biossensores envolve a síntese do polímero pelo método eletroquímico. Neste método a enzima já pode ser inserida junto no processo de polimerização, ficando as biomoléculas aprisionadas entre as estruturas do PPI. Este processo permite ainda a formação de nanoestruturas o que aumenta a área superficial do eletrodo de trabalho, melhorando a resposta do biossensor. A espessura da película de polímero e a quantidade de enzima imobilizada podem ser ajustados de acordo com as condições aplicadas no processo de polimerização.

Os primeiros biossensores amperométricos de PPI com GOx desenvolvidos possuem a configuração de um biossensor de primeira geração. Vidal et. al. (1998) desenvolveram um biossensor de glicose pela eletropolimerização do monômero de pirrol com a enzima GOx diretamente sobre um eletrodo de trabalho de platina. A detecção amperométrica da glicose foi realizada pela oxidação do peróxido de hidrogênio formado na reação enzimática caracterizando um biossensor de primeira geração. Fortier; Brassard e Bélanger (1990) desenvolveram um biossensor de glicose com as mesmas configurações adotadas por Vidal et. al., porém observaram que a resposta amperométrica avaliada pela oxidação do peróxido de hidrogênio provoca a perda de eletroatividade do polímero condutor devido a liberação de ânions OH⁻ que substituem os ânions Cl⁻ dopantes da cadeia.

Uma forma de melhorar essa perda de eletroatividade é a incorporação de mediadores como ferrocianeto, ou partículas metálicas, como ouro e platina, no filme polimérico.

Njagi e Andreescu (2007) relataram a síntese química de nanopartículas de PPI e ouro usando como agente oxidante ácido cloroáurico e, ocorrendo a inserção da enzima GOx durante a formação das nanoestruturas na síntese. A inserção de nanopartículas de ouro produz uma elevada área superficial e melhora a capacidade de transferência de elétrons da reação de oxirredução da GOx para o agente transdutor do sensor. Neste estudo o PPI atua como um excelente agente transdutor pois serve como matriz para a incorporação das partículas de metal e como matriz para imobilização da enzima. O sensor obtido apresentou resultados favoráveis para a detecção de pequenas quantidades glicose ($2,1 \times 10^{-6}$ M) e apresentou um tempo de resposta de 10s.

Singh; Kathuroju e Jampana (2009) relataram a resposta de um biossensor de glicose com poli-metil-pirrol através da reação redox da GOx com a transferência de elétrons entre cofator FAD e o eletrodo. Através de voltamogramas cíclicos foi obtido o pico de oxidação e redução da enzima em -0,43 e -0,48 V respectivamente. O biossensor apresentou um alcance linear de detecção de 0 a 40 mM de glicose e um tempo de resposta de 3s. Este estudo fornece uma rota alternativa e mais rápida para a detecção eletroquímica de glicose, como sugerido pelos sensores de glicose de terceira geração.

A utilização de nanofibras de PEDOT com nanopartículas de paládio para o desenvolvimento de biossensor de glicose foi relatada por Santhosh et al., (2009). O biossensor foi desenvolvido com a eletropolimerização das nanofibras de PEDOT na superfície de um eletrodo de carbono vítreo e posteriormente foram incorporadas as nanopartículas de paládio e a enzima GOx por métodos eletroquímicos. O sensor produzido apresentou excelente performance para a detecção de glicose em potencial de 0,4 V; e foi capaz de detectar uma resposta linear de 0,5 a 30 mM de glicose com uma sensibilidade de 1,6 mA/M.cm².

Um biossensor de glicose produzido com PEDOT:PSS e grafeno foi desenvolvido por Wisitsoraat et al. (2013). O PEDOT:PSS comercial foi utilizado como eletrólito na exfoliação eletrolítica de varetas de grafite, produzindo uma estável dispersão de grafeno em uma solução de polímero condutor, que foi utilizada como transdutor eletroquímico e matriz para imobilização enzimática no biossensor. Neste protótipo a enzima foi imobilizada por reticulação com glutaraldeído e a inserção do grafeno permitiu que o sensor apresente um processo redox quase reversível com uma sensibilidade de 7,23 μ A/mM e um limite linear de detecção de 20 até 900 μ M. Porém o biossensor apresentou uma perda na atividade enzimática de 30% em 30 dias.

A construção de biossensores vem despertando interesse cada vez maior na comunidade científica e nas indústrias farmacêuticas. Com a vantagem da realização de análises clínicas de forma simples, otimizada e, principalmente, pela obtenção de um resultado rápido e confiável, os estudos desenvolvidos neste âmbito estão cada vez mais promissores.

Porém os pesquisadores desta metodologia ainda apresentam dificuldades em otimizar todas as etapas de produção envolvidas no desenvolvimento destes dispositivos. Os estudos são direcionados às técnicas de imobilização de enzimas nos polímeros condutores e aplicação destes em sensores laboratoriais, mas não na aplicação destes nas tiras de teste rápido.

Desta forma, cabe aos pesquisadores buscarem técnicas de aplicação da mistura polímero e enzima em sensores que possam de fato ser utilizados como uma tira de teste rápido, visando à otimização de uma metodologia de imobilização de enzimas em polímeros condutores que possa ser realizada em escala industrial e aplicação em uma tira de fácil construção e de baixo custo.

Portanto neste trabalho se objetivou o desenvolvimento de biossensores de glicose por diferentes métodos buscando a otimização de um processo que resulte em um biossensor sensível, que possa ser aplicado no mercado consumidor, de baixo valor agregado e que seja uma tecnologia nacional.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Materiais

Para a síntese dos polímeros condutores foram utilizados monômero pirrol (Sigma, reagente grau analítico 98%) previamente destilado, 3,4-etilenodioxitiofeno (Sigma, 97%), hidroximetil-3,4-etilenodioxitiofeno (Sigma, 95%), e como agente oxidante cloreto férrico (Sigma, reagente grau analítico 97%). O meio de síntese utilizado para o PEDOT foi solução de acetonitrila (Sigma, anidro, 99,8%) e perclorato de lítio (Sigma, reagente ACS, 95%) armazenado em forno a 80 °C, utilizado também no preparo da solução aquosa para síntese do PEDOT-OH. Para o Pi foi preparada uma solução aquosa com polióxido de etileno (PEO) (Sigma, $M_w=600 \times 10^3$ g/mol). O polipirrol obtido na síntese química foi purificado por diálise com membrana tubular porosa (MWCO de 12.000-14.000 Da) da Fisherbrand.

A enzima imobilizada nos biossensores foi glicose oxidase tipo VII (Sigma, pó liofilizado, 149,8 U/mg). Para a imobilização e ensaios de voltametria cíclica e cronoamperometria foram preparadas soluções tampão fosfato salino (PBS) nas concentrações de 10 mM e 0,1M, utilizando os seguintes sais: cloreto de sódio (Vetec, reagente ACS), cloreto de potássio (Neon, anidro), fosfato de sódio monobásico (Neon, anidro) e fosfato de sódio bibásico (Neon, anidro).

Nos ensaios de detecção de glicose e interferentes por cronoamperometria foram utilizados glicose (Vetec, reagente P.A.), cloridrato de dopamina (Sigma, reagente grau analítico), ácido ascórbico (configuração L, cristalina) (Sigma, reagente grau analítico) e ácido úrico (cristalino) (Sigma, reagente grau analítico).

4.2. Métodos

A descrição dos métodos de síntese dos polímeros condutores e de construção dos sensores foi dividida conforme o polímero condutor utilizado. Algumas

caracterizações puderam ser realizadas apenas com alguns protótipos, as quais serão apresentadas em conjunto com o desenvolvimento destes. As demais técnicas de caracterização utilizadas para todos os dispositivos serão apresentadas a seguir.

4.2.1. Caracterização dos Polímeros Condutores e Sensores

Os polímeros condutores e sensores foram caracterizados através de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX), microscopia de força atômica (AFM).

4.2.1.1. Espectroscopia no Infravermelho (FTIR)

Utilizada para caracterização estrutural dos sensores construídos com PPI e PEDOT-OH, onde podem ser obtidas informações referentes ao estado de oxidação dos polímeros condutores, a interação entre o agente dopante e a cadeia polimérica e a interação da GOx com a camada transdutora. As varreduras foram realizadas em espectrofotômetro FTIR Jasco 4100, com um acessório de refletância total atenuada (Specac modelo MKII Golden Gate Heated Single Reflection Diamond ATR). O espectro foi obtido após 32 varreduras a uma resolução de 4 cm^{-1} e intervalo entre $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ no modo transmitância.

4.2.1.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

As superfícies dos filmes aplicados sobre o eletrodo de trabalho foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Focussed Ion Beam Zeiss Neon 40, equipado com sistema espectroscópico de energia dispersiva de raio-X (EDX), operando a 5 kV.

4.2.1.3. Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens topográficas dos sensores foram realizadas com Molecular Imaging PicoSPM no equipamento NanoScope IV com temperatura controlada. As medidas de

AFM foram realizadas em várias partes dos sensores para garantir a reprodutibilidade da amostra. A rugosidade (r) foi determinada pelo cálculo da média de todos os valores registrados da topografia da imagem, excluindo os valores de máximo e mínimo, pelo software Nanoscope.

Os sensores produzidos com PPI não puderam ser analisados por AFM devido a elevada rugosidade superficial apresentada pela camada polimérica depositada sobre o eletrodo de trabalho. As partículas depositadas ficaram aglomeradas umas às outras depois de secas não formando um filme regular, o que impedia a movimentação da agulha sobre o sensor.

4.2.2. Caracterização Eletroquímica dos Sensores

Os ensaios eletroquímicos realizados com o intuito de obter informações referentes a estabilidade, eletroatividade e potencial de detecção dos biossensores foram realizados a temperatura ambiente em Potenciostato-Galvanostato Autolab PGSTAT 302N, com utilização do software NOVA 1.10 para os protótipos construídos com PPI/PEO. As medidas foram realizadas utilizando 60 μ L de eletrólito, composto por tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4. A ciclagem na voltametria teve como potencial inicial e final -0,7 V e potencial máximo de 0,5 V, pois Skotheim (1986), para eletrodos de platina recobertos com PPI testados em acetonitrila com Et_4NBF_4 ; Ferraz et al. (2012), em compósitos de PPI e celulose testados em solução 0,1 M de oxalato com fosfato pH 7,4; e Zhang et al. (2010), em eletrodos de ouro recobertos com o copolímero de PPI e poliácido de pirrol em solução de PBS, encontraram os valores do par redox de suas amostras neste intervalo. A velocidade de varredura foi de 50 mV/s.

Já para os sensores produzidos com PEDOT e PEDOT-OH os experimentos foram realizados em Potenciostato-Galvanostato Autolab PGSTAT 302N (Ecochimie, Holanda) equipado com módulo ECD para medir densidades de corrente muito baixas (100 μ A – 100 pA), e conectado a um computador controlado por software GPES. Foram utilizados os mesmos potenciais e velocidade de varredura das voltametrias cíclicas do PPI/PEO. Para o sensor de PEDOT-OH as medidas foram realizadas em célula eletroquímica de acrílico com 100 μ L de eletrólito, PBS 0,1 M com pH 7,4. O

eletrodo construído com PEDOT e tratado superficialmente foi ensaiado em uma célula eletroquímica de acrílico com 100 μL de solução de PBS 10 mM e pH 7,4 com contra eletrodo de carbono e eletrodo de referência de Ag/AgCl.

As medidas de cronoamperometria foram realizadas nos potenciais de polarização de -500, -600 e 100mV para o sensor PEDOT, PEDOT-OH e PPI/PEO respectivamente.

A solução de glicose foi preparada em PBS na concentração condizente a concentração do eletrólito utilizado nas medidas de cada polímero, e foi deixada mutarrotando durante 24 horas. As curvas foram obtidas com a adição de 4 μL de uma solução de glicose em PBS de concentração de 25 mM para o PEDOT e PEDOT-OH e 15 mM para o PPI.

Ácido úrico, ácido ascórbico e dopamina foram utilizados como agentes interferentes para a detecção de glicose por cronoamperometria. As soluções foram preparadas em PBS na mesma concentração da solução de glicose. As curvas cronoamperométricas foram obtidas com a adição de 4 μL da solução de cada interferente na concentração de 25 mM para o PEDOT e PEDOT-OH e 15 mM para o PPI, sob agitação, sendo adicionada uma espécie por vez em intervalos de tempo de 50 ou 100 s.

Estas adições de 4 μL de cada uma das soluções, na concentração de 25 mM, na célula eletroquímica com 100 μL ou 15 mM no sensor com 60 μL de eletrólito, representa a perturbação com uma alíquota na concentração de 1 mM.

4.2.3. Biossensor Enzimático produzido com Polipirrol e Poli(óxido de etileno)

4.2.1.1. Síntese do Polipirrol

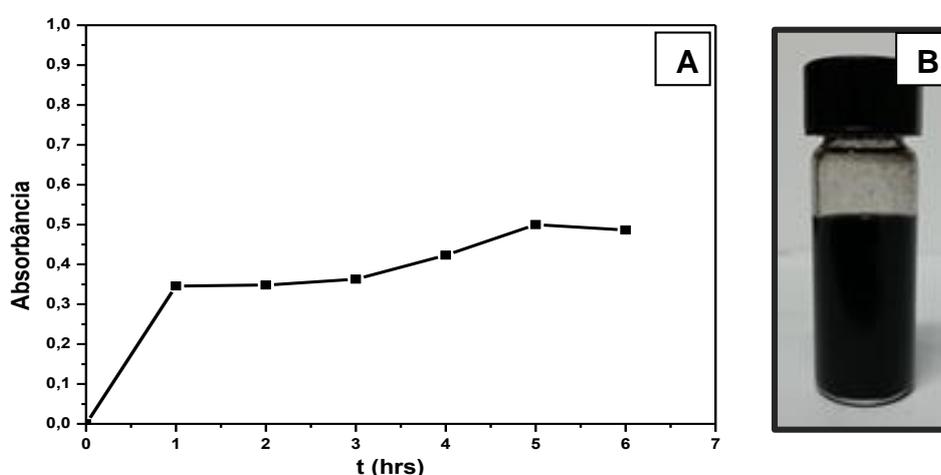
Para a obtenção de PPI por síntese química e com boas propriedades elétricas, biológicas e mecânicas para a sua aplicação sobre o sensor, foram observadas algumas características como a incorporação de um polímero convencional que favorecesse a obtenção de uma solução com o polímero dissolvido ou disperso em um meio compatível para a conservação da atividade da enzima GOx, o que facilita o método de aplicação e produção do biossensor. Além disso buscou-se uma síntese

que produzisse nanoestruturas favorecendo o aumento da área superficial da camada polimérica, aumentando a sensibilidade do sensor e diminuindo o tempo de resposta.

A síntese do polipirrol para utilização no biossensor foi realizada com as melhores condições de síntese relatadas na literatura, (ANSARI, 2006; MACHIDA; MIYATA; TECHAGUMPUGH, 1989; NALWA, 1997) adicionando PEO ao meio. A síntese foi realizada em reator encamisado a temperatura de 0°C com agitação mecânica constante. O PEO na concentração de 5 g/L foi previamente dissolvido em água e adicionado ao reator. Após foi adicionado 0,5 M de monômero de pirrol e 1,16 M de Fe(III), oriundo do agente oxidante FeCl₃. A razão molar de monômero de pirrol para agente oxidante foi de 1:2,33 conforme recomendado por Nalwa (1997).

O tempo de síntese foi determinado retirando uma alíquota da reação a cada hora para análise por Espectroscopia no UV-Vis, no comprimento de onda de 900 nm (Figura 14 (A)). As análises de espectroscopia do UV-Vis foram realizadas em equipamento T80 + UV-Vis Spectrometer da PG Instruments Ltd. em comprimento de onda de 900 nm. As amostras poliméricas foram dissolvidas 500 vezes em água deionizada. A síntese foi realizada até estabilização das leituras de absorvância em um valor máximo, indicando neste ponto o estado mais oxidado do polímero, ao começar a decair as leituras o polímero começou a perder em condutividade, sugerindo tempos elevados de síntese.

Figura 14 – (A) Determinação do tempo de síntese do PPI com PEO por Uv-Vis. (B) dispersão de PPI e PEO após diálise de 24 horas.



O PPI no seu estado dopado e condutor apresenta bandas no UV-Vis correspondentes as transições dos polarons e bipolarons. Os valores de absorbância com o passar das horas de síntese aumentaram chegando até um platô e começaram a diminuir novamente. A síntese ocorreu até as leituras de absorbância atingirem um pico e começarem a decair, indicando 6 horas de reação, conforme pode ser observado na Figura 14 (A).

O produto formado logo no início da síntese apresentou coloração negra e manteve a mesma até o final da síntese, com PPI disperso no meio de forma homogênea. O polímero foi tratado por diálise por 24 horas para retirada de oligômeros e excesso de reagentes e apresentou a concentração final de 1,62% em massa de PPI/PEO disperso. Na Figura 14 (B) pode ser observada a dispersão homogênea de PPI e PEO obtida após a síntese e diálise, a qual favorece a aplicação quando comparada com PPI's obtidos na forma de pó sem a adição de PEO ao meio.

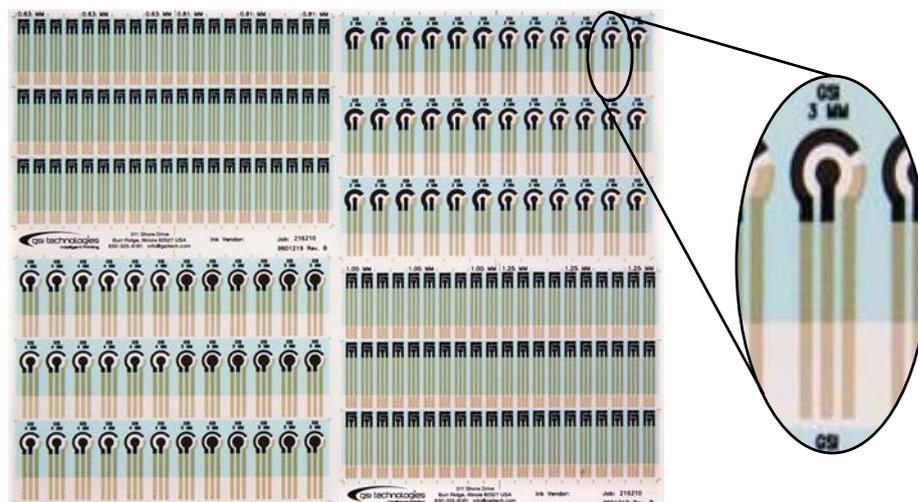
4.2.1.2. Tamanho de Partícula Sintetizada

Para determinação do tamanho da partícula sintetizada foi utilizado o equipamento Brookhaven NanoBrook 90 Plus Zeta da Brookhaven, que combina o dimensionamento de partícula e a análise de potencial zeta. Para a análise de dimensionamento de partícula dispersa o equipamento emprega a dinâmica de espalhamento de luz (DLS) e realiza a análise com o software Bic Particle Solutions. A amostra polimérica foi dissolvida 500 vezes em água deionizada para que a concentração ficasse na ordem de concentração aceitável pelo equipamento.

4.2.4. Construção do Biossensor com PPI/PEO

Após a síntese química do PPI com PEO foi construído o biossensor usando os eletrodos fornecidos pela empresa GSI Technologies, os quais apresentam o eletrodo de trabalho e contra eletrodo de carbono e o eletrodo de referência de Ag/AgCl, sobre uma base polimérica de poli (cloreto de vinila) (PVC), como pode ser visualizado na Figura 15, necessitando serem recortados para uso individual. Para este estudo foram utilizados os sensores com eletrodo de trabalho de 3 mm de diâmetro, como pode ser verificado no detalhe da Figura 15.

Figura 15 - Eletrodos impressos confeccionados pela empresa GSI Technologies, detalhe do eletrodo com eletrodo de trabalho com diâmetro de 3 mm.



Fonte: Sítio ativo da empresa GSI Technologies, (GSI TECHNOLOGIES, 2016).

A técnica de produção do biossensor de polipirrol consistiu na aplicação de uma camada de filme polimérico, obtido por síntese química, e de uma camada de enzima, uma alíquota de 1 μL de solução enzimática preparada com tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,4 e GOx. caracterizando a imobilização enzimática por adsorção.

4.2.5. Biossensor enzimático produzido com PEDOT

Para a construção do biossensor de PEDOT, em um primeiro momento foram testados sensores de carbono da empresa DropSens, porém o tratamento corona queimou os contatos elétricos. Decidiu-se então prosseguir a construção deste protótipo em eletrodos de carbono vítreo (GCE) de 2 mm de diâmetro a fim de verificar o seu funcionamento e melhora na sensibilidade dos sensores com PEDOT.

A síntese do PEDOT foi realizada em célula eletroquímica contendo solução de 10 mM de monômero EDOT em acetonitrila e 0,1 M de perclorato de lítio (LiClO_4). Os filmes de PEDOT foram obtidos por cronoamperometria sob um potencial constante de 1,4 V durante 6 segundos, como reportado por Fabregat (2014). O contra eletrodo utilizado foi de aço inoxidável AISI 316 com 1 cm^2 de área e eletrodo de referência de Ag/AgCl. A síntese eletroquímica foi realizada em Potenciostato-Galvanostato Autolab PGSTAT 302N (Ecochimie, Holanda) equipado com módulo ECD para medir

densidades de corrente muito baixas (100 μ A – 100 pA), e conectado a um computador controlado por software GPES.

Após a formação do filme polimérico o eletrodo sofreu o tratamento superficial corona através de equipamento Laboratory Corona Treater Model BD-20AC da Electro-Technic Products (ETP), de voltagem de saída ajustável de 10.000 a 45.000 Volts conforme a distância de aplicação do feixe e frequência de saída de 4,5 MHz. O potencial utilizado foi considerado de 45.000 V, devido a distância de aplicação do feixe, neste caso a distância utilizada foi de 3 a 5 mm. Valores menores de potencial significam distâncias de aplicação maiores do que 1 cm. Na Figura 16 podem ser verificados dois eletrodos de carbono vítreo, o eletrodo da direita está recoberto com o filme de PEDOT e apresenta uma coloração azulada escura, o eletrodo da esquerda foi recoberto com filme polimérico e submetido ao tratamento superficial com feixe corona e possui uma coloração acinzentada.

Figura 16 - Eletrodos de Carbono Vítreo, da esquerda recoberto com PEDOT e tratado com tratamento corona e da direita recoberto com filme de PEDOT.



Fonte: Foto de experimento realizado pela autora.

Finalizado o tratamento superficial do eletrodo de trabalho foi aplicada a camada enzimática por *casting*, ou seja, uma alíquota de 1 μ L de solução enzimática preparada com tampão fosfato salino 10 mM pH 7,4 e GOx. A técnica de produção do biossensor de PEDOT, polimerizado por síntese eletroquímica e com tratamento

superficial corona, consistiu na aplicação de uma camada de filme polimérico e de uma camada de enzima, caracterizando a imobilização enzimática por adsorção.

4.2.2.1. Espectroscopia RAMAN

Devido a pequena quantidade de PEDOT formado na superfície do eletrodo com o tempo de síntese de 6 s e o tratamento corona, os eletrodos não puderam ser analisados por espectroscopia no infravermelho (FTIR). Para obter a informação química e estrutural do material analisado permitindo sua identificação, os sensores foram analisados através de espectroscopia Raman.

Para obtenção dos espectros das amostras foi utilizada uma potência de ~0,5 mW, durante 100 s. O equipamento utilizado foi Labram - Jobin Yvon/Horiba, através de laser He-Ne 632,8 nm. Para cada amostra foram realizadas 4 acumulações, sendo para o sensor recoberto apenas com a camada polimérica de 100 a 3600 cm^{-1} e para os sensores recobertos com o polímero e tratados com tratamento corona e com a GOcx imobilizada de 50 a 3600 cm^{-1} .

4.2.6. Sensor produzido com PEDOT-OH

Para a construção do sensor com PEDOT-OH os eletrodos utilizados foram da empresa DropSens modelo DRP-C110 com eletrodo de trabalho de carbono com 4 mm de diâmetro. O contra eletrodo também é de carbono e o eletrodo de referência de Ag/AgCl. Os eletrodos estão depositados sobre um substrato cerâmico rígido e frágil. A Figura 17 apresenta o sensor utilizado para o estudo.

Figura 17 - Sensor marca DropSens, modelo DRP-C110 com três eletrodos.



Fonte: Site Ativo da empresa DropSens (DROPSSENS, 2016).

A síntese eletroquímica do PEDOT-OH foi realizada em célula eletroquímica de acrílico, contendo solução aquosa com 0,1 M de monômero de EDOT-OH e 0,1 M de LiClO₄. A síntese foi realizada por 10 segundos em um potencial de 0,8 V no mesmo equipamento utilizado para síntese do PEDOT. Após foi aplicada por *casting* a alíquota de 1 µL de solução enzimática com PBS 0,1 M pH 7,4 e GOx, imobilizando a enzima por adsorção.

. Ainda foi realizada imobilização da GOx durante a síntese eletroquímica do PEDOT-OH por *entrapment*. A GOx foi adicionada ao meio de síntese na concentração de 2000 U/mL. Este método de produção de sensores caracteriza-se por ser o mais pesquisado e difundido, onde o sensor é produzido e uma única etapa, pela imobilização da enzima na rede polimérica durante a síntese. Por outro lado, este método pode favorecer um desperdício de enzima tendo em vista a necessidade de aumentar sua quantidade no meio para garantir uma quantidade satisfatória imobilizada no sensor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

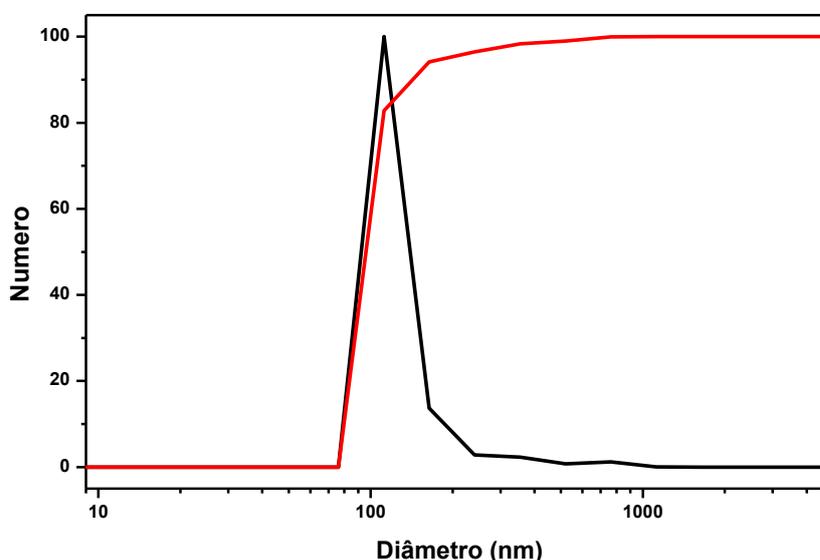
Os resultados estão divididos em subcapítulos para cada sensor, apresentando a trajetória de construção de cada um, suas características morfológicas, propriedades dos polímeros sintetizados e dos sensores estudados. Na sequência foram analisadas as propriedades eletroquímicas dos biossensores e a detecção de glicose com a construção da equação característica, permitindo determinar o limite de detecção, a seletividade e o intervalo de detecção de glicose.

5.1. Biossensor Enzimático desenvolvido com Polipirrol e Poli(óxido de Etileno)

5.1.1. Tamanho de Partícula

O PPI/PEO formado logo no início da síntese apresentou coloração negra e manteve a mesma até o final da síntese, com PPI disperso no meio de forma homogênea, a qual favorece a aplicação. A análise do tamanho de partícula da dispersão de PPI/PEO pode ser verificada na Figura 18.

Figura 18 - Determinação do tamanho de partícula da amostra PPI/PEO.



A análise do tamanho de partícula (Figura 18) mostra uma distribuição homogênea. A maior incidência de partículas apresenta o diâmetro de 179,3 nm, representado pelo pico saliente de base estreita. O índice de polidispersão da amostra apresentou um valor de 0,268, indicando que uma pequena quantidade da amostra desviou do tamanho apresentado pela maioria das partículas, pois quanto menor o índice de polidispersão mais uniforme a suspensão.

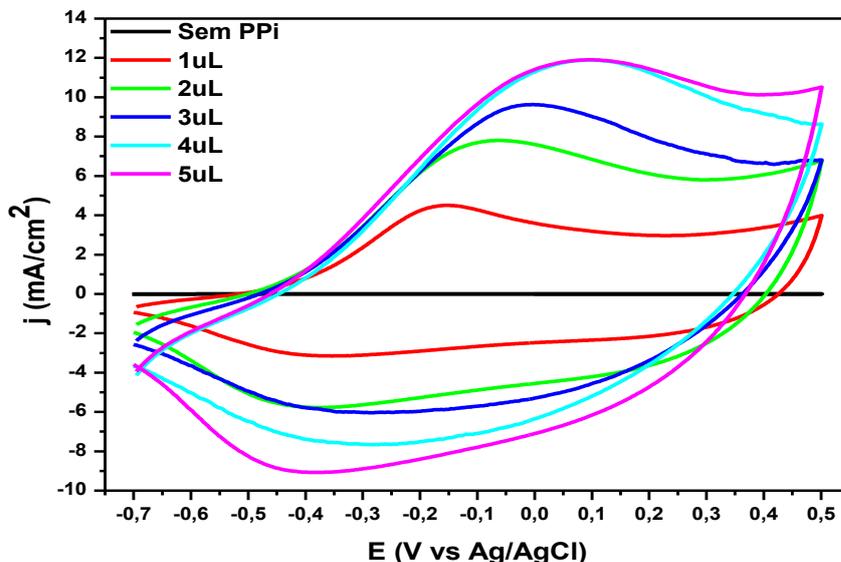
A curva vermelha representa que 95% das partículas produzidas apresentam um diâmetro de até 200 nm, e as demais partículas, com diâmetro superior a 200 nm, são representadas pela presença de um desnível na base da dispersão. A presença destas partículas fez com que o tamanho médio determinado seja 327,13 nm.

5.1.2. Construção do Biossensor com PPI/PEO

Após a síntese química do PPI com PEO foi construído o biossensor usando os eletrodos fornecidos pela empresa GSI Technologies. Para a construção do biossensor foram adicionadas quantidades de PPI/PEO e GOx distintas e foi analisada a eletroatividade do sistema através de voltametria cíclica. A quantidade de solução de PPI/PEO (1,62% em massa) depositada por *casting* sobre o sensor variou de 1 a 5 μL (16 a 80 μg). O polímero foi depositado e os sensores foram armazenados em geladeira à temperatura de 1 à 4°C por 6 horas, garantindo a secagem da camada sobre o eletrodo. As amostras foram produzidas em triplicata e o meio de análise foi PBS 0,1 M. Na Figura 19 são apresentadas as voltametrias cíclicas obtidas para os sensores com diferentes quantidades de PPI/PEO.

Os sensores com 4 e 5 μL apresentaram eletroatividade similar para o pico anódico do PPI/PEO, situado em aproximadamente 0,1 V. Como o polímero apresenta maior condutividade na sua forma mais oxidada, decidiu-se utilizar a quantidade de 4 μL de PPI/PEO sobre o eletrodo de trabalho. Maiores quantidades de PPI/PEO não apresentam aumento da intensidade do sinal elétrico para a mesma área de trabalho, e conseqüentemente não trarão ganho para o transporte de carga elétrica da reação enzimática até a superfície do eletrodo indicando um desperdício da solução polimérica.

Figura 19 - Voltametria cíclica para determinação da quantidade de PPI/PEO no eletrodo de trabalho, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



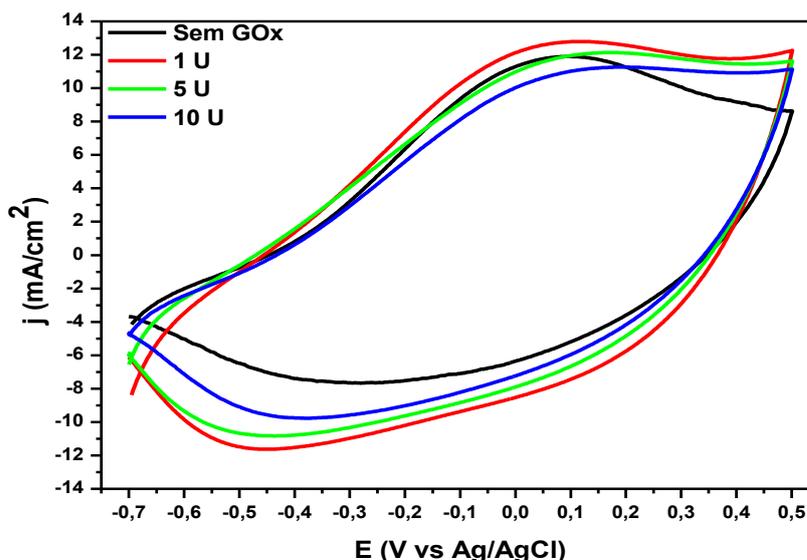
Ainda é possível observar que o eletrodo puro, sem polímero, não apresenta eletroatividade considerável quando comparada com os eletrodos recobertos com PPI/PEO.

Definida a quantidade de PPI/PEO, pode-se realizar a mesma análise para a concentração de GOx a ser imobilizada, onde 1 μL da solução enzimática preparada com tampão fosfato salino 0,1 M pH 7,4 e 1, 5 ou 10 $\text{U}/\mu\text{L}$ de GOx foi aplicada por *casting*. Os sensores seguiram novamente para geladeira durante a noite. Como a enzima não possui propriedades condutoras, concentrações muito elevadas podem prejudicar a resposta eletroquímica do biossensor, atuando como isolante. O estudo foi realizado em triplicata em solução de PBS 0,1 M, e um acréscimo na densidade de corrente representa que a enzima não influencia negativamente na resposta do biossensor. Pode ser visualizado na Figura 20 as voltametrias cíclicas realizadas para o eletrodo com diferentes concentrações de GOx imobilizada.

O biossensor com 1 U/sensor de GOx apresentou incremento de densidade de corrente, não influenciando negativamente a resposta eletroquímica do biossensor. Os sensores com 5 e 10 U/sensor representam uma perda de resposta eletroquímica no pico anódico, indicando excesso de enzima e gasto de reagente desnecessário quando comparado ao sensor com 1 U/sensor e o sensor sem GOx. O pico catódico para os voltamogramas dos sensores com GOx imobilizada apresentou intensidade

superior quando comparado ao pico catódico do sensor sem GOx, indicando que a enzima pode estar se oxidando e contribuindo para o aumento da densidade de corrente.

Figura 20 - Voltametria cíclica para determinação da concentração de GOx a ser aplicada sobre camada formada após a secagem dos 4 µL de PPI/PEO, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



Neste momento os sensores produzidos apenas com o PPI e PEO passaram a ser chamados de PPI/PEO e o biossensor produzido com PPI, PEO e GOx foi chamado de PPI/PEO/GOx, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e quantidades de reagentes utilizados.

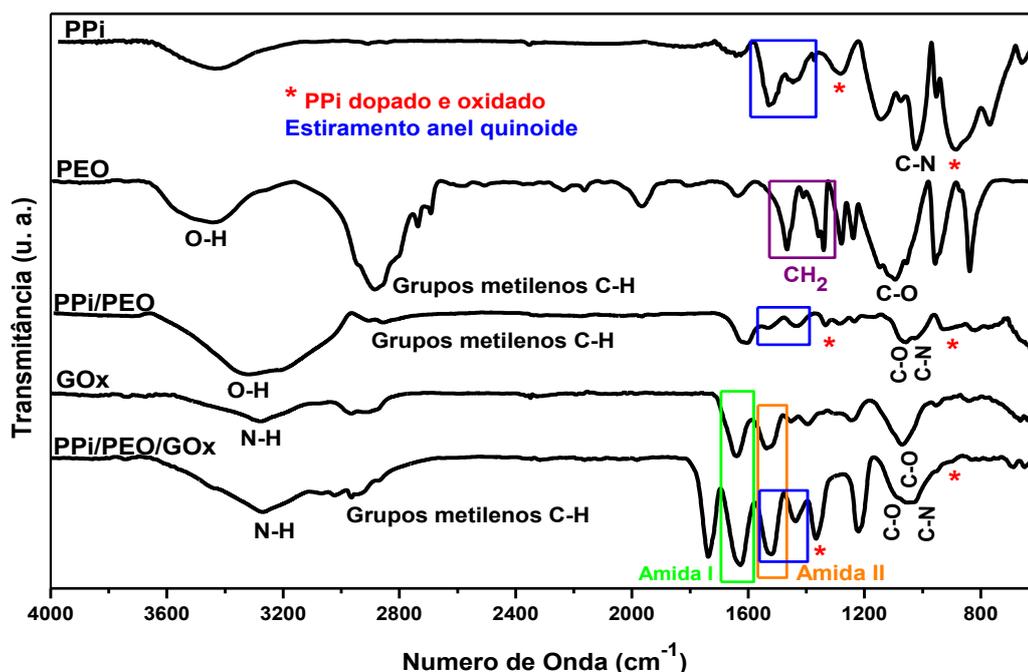
Amostras	Quantidade de Polímero Condutor	Quantidade de GOx	Nomenclatura
Sensor com polímero condutor	4 µL	---	PPI/PEO
Sensor completo	4 µL	1 U/sensor	PPI/PEO/GOx

5.1.3. Caracterização do Biossensor de PPI/PEO

5.1.3.1. Espectroscopia FTIR

A espectroscopia FTIR foi realizada para confirmar a formação do PPI e a imobilização da GOx no biossensor. Os espectros de FTIR-ATR dos polímeros individuais (PPI e PEO) e da GOx foram comparados com os dos sensores PPI/PEO e PPI/PEO/GOx (Figura 21).

Figura 21 - Espectros de FTIR do PPI e PEO e do PPI/PEO sintetizado aplicado sobre o eletrodo de trabalho, após espectro FTIR da enzima GOx e do sensor completo com a camada enzimática sobre a camada polimérica.



A formação do PPI pode ser observada nos espectros apresentados na Figura 21. Os principais picos de formação do PPI são observados em torno de 1520 cm^{-1} e 1441 cm^{-1} atribuídas às vibrações de estiramento do anel quinoide da cadeia principal do pirrol; em 1285 cm^{-1} e 885 cm^{-1} podem ser verificadas as bandas referentes às vibrações de estiramento correspondentes ao polipirrol dopado e oxidado e em 1024 cm^{-1} aparece uma banda devido ao estiramento das ligações C – N. (AL-MASHAT et al., 2008; YANG; LIU, 2010)

A presença do PEO pode ser observada pelos picos em 1091 cm^{-1} referente a ligação do C – O e 3427 cm^{-1} relativa a presença de ligações O – H, ainda pode ser visualizada a banda C – H dos grupos metílenos em 2852 cm^{-1} . (KUNTEPPA et al., 2011) A presença da GOx pode ser percebida pelas bandas em 1527 cm^{-1} , relacionada ao estiramento das ligações C – N da amida II, e em 1640 cm^{-1} , relativa ao estiramento das ligações C = O da amida I. (BAGHAYERI, 2015; WISITSORAAT et al., 2013)

O sensor recoberto com PPI/PEO apresenta no espectro da Figura 21 as bandas características do PPI dopado e oxidado em 1336 e 918 cm^{-1} respectivamente, bem como as bandas de estiramento do anel quinoide da cadeia principal do pirrol em 1534 e 1429 cm^{-1} . O pico de estiramento das ligações C – N do PPI também está presente em 1018 cm^{-1} além dos picos referentes ao PEO, em 1070 cm^{-1} devido a ligação C – O e 3328 cm^{-1} da presença de ligações O – H associadas. A banda das ligações O – H para o sensor recoberto com PPI/PEO está deslocada quando comparada a banda da ligação O – H do PEO puro, sugerindo que o PEO está fazendo ligações de interação com a cadeia de PPI sintetizado, e favorecendo a dissolução e estabilização do polímero condutor em água.

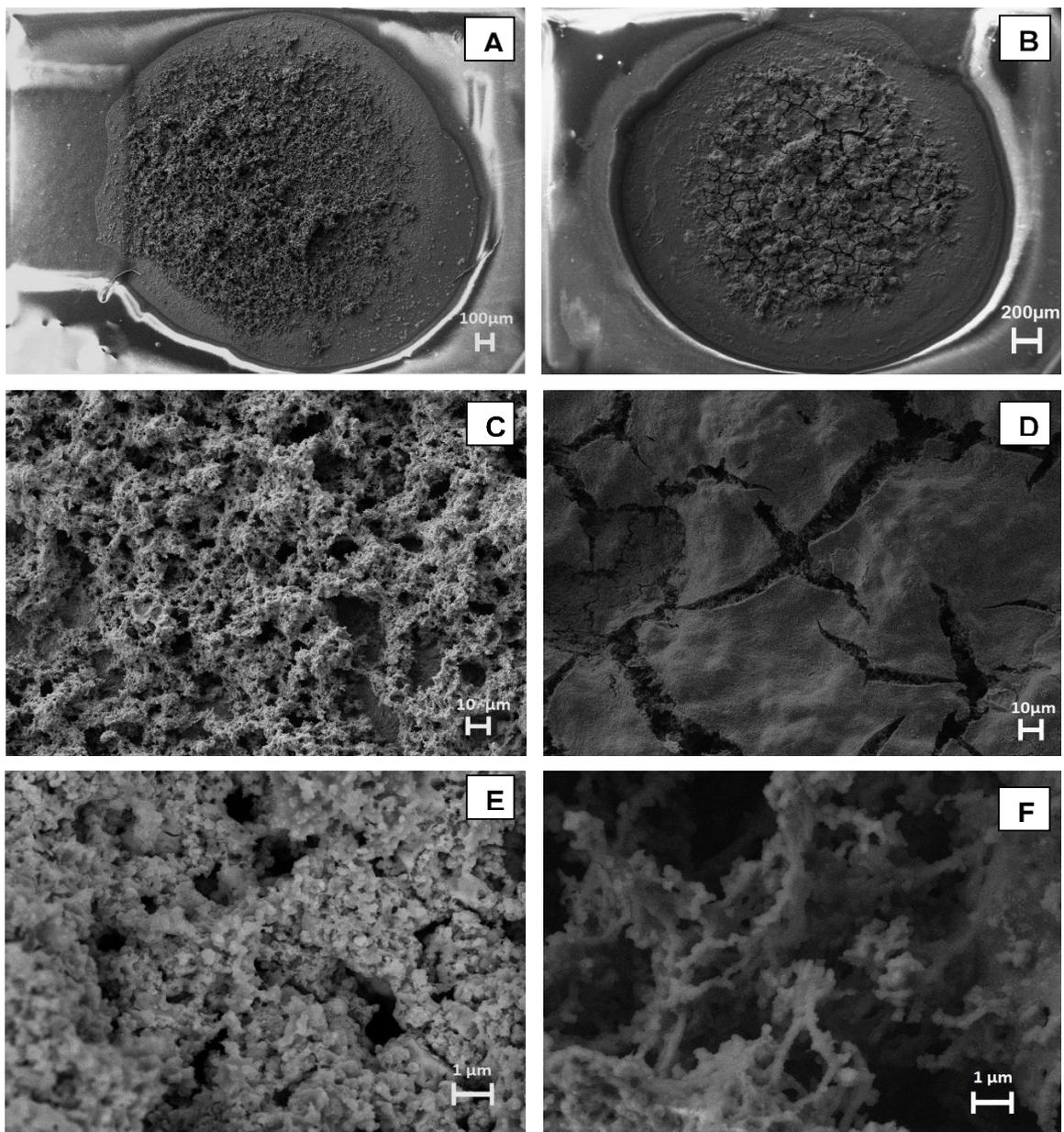
O biossensor PPI/PEO/GOx apresenta no seu espectro, além dos picos característicos do PPI e do PEO, os picos característicos da enzima GOx, em 1627 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações C = O da amida I e em 1520 cm^{-1} devido ao estiramento das ligações C – N da amida II, indicando que a enzima está imobilizada na estrutura polimérica. Ainda pode ser observada uma banda em 1740 cm^{-1} sugerindo a presença de ésteres na estrutura dos sensores, indicando que estes podem ser se formado devido a presença dos grupo –OH do PEO com ácidos carboxílicos oriundos dos aminoácidos presentes na GOx.

5.1.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio – X

Na Figura 22 são mostradas as micrografias dos sensores PPI/PEO e PPI/PEO/GOx. A Figura 22 (A) permite observar como ocorreu o recobrimento do eletrodo de trabalho através da aplicação da camada polimérica por *casting*. O

polímero condutor ficou agregado e concentrado no centro do eletrodo estando as extremidades recobertas com uma fina camada e sem a presença de aglomerados, indicando que pequenas áreas do eletrodo de trabalho podem não estar recobertas pelo polímero condutor.

Figura 22 – Micrografias obtidas por MEV da superfície dos sensores recobertos com PPI/PEO em (A), (C) e (E); e com PPI/PEO/GOx em (B), (D) e (F).



Já na Figura 22 (B) é possível observar o recobrimento do eletrodo de trabalho com PPI/PEO e solução enzimática. A solução de PBS com a enzima GOx formou

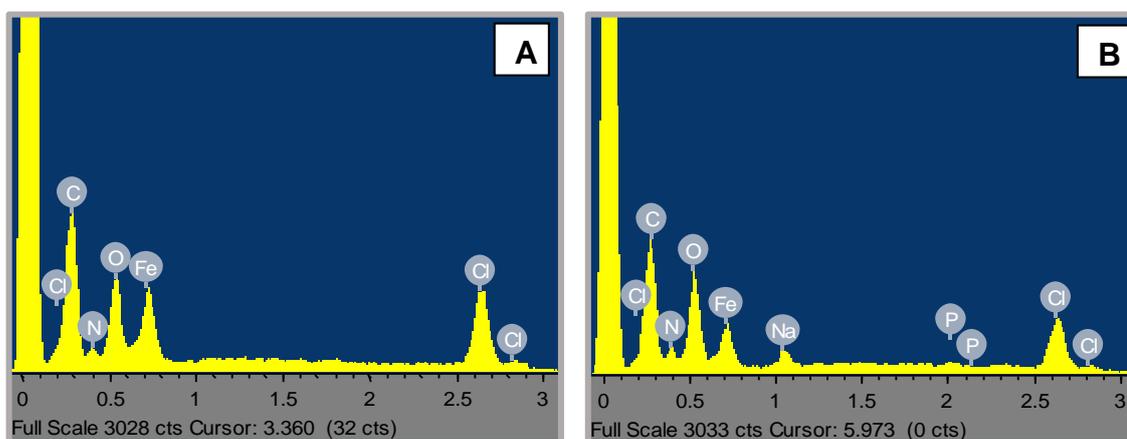
uma camada sobre a estrutura polimérica. Esta apresenta rachaduras em sua estrutura, e a sua formação pode indicar que não ocorre uma penetração da enzima na camada polimérica, ficando apenas adsorvida na superfície externa do PPI/PEO.

As características descritas podem ser confirmadas com maior clareza nas Figura 22 (C) e (D). O polímero condutor (Figura 22 (C)) apresenta partículas homogêneas em toda sua estrutura produzindo uma superfície com morfologia granular que se assemelha a obtida para o polipirrol preparado utilizando condições experimentais semelhantes, como relatado por Li e Jing (2009) na utilização do PEO no meio de síntese. A presença de poros é observada na camada de PPI/PEO, o que seria ideal para a penetração da solução enzimática e imobilização da GOx. Esta penetração não ocorre por completo produzindo sobre a estrutura polimérica uma camada enzimática com rachaduras, nas quais é possível verificar os grânulos de PPI/PEO (Figura 22 (D)).

O PPI/PEO sintetizado apresenta um tamanho de partícula de aproximadamente 100 a 200 nm, estando uma partícula aderida a outra formando uma espécie de fibra (Figura 22 (E)). As rachaduras da camada enzimática podem ter sido geradas por espaços onde as partículas poliméricas não estavam aglomeradas de forma muito intensa permitindo a penetração da solução entre a estrutura (Figura 22 (F)).

Na Figura 23 são apresentados os espectros de Energia Dispersiva por Raios – X (EDX) para o sensor PPI/PEO e PPI/PEO/GOx.

Figura 23 - Espectro EDX das amostras representando as etapas de produção do biossensor, (A) PPI/PEO e (B) PPI/PEO/GOx.



Os espectros mostram a presença de nitrogênio, pertencente ao anel do pirrol e ainda para o sensor recoberto com GOx este pode estar relacionado a enzima. Átomos de ferro são verificados, indicando que a purificação por diálise não foi eficiente para a remoção de excesso do agente oxidante permanecendo na amostra polimérica. Este excesso não permitiu calcular o grau de dopagem do PPI usando a relação Cl / N, obtido pela % átomos informados na Tabela 4.

Para a amostra PPI/PEO/GOx (Figura 23) foi identificado a presença de átomos dos elementos presentes no PBS, mas são quantidades insignificantes (Tabela 4), que não caracterizam um problema durante a detecção de glicose. Pode-se visualizar na Tabela 4 as quantidades de cada elemento em cada amostra.

Tabela 4 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PPI/PEO e PPI/PEO/GOx obtidas por EDX.

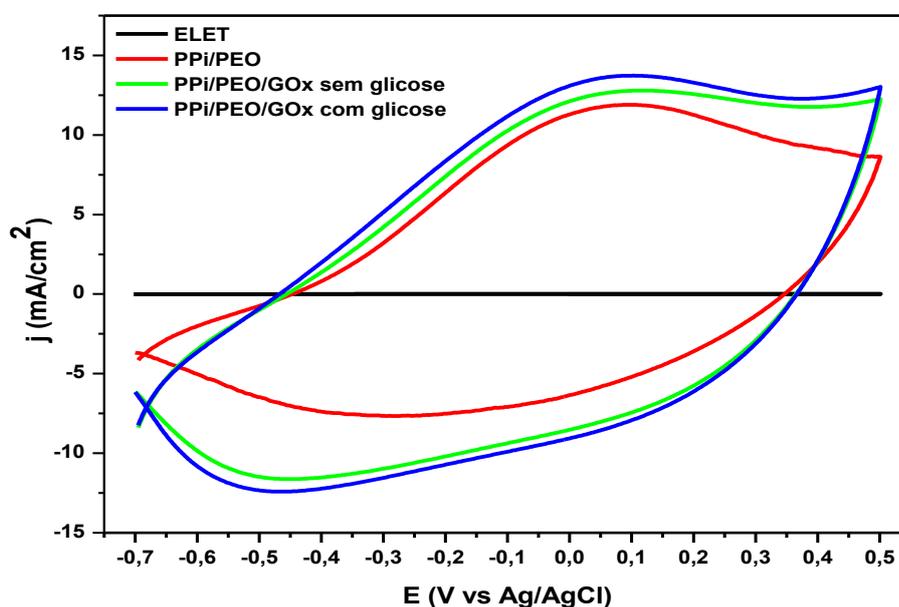
Amostra	PPI/PEO		PPI/PEO/GOx	
	Peso %	Átomos %	Peso %	Átomos %
Carbono (C)	38,49	45,21	28,43	41,50
Oxigênio (O)	15,32	13,51	16,47	18,05
Nitrogênio (N)	6,03	6,07	7,02	8,78
Cloro (Cl)	61,18	24,34	40,66	20,10
Ferro (Fe)	43,02	10,87	28,44	8,93
Sódio (Na)	---	---	2,16	1,65
Fósforo (P)	---	---	1,75	0,99
Total	164,05	100	124,92	100

5.1.4. Caracterização Eletroquímica do Biossensor de PPI/PEO

5.1.4.1. Voltametria Cíclica

A Figura 24 mostra o ensaio de voltametria cíclica dos biossensores PPI/PEO e PPI/PEO/GOx.

Figura 24 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do biossensor e com a presença de 3 mM de glicose no meio. As ciclagens foram realizadas em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



O eletrodo GSI sem recobrimento polimérico e enzimático não apresenta eletroatividade. Ao aplicar a camada de PPI/PEO o voltamograma mostra um par redox com o pico anódico à 100 mV, e o pico catódico à -300 mV. Os biossensores PPI/PEO/GOx, em PBS 0,1M com e sem adição de glicose 3 mM ao meio apresentaram comportamento semelhante. Ambos apresentam um pequeno aumento na densidade de corrente para o pico anódico quando comparados ao sensor PPI/PEO.

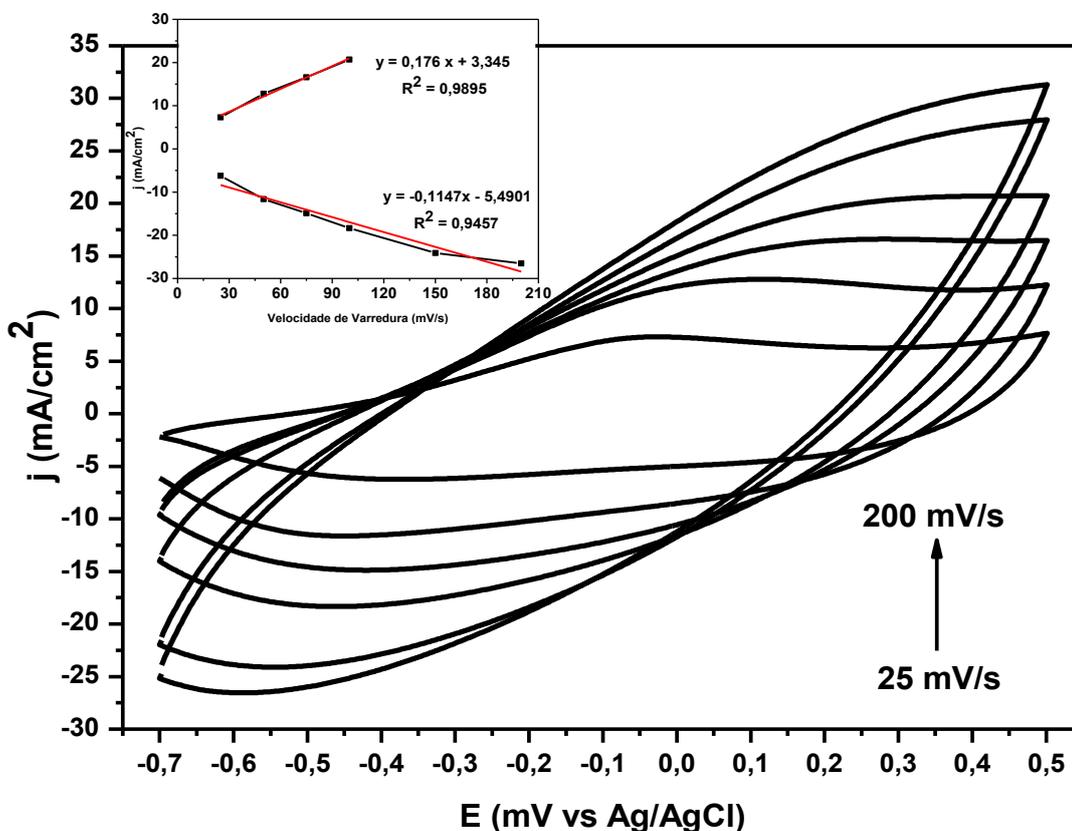
Não foi possível verificar o par redox do cofator FAD da GOx entre os potenciais de -500 a -400 mV, como observado por Tang; Li e Zeng (2015) e Yang et al. (2011), indicando que não ocorre uma transferência de elétrons direta entre a enzima e a superfície do eletrodo. Porém é possível observar um deslocamento e aumento do

pico catódico dos biossensores com GOx imobilizada na presença ou ausência de glicose, indicando que a enzima pode estar se oxidando e contribuindo para o aumento da densidade de corrente.

O incremento de densidade de corrente para o biossensor com a camada de GOx na presença de glicose ao meio, indica que a camada polimérica pode estar atuando como um mediador do sistema. Com a oxidação da glicose pelo cofator FAD da enzima, se reduzindo para FADH₂, o polímero condutor reduz com a reoxidação do cofator FADH₂ da enzima para FAD, e em seguida reoxida pelo potencial aplicado no eletrodo, provocando um aumento de densidade de corrente no pico anódico e catódico do biossensor na presença da glicose.

A eletroatividade do biossensor PPI/PEO/GOx foi testada em diferentes velocidades de varredura, de 25 a 200 mV/s (Figura 25).

Figura 25 - Voltametria cíclica para a amostra PPI/PEO/GOx em PBS 0,1M em velocidades de varredura de 25 a 200 mV/s, e no detalhe relação entre as densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos nas diferentes velocidades de varredura, e linha de tendência com equação característica.

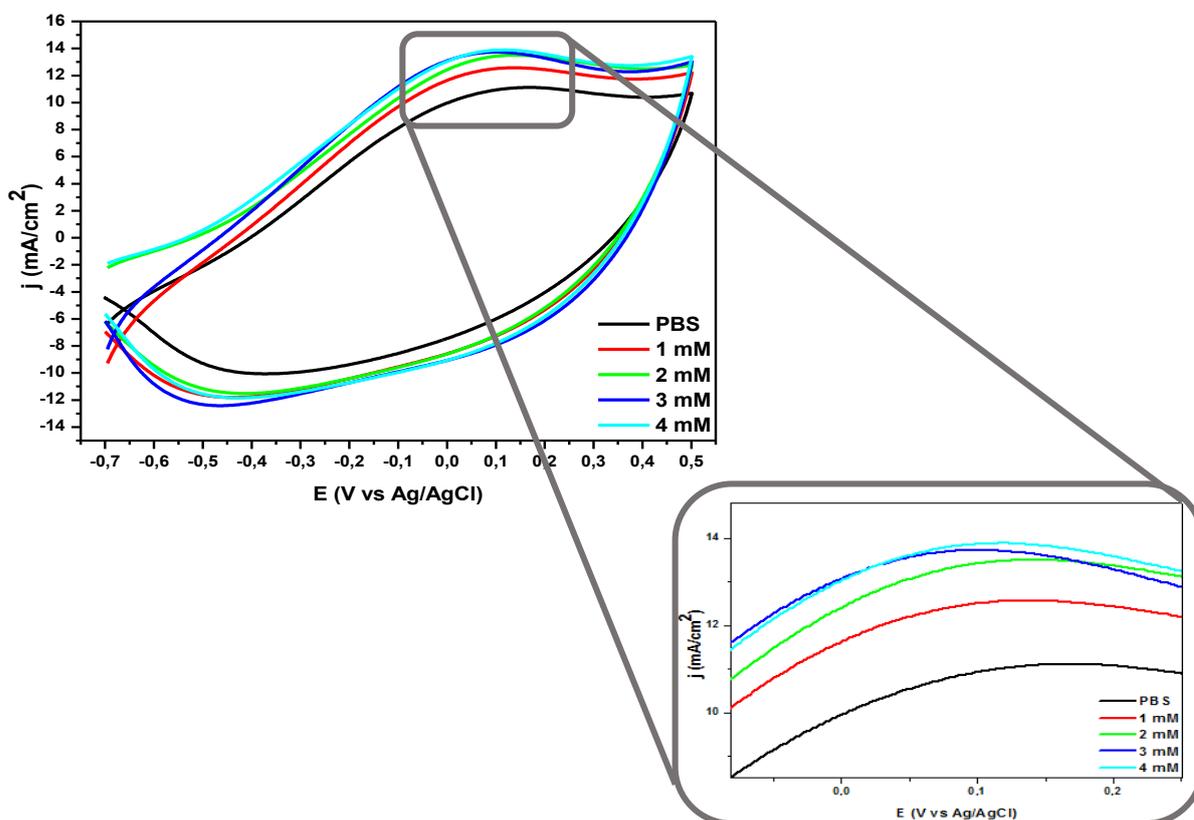


A Figura 25 mostra os voltamogramas obtidos e a relação entre as densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos nas diferentes velocidades de varredura. Esta relação é linear, gerando uma equação de reta para o pico anódico e uma para o catódico, indicando que os valores j são influenciados pelo transporte de massa por difusão.

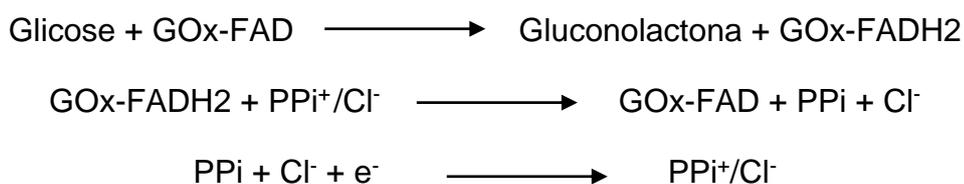
Conforme a velocidade aumenta, acima de 100 mV/s, os picos anódicos não são mais visualizados, o que pode indicar uma lenta difusão das espécies em solução no interior do filme. As transformações das espécies que compõem a estrutura do biossensor, interface da solução e GOx / GOx e polímero / polímero e interface do eletrodo podem estar apresentando um processo lento de difusão de íons. Estes processos não são detectados quando a velocidade de varredura é elevada, como observado por Lu et al. (2012) e Radhakrishnan et al. (2013).

Voltametrias cíclicas com diferentes concentrações de glicose, de 1 a 3 mM, no meio foram realizadas (Figura 26).

Figura 26 - Voltametria cíclica para detecção de diferentes concentrações de glicose, de 1 a 3 mM, pelo biossensor PPI/PEO/GOx em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s. No detalhe os picos anódicos dos sensores em cada concentração.



Ocorre um incremento na densidade de corrente dos picos com a oxidação do biossensor, como pode ser verificado no detalhe da Figura 26. Este aumento da densidade de corrente pode ser atribuído ao aumento da concentração de FADH₂ gerada a partir da oxidação da glicose para gluconolactona pela FAD, que se reoxida novamente com a redução do PPI/PEO, o qual é reoxidado pelo potencial aplicado, gerando um pico anódico de maior intensidade, como pode ser observado nas equações descritas:



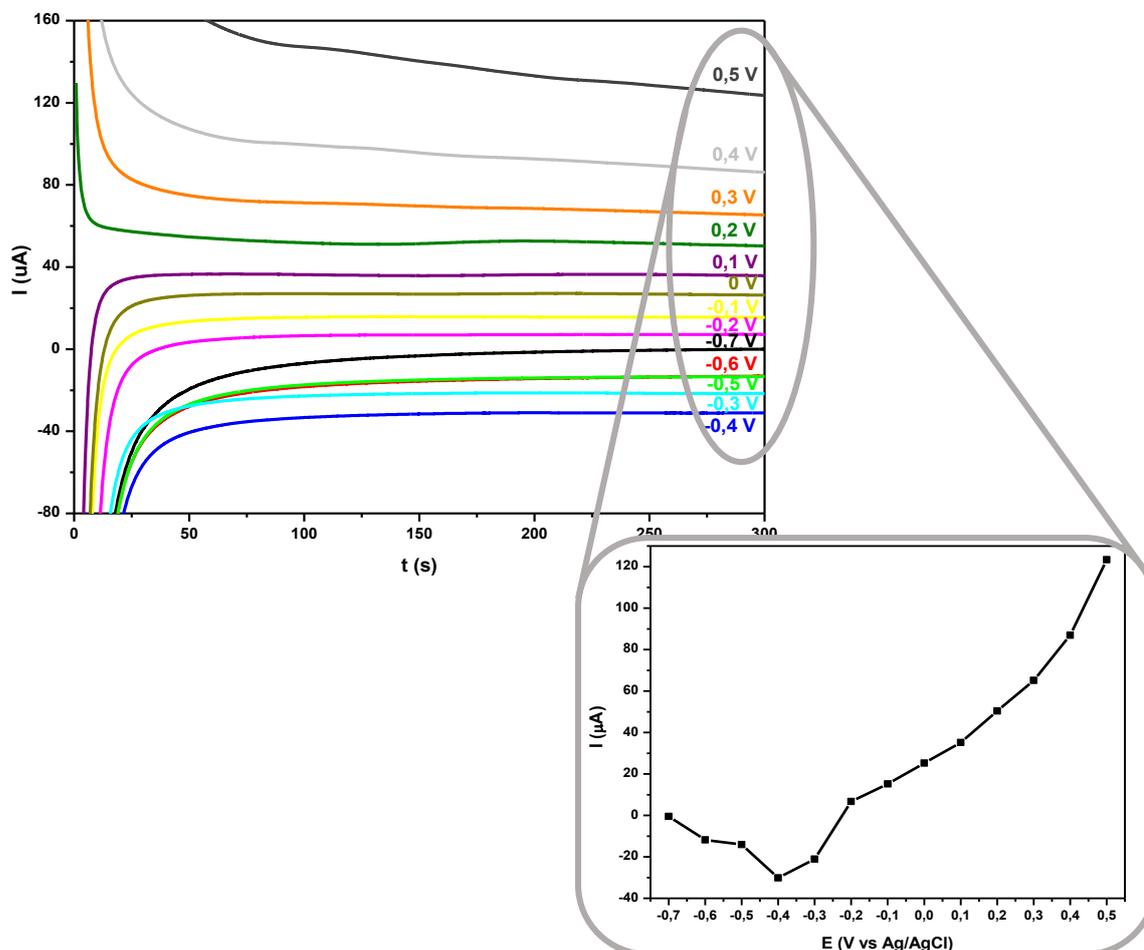
Os picos catódicos do biossensor não seguem um padrão de incremento nem de redução da densidade de corrente com o aumento da concentração de glicose, indicando que o polímero não atua apenas no transporte dos elétrons da reação até a base do sensor. Wisitsoraat et al. (2013) observou que a voltametria cíclica permite a detecção de glicose, porém as medidas através de método cronoamperométrico oferecem valores com maior sensibilidade.

5.1.4.2. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose

O potencial de detecção de glicose representa um dos fatores chaves para o bom funcionamento do biossensor, pois ele afeta propriedades como sensibilidade e seletividade do sinal de corrente produzido pelo analito. O potencial de detecção está diretamente relacionado aos potenciais de oxidação e redução determinados pela voltametria cíclica, variando um pouco do pico máximo devido à natureza estática da polarização aplicada. (WISITSORAAT et al., 2013)

Para determinação do potencial de detecção de glicose por cronoamperometria variou-se o potencial de polarização de -0,7 até 0,5 V, (Figura 27) utilizando um sensor novo para cada potencial testado, em solução de glicose 1 mM em PBS 0,1 M, a fim de verificar uma mudança no comportamento da corrente de estabilização.

Figura 27 – Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para o sensor PPI/PEO/GOx em solução de glicose 1 mM em PBS 0,1 M. Detalhe indica a corrente de estabilização para cada potencial verificado em 300 s.

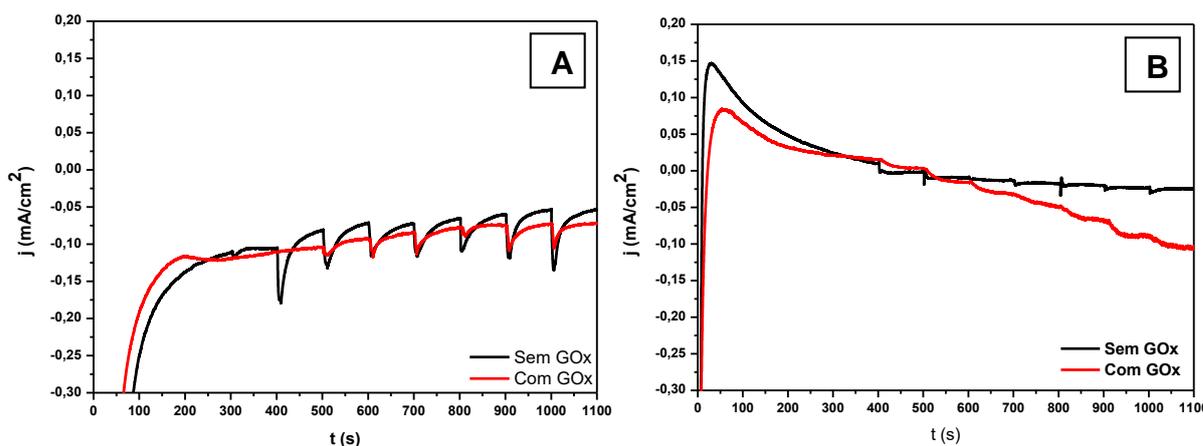


Ao aplicar potenciais negativos, de -700 até -400 mV a corrente em estado estacionário sofre uma redução com a redução do potencial. Continuando a diminuir o potencial no sentido negativo, de -300 até -100 mV, a corrente em estado estacionário sofre um aumento. Seguindo o aumento do potencial no sentido positivo, a corrente em estado estacionário continua a aumentar, conforme alterava o potencial para um valor maior, ocorria um aumento na corrente de estabilização (Figura 27 (Detalhe)).

O potencial de -400 mV apresentou um comportamento diferente dos demais, sendo referenciado na literatura (BAGHAYERI, 2015; SHAN et al., 2010) como próximo dos potenciais de oxirredução da enzima GOx. Este valor está localizado próximo do potencial de redução do PPI/PEO indicando que pode ser o potencial de detecção de glicose para o biossensor PPI/PEO/GOx. Estudos relatam a utilização de

potenciais de redução para a detecção da glicose devido a uma menor incidência de reações de oxidação de espécies interferentes. (MIAO et al., 2015; WISITSORAAT et al., 2013) Definido o potencial de polarização, -0,4 V, foram preparados sensores com e sem GOx para comparação da resposta (Figura 28).

Figura 28 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PPI/PEO (sem GOx) e PPI/PEO/GOx (com GOx) em (A) -400 mV e (B) 100 mV, em PBS 0,1 M e adições de glicose 1 mM a cada 100s.



As cronoamperometrias realizadas em potencial de -400 mV são mostradas na Figura 28 (A), onde as perturbações realizadas no sistema pela adição de glicose a cada 100 s, após estabilização da densidade de corrente por 400 s, não causam perturbações significativas tanto para o sensor PPI/PEO, sem GOx, quanto para o biossensor PPI/PEO/GOx. Este resultado mostra que o potencial não é o adequado para a detecção de glicose, pois a enzima pode estar oxidando a glicose, mas o polímero por estar no seu estado reduzido não transporta os elétrons da reação enzimática até a base do sensor. A voltametria cíclica apresentada na Figura 26 indicou que o sensor não foi capaz de diferenciar concentrações de glicose em potenciais próximos ao pico catódico do polímero condutor.

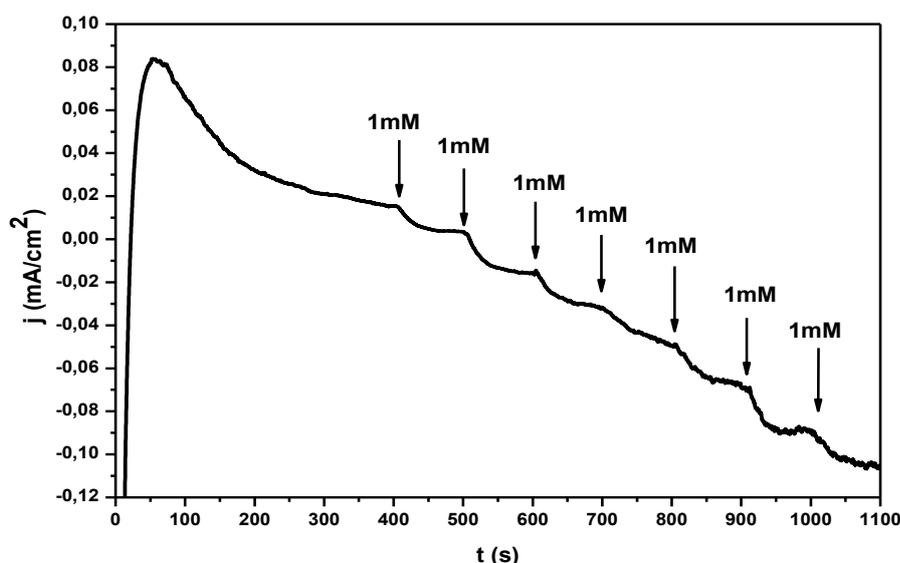
Novas detecções de glicose foram realizadas no potencial de oxidação do PPI/PEO, de 100 mV, apontado pela voltametria cíclica (Figura 26). A Figura 28 (B) mostra as perturbações realizadas para sensores com e sem GOx, após 400 s para estabilização do sistema. O sensor PPI/PEO, sem GOx, após cada adição de glicose 1 mM não apresenta um incremento na densidade de corrente, permanecendo praticamente estável quando comparado aos incrementos de corrente que ocorreram

após cada adição de glicose 1 mM no sensor PPI/PEO/GOx. O potencial de detecção de glicose para o biossensor PPI/PEO/GOx foi definido em 100 mV, indicando que o polímero condutor está atuando como mediador do sistema, e que o potencial de detecção encontra-se próximo do potencial de oxidação do polímero condutor.

5.1.4.3. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica do Biossensor de PPI/PEO

A Figura 29 mostra a detecção de glicose por cronoamperometria, através de perturbações degrau a cada 100 s para o sensor PPI/PEO/GOx.

Figura 29 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 100 s em potencial de 100 mV.

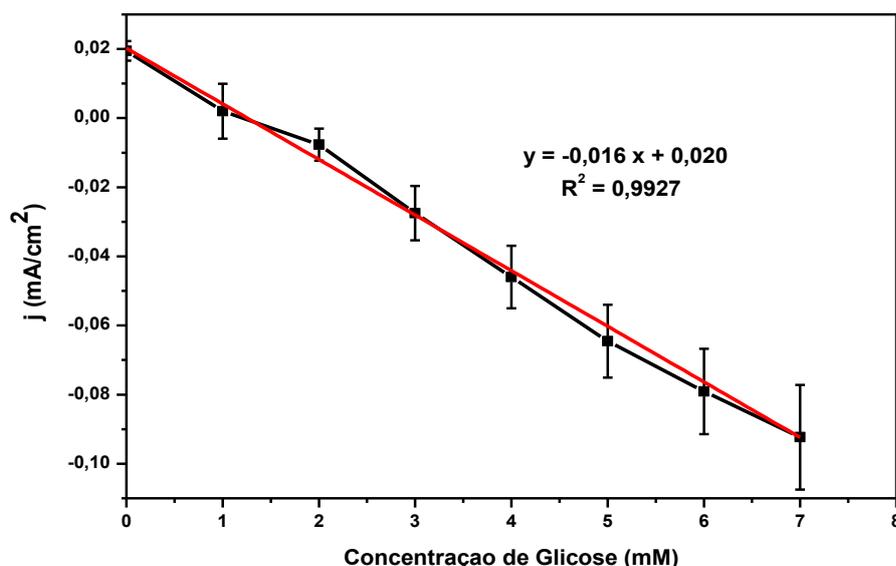


A amostra PPI/PEO/GOx apresenta perturbações degrau seguindo um padrão de acréscimo de densidade de corrente. O biossensor, construído nesta configuração: PPI/PEO/GOx, sendo PPI/PEO e GOx aplicados por *casting* camada sobre camada, é capaz de detectar os elétrons produzidos pela reação de oxidação da glicose catalisada pela GOx e mediada pelo PPI/PEO em cada perturbação do sistema (Figura 29).

A partir dos resultados das perturbações realizadas na análise de cronoamperometria, pode ser definida a curva característica do biossensor de

PPI/PEO/GOx e a equação da reta. A Figura 30 apresenta a relação da densidade de corrente de pico versus concentração de glicose aplicada nas tiras de teste rápido obtida para dez medidas diferentes para cada concentração, 10 biossensores diferentes.

Figura 30 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.



A relação linear entre a densidade de corrente e a concentração de glicose foi estabelecida no intervalo de concentrações de 1 a 7 mM ($R^2 = 0,9927$), permitindo determinar o valor de sensibilidade de $0,016 \text{ mA/mM.cm}^2$ a partir do declive no intervalo linear. Quando a concentração é superior a 7 mM, o sensor começa a apresentar ruídos e as medidas apresentam um desvio-padrão muito levado, não sendo possível confiar nos valores obtidos. O limite de detecção, o qual foi calculado com base na relação sinal-ruído de 3, é de 0,53 mM, e a constante de Michaelis-Menten, K_m , que determina a afinidade biológica apresentada pela camada de GOx na dissociação do substrato em produto foi de 5,23 mM. Este valor de K_m está de acordo com resultados apresentados na literatura para sensores de glicose, (DE JESUS et al., 2013; FENG et al., 2015) porém não indica uma afinidade elevada entre a enzima imobilizada no PPI/PEO e o substrato.

Pela equação da reta pode ser determinado um valor de concentração de glicose a partir da medida de densidade de corrente, caracterizando o PPI/PEO como mediador da reação de oxidação da glicose em gluconolactona pela GOx e indicando o funcionamento de um biossensor amperométrico de segunda geração. Assim, pode ser definida para a tira de teste rápido com PPI/PEO/GOx a equação característica do biossensor, equação (3):

$$j = -0,016 C + 0,020 \quad (3)$$

Rearranjando a equação em função da variável desconhecida, ou seja, em função da concentração de glicose, resulta a equação (4):

$$C = - \left(\frac{j - 0,02}{0,016} \right) \quad (4)$$

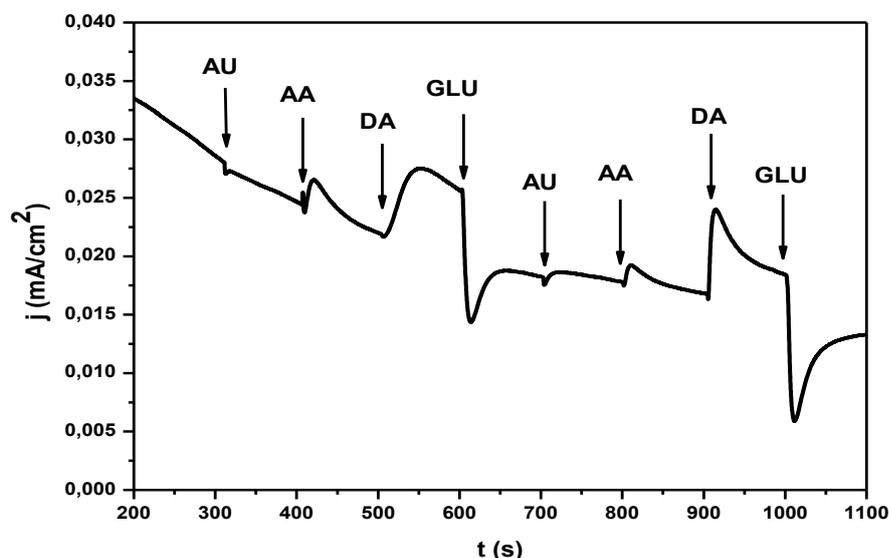
Onde: C= concentração de glicose a ser medida em mM; j= densidade de corrente elétrica produzida na detecção da glicose pela enzima em mA/cm².

Como os níveis de glicose no sangue para uma pessoa saudável variam de 70 a 120 mg/dL (4 a 8 mM), este sensor pode ser utilizado para medidas sanguíneas de níveis de glicose em pessoas saudáveis, ou que não apresentam diabetes, o que é um limitante.

5.1.4.4. Detecção de Interferentes

A especificidade do sensor frente a adição de interferentes, ou seja, de substâncias que estão presentes no fluido corporal, foi verificada para dopamina (DA), ácido úrico (AU) e ácido ascórbico (AA) (Figura 31). Após a adição de 1 mM de cada interferente foi realizada a adição de glicose testando se o sensor continua detectando a mesma.

Figura 31 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de 100 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s.



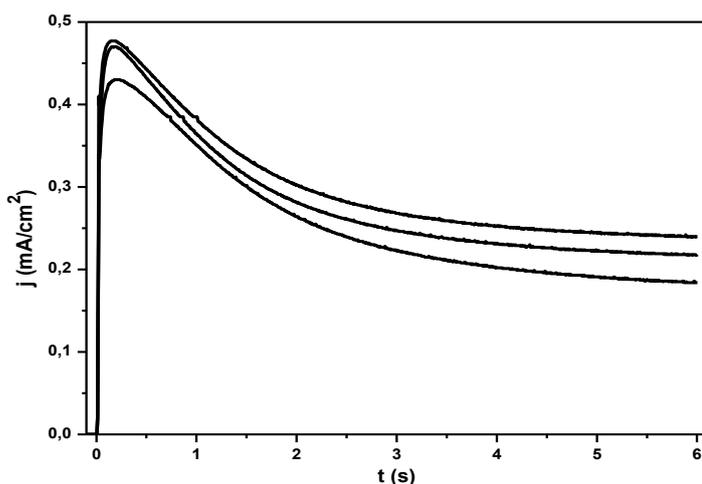
A curva mostra que a densidade de corrente do sistema, apesar de 300 s para estabilização, não era constante. Após as adições de AU e AA esta continuou diminuindo. Com a adição da dopamina a densidade de corrente aumentou voltando a diminuir após a adição de glicose. Ao adicionar novamente os interferentes somente a adição de DA provocou uma variação significativa da densidade de corrente com novo aumento, e após significativa queda na j ao ser adicionada GLU. O potencial de oxidação da dopamina ocorre aproximadamente em 150 mV, (BELAIDI et al., 2015; FABREGAT et al., 2014) muito próximo do potencial que está sendo aplicado no biossensor PPI/PEO/GOx, desta forma como as concentrações de dopamina no sangue são muito baixas, de 1 a 200 μ M como determinadas por Choe; Ahmed e Jeon (2016), estas podem não influenciar de forma negativa para a detecção de glicose, porém podem comprometer o resultado.

5.2. Biossensor Enzimático desenvolvido com PEDOT e Tratamento Corona

5.2.1. Construção do Biossensor de PEDOT e Tratamento Corona

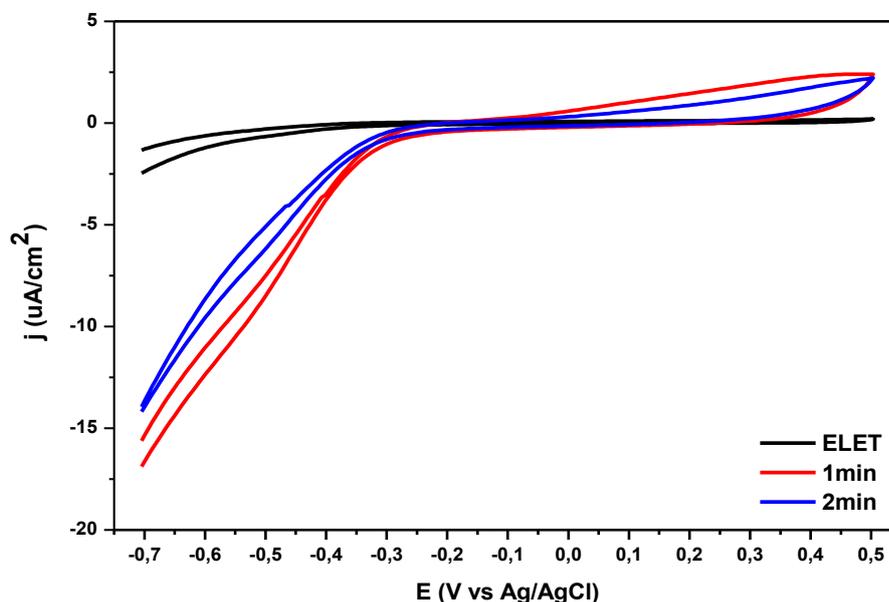
Os filmes de PEDOT foram obtidos por cronoamperometria em célula eletroquímica contendo solução de 10 mM de monômero EDOT em acetonitrila e 0,1 M de perclorato de lítio (LiClO_4), sob um potencial constante de 1,4 V durante 6 segundos, como reportado por Fabregat (2014). Na Figura 32 é apresentada a eletropolimerização em três eletrodos distintos.

Figura 32 - Eletropolimerização do EDOT no eletrodo de carbono vítreo em potencial constante de 1,4 V durante 6 s, em solução de acetonitrila contendo 10 mM de monômero EDOT e 0,1 M de LiClO_4 .



O eletrodo recoberto com PEDOT recebeu tratamento corona na superfície e foi realizada uma voltametria cíclica para verificar a eletroatividade do sistema. Na Figura 33 é possível verificar os voltamogramas para o eletrodo sem recobrimento (ELET) e para eletrodos recobertos com PEDOT com tempos de tratamento corona diferentes. Como o PEDOT sem tratamento corona não será utilizado para detecção de glicose, sua eletroatividade não foi verificada e confrontada com a eletroatividade dos sensores tratados. As demais análises de morfologia, estrutura e superfície serão apresentadas para o PEDOT com o objetivo de comparar o efeito do tratamento corona sobre o polímero condutor e as alterações que o mesmo foi capaz de produzir.

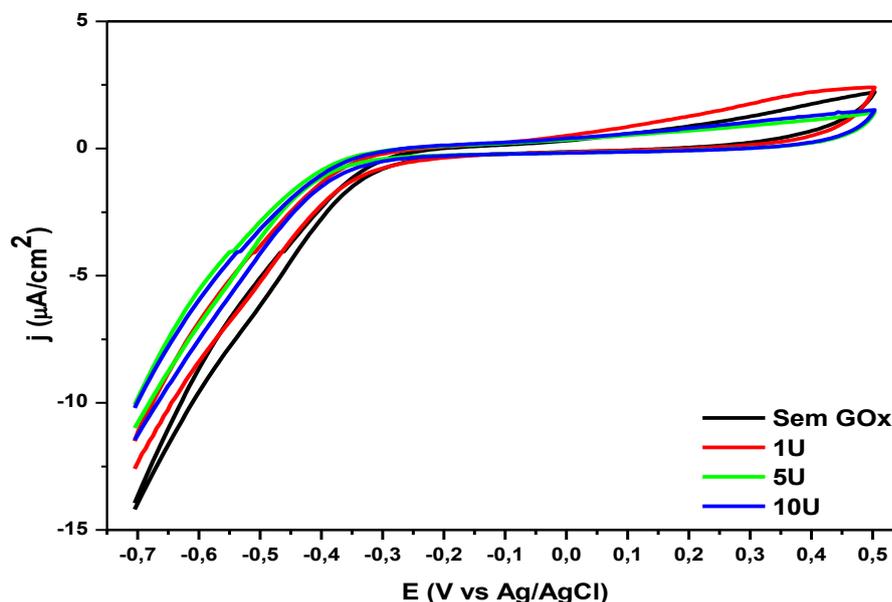
Figura 33 – Voltametria cíclica para determinação do tempo de tratamento corona sobre a superfície do eletrodo polimerizado com PEDOT, em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



Não foi possível verificar os potenciais de oxidação e de redução do PEDOT com tratamento corona, mas a eletroatividade é semelhante a obtida pelo PEDOT sem tratamento corona sintetizado por Fabregat et al. (2014) e Nien; Tung e Ho (2006) em condições de síntese similares. O voltamograma do eletrodo tratado durante 2 min apresentou eletroatividade superior ao eletrodo tratado durante 1 min no intervalo de potenciais onde ocorre a oxirredução da enzima GOx, de -0,4 a -0,6 V. Assim, foi adotado o tratamento corona por 2 min na superfície do eletrodo.

Para definir a concentração de GOx aplicada por *casting* sobre o eletrodo de trabalho recoberto com PEDOT com tratamento corona, foram realizadas voltametrias cíclicas nas concentrações de 1, 5 ou 10 U/ μ L. Os sensores seguiram para geladeira durante a noite garantindo a secagem desta camada. Para definir a concentração de GOx aplicada foram realizadas voltametrias cíclicas com as diferentes concentrações de GOx imobilizada (Figura 34).

Figura 34 – Voltametria cíclica para determinação da quantidade de GOx imobilizada no eletrodo de trabalho recoberto com PEDOT submetido ao tratamento corona, em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



Como a eletroatividade do sistema foi baixa, não foi possível visualizar os potenciais de oxidação e de redução da GOx no intervalo de potenciais de -0,4 a -0,6 V, indicando que o filme de PEDOT submetido ao tratamento corona não foi eficiente no transporte de elétrons da reação redox do cofator FAD da enzima. O biossensor com 1 U de enzima imobilizada apresentou um incremento na eletroatividade do voltamograma quando comparado ao sensor sem GOx. Os eletrodos com 5 ou 10 U de enzima apresentaram uma eletroatividade inferior que o eletrodo com 1 U/sensor. Desta forma decidiu-se imobilizar 1 U/sensor de GOx.

Definidas as condições para construção do biossensor, os sensores foram nomeados da seguinte forma: sensores produzidos apenas com PEDOT passaram a ser chamados de PEDOT; sensores com PEDOT eletropolimerizado e submetido ao tratamento corona foram nomeados como PEDOT/TC e os biossensores produzidos com PEDOT, com tratamento corona e imobilizada GOx foram chamados de PEDOT/TC/GOx, conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e condições de construção.

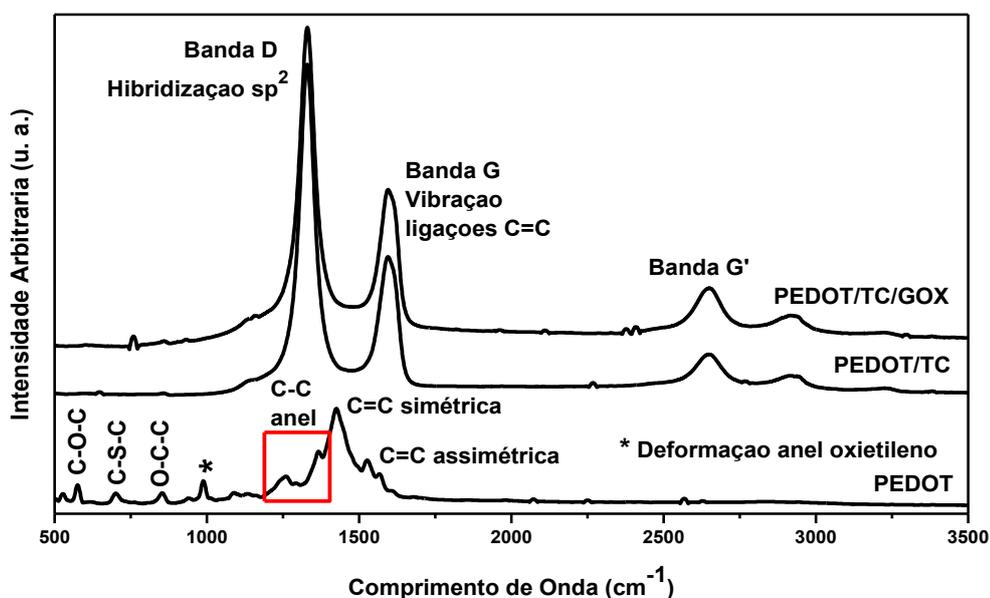
Amostras	Condições de síntese PIC	Tratamento Corona	Quantidade de GOx	Nomenclatura
Sensor com polímero condutor	1,4 V por 6 s	---	---	PEDOT
Sensor tratado	1,4 V por 6 s	2 min	---	PEDOT/TC
Sensor completo	1,4 V por 6 s	2 min	1 U/sensor	PEDOT/TC/GOx

5.2.2. Caracterização do Biossensor de PEDOT/TC

5.2.2.1. Espectroscopia RAMAN

O espectro RAMAN do PEDOT foi comparado com os espectros do PEDOT com tratamento corona e recoberto com GOx como pode ser visualizado na Figura 35.

Figura 35 - Espectroscopia RAMAN das amostras PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx, representando todas as etapas de produção do biossensor.



A formação do PEDOT pode ser observada no espectro pelos picos em 1532 e 1458 cm^{-1} devido ao estiramento assimétrico e simétrico das ligações C = C, em 1372 e 1269 cm^{-1} relativo ao estiramento das ligações C – C do anel e do interior do anel respectivamente, em 992 cm^{-1} atribuída a deformação do anel oxietileno e em 846, 711 e 576 cm^{-1} referentes as deformações das ligações O – C – C, C – S e C – O – C respectivamente. (BAZZAOUI et al., 1994; FARAH et al., 2012; GARREAU et al., 1999)

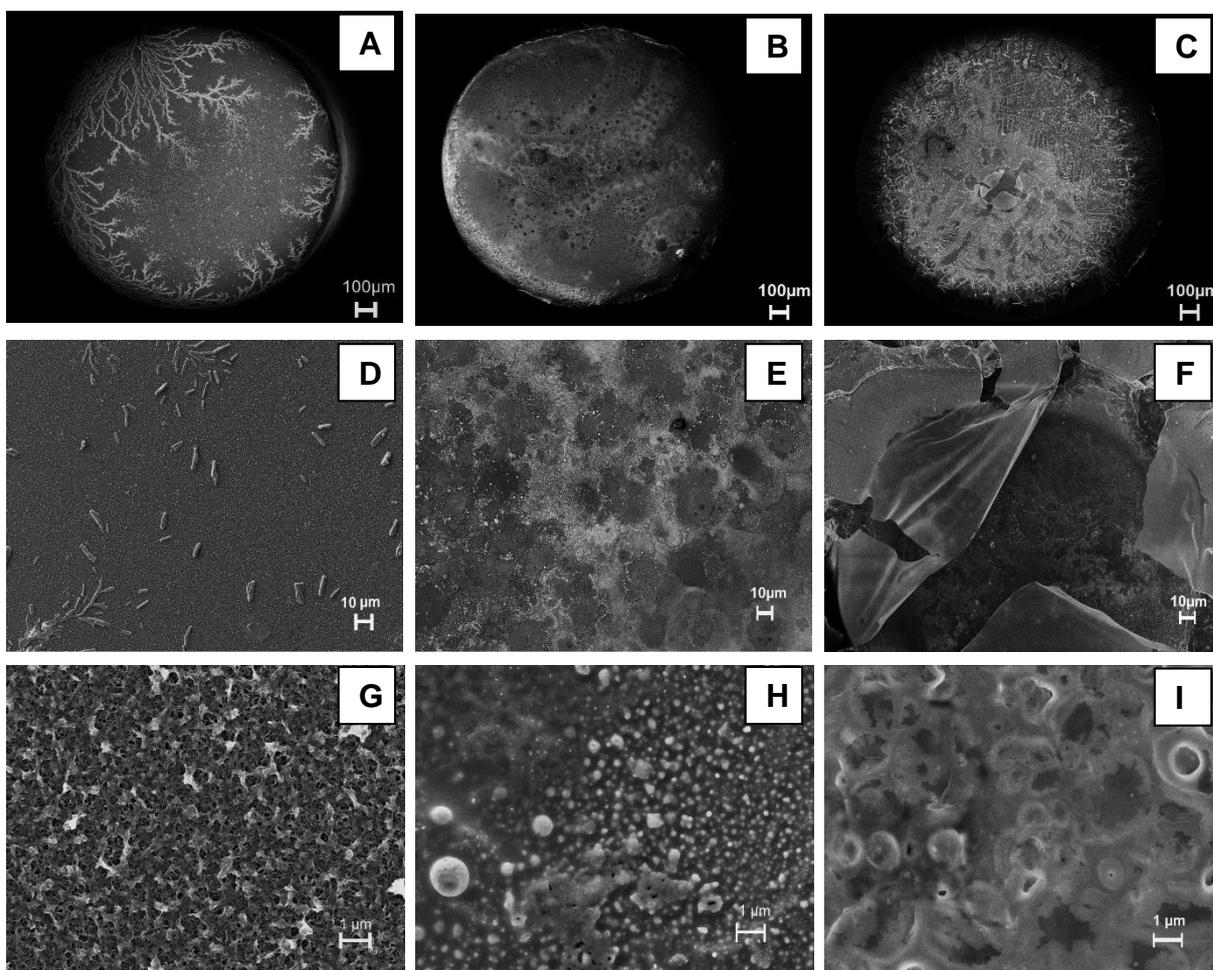
Ao aplicar o tratamento corona sobre os eletrodos recobertos com PEDOT, o filme sofreu uma completa mudança na sua estrutura química, as bandas observadas no sensor tratado com tratamento corona e no biossensor com a enzima GOx adsorvida na sua superfície após o tratamento corona, foram bandas nos mesmos comprimentos de onda que as apresentadas pelo grafite. As bandas do grafite se apresentam nos comprimentos de onda de aproximadamente 1350 cm^{-1} para a banda D, que representa a banda de desordem nas ligações de hibridização sp^2 ou banda do diamante, que representa as ligações C – C do tipo sp^3 , sendo que nos sensores PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx esta apareceu em 1335 e 1342 cm^{-1} respectivamente; em 1600 cm^{-1} devido a banda G, que representa as ligações tipo sp^2 para grafite monocristalino, indicando os modos vibracionais presentes nas ligações C = C; nos sensores PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx esta banda foi visualizada em 1603 e 1633 cm^{-1} respectivamente. A banda em 2670 cm^{-1} que representa o pico característico do grafite designado por G', que indica o espalhamento de segunda ordem da banda D foi verificado nos biossensores em 2670 cm^{-1} . (CHEN; YAN; BANGAL, 2010; FERRARI; ROBERTSON, 2004; PIMENTA et al., 2007; ROBERTSON, 2002; SRIDHAR; JEON; OH, 2010; TAMULEVIČIENĖ et al., 2009)

Acredita-se que o tratamento corona carbonizou o filme de PEDOT, provocando sua degradação e formando uma estrutura molecular que pode ser similar a estrutura do grafite, rica em carbono e que pode apresentar um comportamento que facilite o transporte de elétrons da reação de catalise da glicose pela GOx, através de um caráter condutor. A aplicação do tratamento corona por tempos menores pode não carbonizar o filme polimérico tratando apenas a superfície e mantendo a estrutura do polímero condutor.

5.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio – X

A Figura 36 apresenta as microscopias dos sensores PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx. A morfologia característica do PEDOT pode ser visualizada sobre toda a superfície do eletrodo, apesar do curto período de síntese (Figura 36 (A)). Ocorreu a precipitação de sais oriundos do LiClO_4 na camada polimérica indicando que o eletrodo deve ser lavado após a síntese para a remoção dos mesmos.

Figura 36 - Micrografias obtidas por MEV da superfície dos sensores recobertos com PEDOT em (A), (D) e (G); PEDOT com tratamento corona em (B), (E) e (H); e PEDOT/TC/GOx em (C), (F) e (I).



Com maior aumento (Figura 36 (D)) pode ser verificado que o recobrimento do eletrodo é homogêneo apresentando morfologia semelhante sobre toda a superfície.

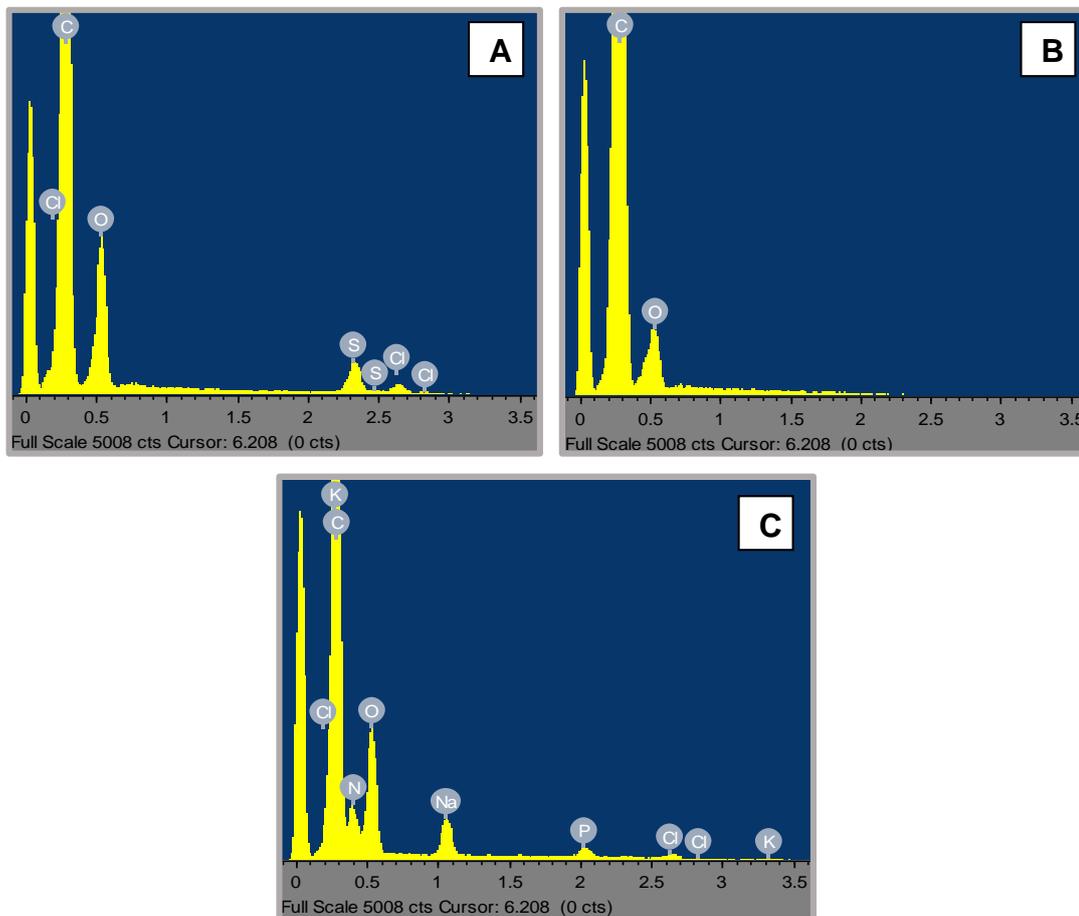
A Figura 36 (G) mostra as características da estrutura morfológica do PEDOT com maior clareza, indicando uma estrutura complexa e porosa conforme verificado também por BELAIDI et al. (2015).

O PEDOT depositado sobre o eletrodo após tratamento corona sofreu uma mudança considerável em sua morfologia (Figura 36 (B)), apresentando uma estrutura com aglomerados e pontos de diferentes tamanhos sem poros. A superfície da camada de PEDOT com tratamento corona não é homogênea, existem áreas com coloração mais escura e outras com coloração cinza mais clara (Figura 36 (E)). Com maior aumento (Figura 36 (H)) é possível verificar que as áreas cinza clara possuem um grande número de pontos de diferentes tamanhos, e as áreas mais escuras apresentam apenas a estrutura mais rugosa no formato de sulcos, podendo indicar a aplicação do feixe do tratamento corona de forma mais ativa.

A amostra PEDOT/TC/GOx (Figura 36 (C)) apresenta na superfície uma camada formada pela solução enzimática seca sobre a camada de PEDOT com tratamento corona. A enzima imobilizada por adsorção não penetrou no recobrimento de PEDOT com tratamento corona. Esta dificuldade pode estar ligada a ausência de poros, e pode favorecer a remoção da enzima pela solução de glicose durante o processo de detecção. A Figura 36 (F) permite observar que em alguns sulcos, não ocorre a formação da camada enzimática ou esta apresenta rachaduras, permitindo a visualização da camada de PEDOT tratada. Por outro lado, a Figura 36 (I) mostra os pontos de diferentes tamanhos formadas pelo tratamento corona recobertas pela camada enzimática, o que pode ser favorável para o aumento da superfície de contato durante a detecção de glicose, mas não garante que as enzimas não serão removidas.

As análises de espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios – X (EDX) obtidas para as amostras de PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx podem ser observadas na Figura 37.

Figura 37 – Espectro EDX das amostras representando as etapas de produção do biossensor, (A) PEDOT, (B) PEDOT/TC e (C) PEDOT/TC/GOx.



A amostra PEDOT indica a presença de enxofre, característico da estrutura do anel do PEDOT. O grau de dopagem do polímero pode ser estimado pela % de átomos relatado pela espectroscopia EDX (Tabela 6) usando a relação Cl / S, a qual é de aproximadamente 0,41, o que pode indicar pequena eletroatividade do polímero sintetizado quando comparado com o PEDOT obtido por Ocampo et al. (2006), onde a relação foi de 0,54.

A amostra de PEDOT/TC (Figura 37 (B)), mostra que o polímero após sofrer tratamento corona, foi degradado apresentando apenas carbono e oxigênio na sua estrutura, e a ausência de enxofre. Como observado na análise de espectroscopia Raman, o tratamento corona produz degradação intensa do material produzindo uma estrutura rica em carbono, semelhante à do grafite.

A amostra com enzima imobilizada, amostra PEDOT/TC/GOx (Figura 37 (C)), mostrou a presença dos elementos presentes no PBS. A quantidade de potássio, fósforo e sódio pode indicar que a solução enzimática ficou depositada sobre a camada polimérica degradada, não ocorrendo a penetração pela ausência de poros. Foi possível ainda verificar nitrogênio, elemento que caracteriza a presença da enzima na superfície do eletrodo, mostrando que a mesma se encontra imobilizada na superfície do sensor. Pode-se visualizar na Tabela 6 as quantidades de cada elemento em cada amostra.

Tabela 6 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PEDOT, PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx obtidas por EDX.

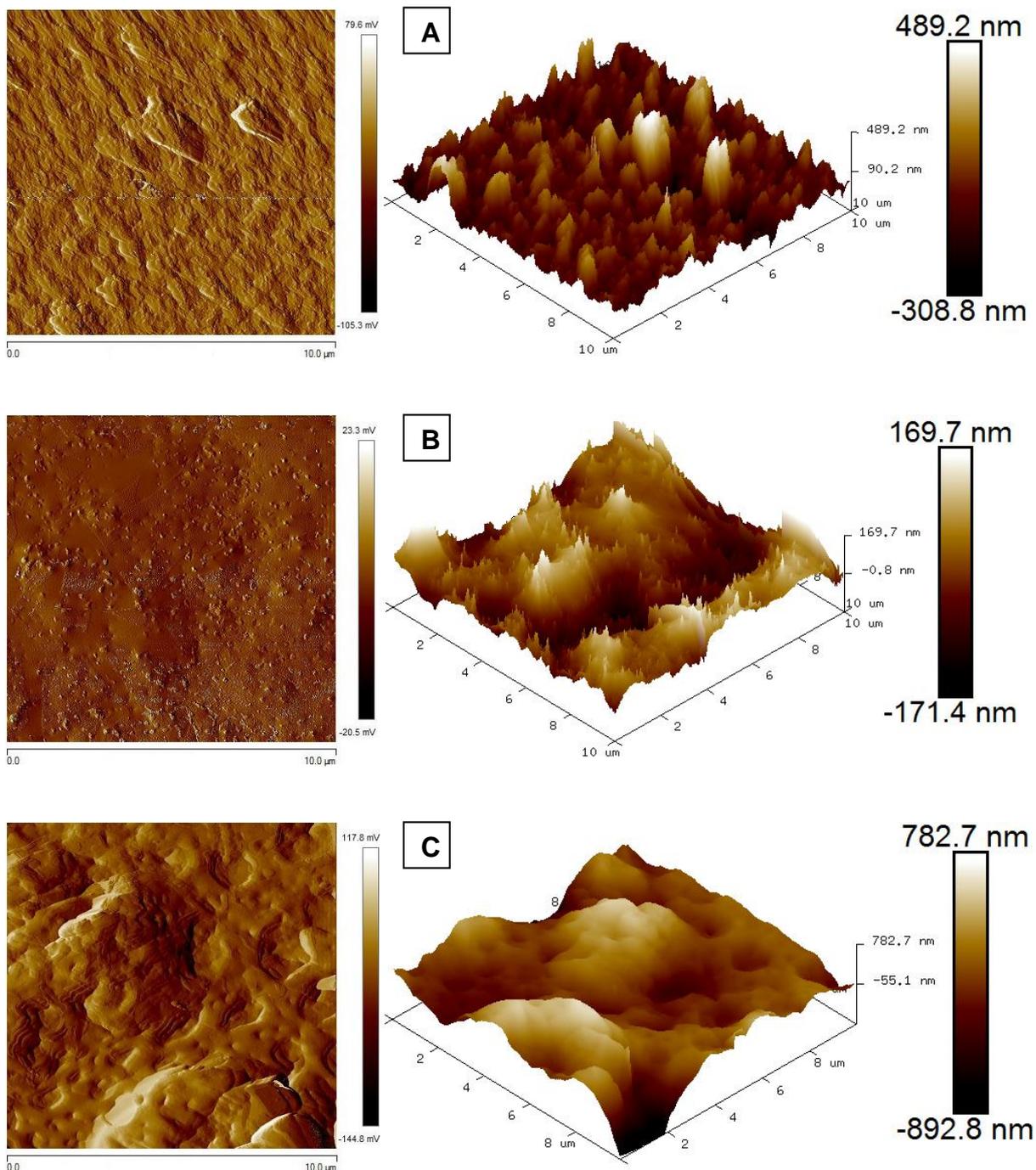
Amostra	PEDOT		PEDOT/TC		PEDOT/TC/GOx	
	Peso %	Átomos %	Peso %	Átomos %	Peso %	Átomos %
Carbono (C)	265,32	79,41	268,64	96,14	73,52	57,27
Oxigênio (O)	63,07	14,17	14,36	3,86	35,69	20,87
Enxofre (S)	40,60	4,55	---	---	---	---
Nitrogênio (N)	---	---	---	---	20,09	13,42
Cloro (Cl)	18,35	1,86	---	---	6,60	1,74
Potássio (K)	---	---	---	---	6,27	1,50
Sódio (Na)	---	---	---	---	8,05	3,28
Fósforo (P)	---	---	---	---	6,35	1,92
Total	387,34	100	283	100	156,58	100

5.2.2.3. Microscopia de Força Atômica

As diferenças na superfície em cada etapa de produção dos biossensores podem ser expressas em função da rugosidade. A rugosidade média (r) da superfície do biossensor foi avaliada durante as etapas de construção com o intuito de verificar a área superficial para penetração da solução enzimática e da solução de glicose e a

espessura da camada polimérica, a qual foi avaliada após tratamento corona e imobilização da GOx. As imagens topográficas da superfície dos biossensores são apresentadas na Figura 38.

Figura 38 - Microscopia topográfica obtidas por AFM das superfícies dos biossensores durante as etapas de construção, (A) PEDOT, (B) PEDOT/TC e (C) PEDOT/TC/GOx.



Os biossensores PEDOT apresentam uma rugosidade média de 35 nm, indicando a formação de um filme polimérico homogêneo, com a presença de aglomerados formados pela agregação de diversos picos separados por vales com a presença de poros. O valor absoluto da espessura da camada de PEDOT foi de 798 nm (Figura 38 (A))

Após tratamento corona a espessura da camada polimérica na amostra PEDOT/TC foi reduzida drasticamente, o valor absoluto foi de 341,1 nm; o que comprova a degradação intensa do polímero. A rugosidade média foi mais suave, 26,3 nm, devido a diminuição da intensidade dos picos agregados formando aglomerados e vales de elevada extensão (Figura 38 (B)) semelhantes os sulcos visualizados no MEV. A diminuição da rugosidade da superfície pode favorecer a remoção da enzima, que fica apenas depositada na superfície do eletrodo não sendo adsorvida entre as estruturas do transdutor.

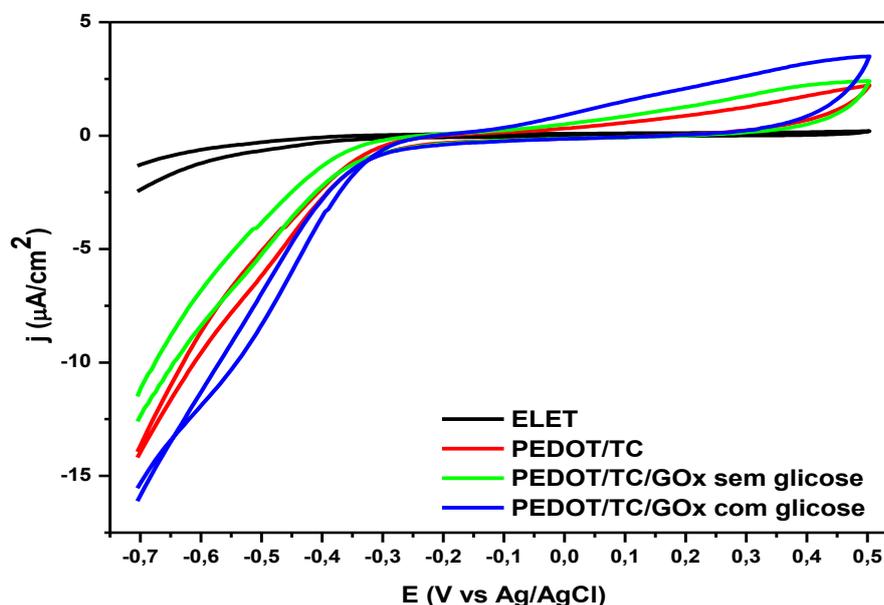
A solução enzimática não penetrou na camada de PEDOT com tratamento corona, ficando imobilizada na superfície da amostra PEDOT/TC/GOx, o que gerou um aumento considerável da espessura da cobertura do eletrodo de trabalho, o valor absoluto foi de 1,675 μm (Figura 38 (C)). A morfologia da camada enzimática não aparenta possuir rugosidade elevada, porém a rugosidade média foi de 96,8 nm indicando a presença de grande quantidade de poros profundos, os quais são favoráveis para a penetração e aumento da área superficial de contato da solução de glicose com as enzimas imobilizadas, se as mesmas permanecerem aderidas ao transdutor.

5.2.3. Caracterização Eletroquímica do Biossensor de PEDOT/TC

5.2.3.1. Voltametria Cíclica

A Figura 39 mostra os voltamogramas cíclicos para o eletrodo sem recobrimento (ELET), PEDOT/TC e PEDOT/TC/GOx com e sem glicose no meio de análise. Não foi apresentado o voltamograma apenas com PEDOT pois não era de interesse a resposta eletroquímica do PEDOT sem tratamento corona, tendo em vista o grande número de pesquisas que abordam o desenvolvimento de sensores para detecção de glicose com PEDOT.

Figura 39 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do biossensor e com a adição de 3 mM de glicose no meio. A ciclagem foi realizada em PBS 10 mM pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.

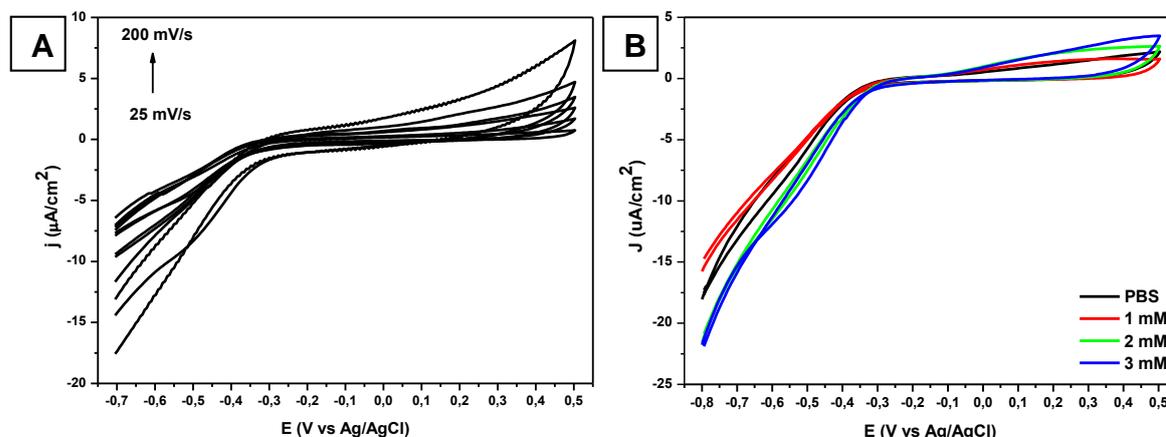


O voltamograma para o eletrodo sem recobrimento (ELET) não apresenta eletroatividade quando comparado com o sensor PEDOT/TC que apresenta alterações na eletroatividade mas nenhum pico específico de oxidação e de redução. O voltamograma apresenta uma pequena mudança no ciclo do sensor PEDOT/TC quando comparado ao do biossensor PEDOT/TC/GOx, mas sem aumento na densidade de corrente e pares redox.

O voltamograma do biossensor apresentou um incremento de densidade de corrente com a adição de glicose 3 mM ao meio de análise, indicando que o protótipo de biossensor de PEDOT com tratamento corona e GOx imobilizada na superfície é sensível a adições de glicose.

O processo de difusão das espécies em solução no interior do biossensor foi verificado através de voltamogramas cíclicos, os quais mostram a eletroatividade do biossensor PEDOT/TC/GOx em diferentes velocidades de varredura, de 25 a 200 mV/s. Os voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 40 (A), onde ocorre um incremento na densidade de corrente do voltamograma com o aumento da velocidade de varredura sem definição dos picos redox do polímero tratado e da enzima.

Figura 40 - Voltametria cíclica para a amostra PEDOT/TC/GOx em PBS 10 mM pH 7,4, em (A) diferentes velocidades de varredura, de 25 a 200 mV/s; e em (B) diferentes concentrações de glicose, de 1 a 3 mM e velocidade de varredura de 50 mV/s.

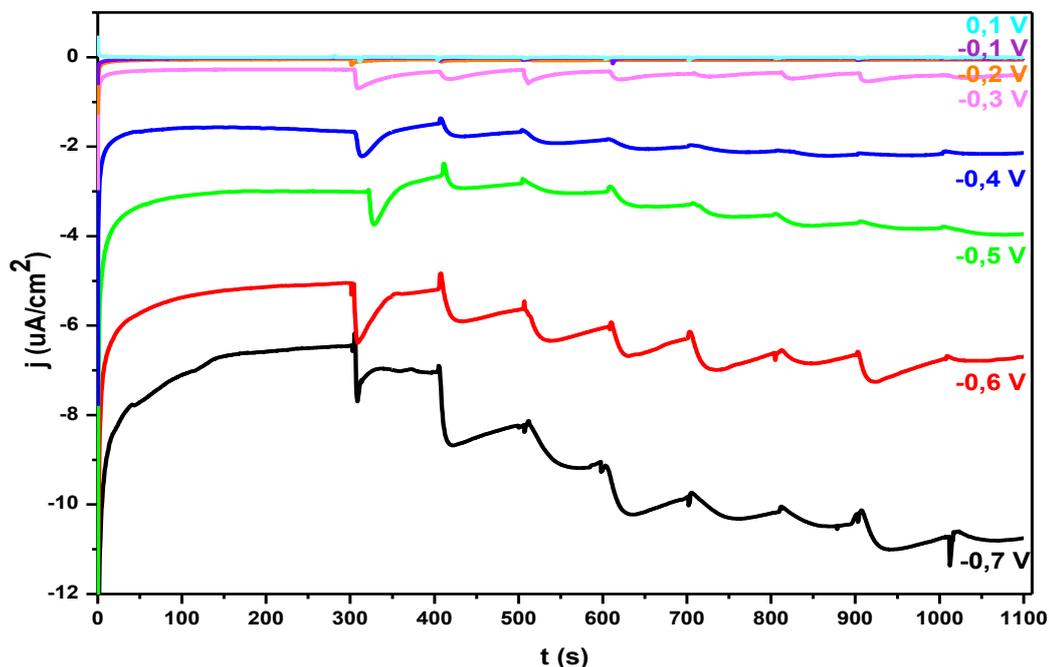


Ao realizar as voltametrias cíclicas do biossensor PEDOT/TC/GOx em diferentes concentrações de glicose no meio, de 1 a 3 mM em PBS 10 mM (Figura 40 (B)), não ocorre um incremento de densidade de corrente de forma ordenada, ou seja, conforme aumenta a concentração de glicose não ocorre um aumento proporcional na densidade de corrente. Os voltamogramas em PBS 10 mM e em solução de glicose 1 mM apresentam uma eletroatividade muito similar, com 2 mM de glicose já é possível verificar um incremento na densidade de corrente, e com 3 mM este ocorre de forma mais acentuada. Como a cronoamperometria permite a detecção de glicose com maior sensibilidade, foram realizadas medidas por este método.

5.2.3.2. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose

O potencial de detecção através da cronoamperometria está diretamente relacionado aos potenciais de oxidação e redução determinados pela voltametria cíclica. Como não foi possível verificar nos voltamogramas os potenciais de oxidação e redução do polímero e da enzima, o potencial de polarização foi variado de -700 até 500 mV utilizando um sensor novo para cada potencial testado, em uma solução de PBS 10 mM, realizando adições de glicose 1 mM a cada 100 s com o objetivo de verificar a melhor resposta da densidade de corrente com adições sucessivas de glicose (Figura 41).

Figura 41 - Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para os sensores de PEDOT/TC/GOx em PBS 10 mM com adições de glicose 1 mM a cada 100 s.



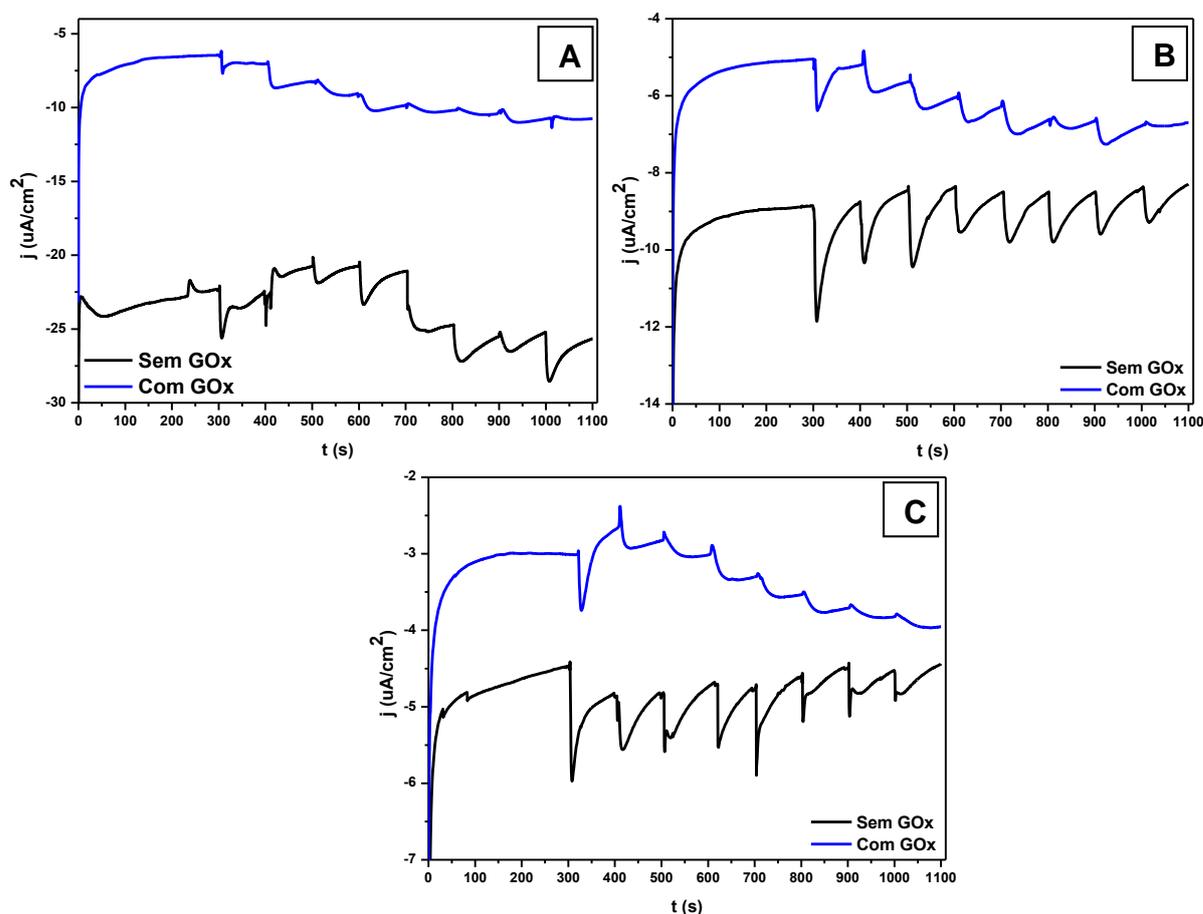
A Figura 41 mostra que cada adição de glicose em potenciais negativos ocorre queda na densidade de corrente catódica. Os incrementos foram mais pronunciados nos potenciais de -700, -600 e -500 mV, e, conforme o potencial diminuía até chegar em zero, não era mais possível observar aumento na densidade de corrente com as adições de glicose. O comportamento seguiu nos potenciais positivos, por isto os mesmos não foram apresentados, indicando que o potencial de detecção estaria localizado nos valores negativos.

Xu et al. (2014) desenvolveram um sensor com grafeno, polianilina e nanopartículas de ouro para detecção direta de glicose no potencial de oxidação da GOx, o potencial de detecção utilizado foi de -550 mV. Wang et al. (2011) desenvolveram um biossensor para detectar glicose a partir da oxidação direta realizada pela GOx utilizando nanotubos de carbono como substrato para a imobilização enzimática. O potencial utilizado para a detecção foi -500 mV, indicando que as propriedades redox da enzima para a oxidação direta da glicose ocorrem nos potenciais indicados na Figura 41.

Para definir o potencial de polarização para detecção de glicose na cronamperometria foram preparados sensores com e sem GOx para comparação da

resposta, os quais foram testados nos potenciais que apresentaram maior incremento na corrente após cada adição (Figura 42).

Figura 42 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PEDOT/TC (sem GOx) e PEDOT/TC/GOx (com GOx) em (A) -700 mV, (B) -600 mV e (C) -500 mV, em PBS 10 mM e adições de glicose 1 mM a cada 100s.



A Figura 42 (A) amostra o comportamento apresentado pelos sensores com e sem GOx imobilizada, realizando adições de glicose 1 mM no potencial fixo de -700 mV. O sensor PEDOT/TC apresenta um comportamento irregular, onde algumas injeções causam diminuição de densidade de corrente, enquanto que outras não produzem nenhuma resposta. O biossensor PEDOT/TC/GOx apresenta resposta durante as quatro primeiras injeções e após o sistema não sofre mais perturbações.

Os sensores submetidos as adições de glicose 1 mM a cada 100 s em potencial fixo de -600 mV, Figura 42 (B), apresentam comportamento sem alteração na densidade de corrente após cada adição para o sensor PEDOT/TC, indicando que o

sensor não é capaz de oxidar a glicose sem a presença da enzima, enquanto que o biossensor recoberto com a enzima, PEDOT/TC/GOx apresentou incrementos de densidade de corrente a cada adição, porém as perturbações não estabilizam permanecendo em um constante aumento.

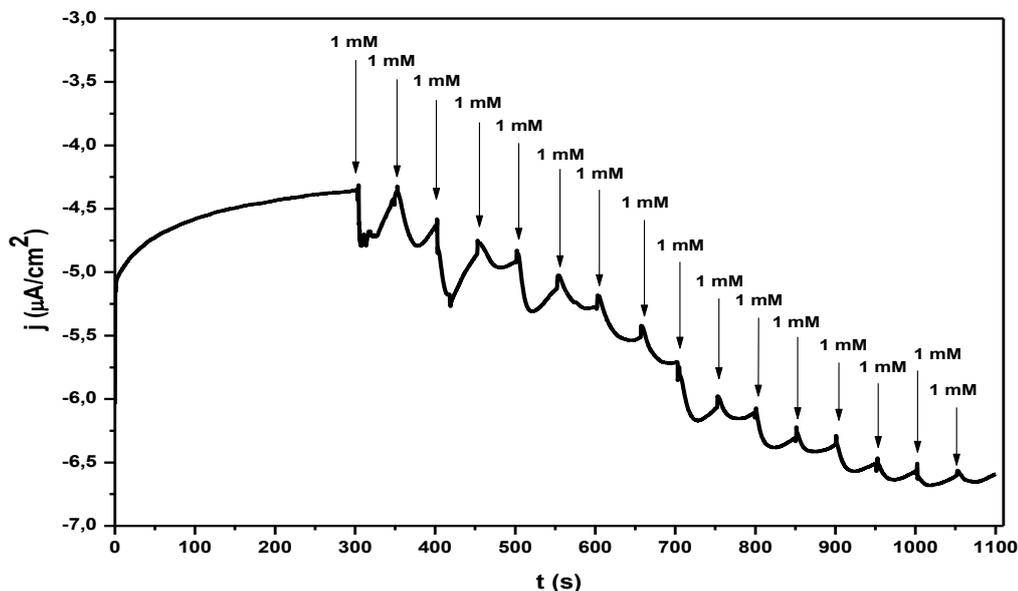
A Figura 42 (C) mostra perturbações sofridas pelos sensores PEDOT/TC/GOx e PEDOT/TC com adições de glicose 1 mM em potencial fixo de -500 mV. O sensor PEDOT/TC, sem a presença da enzima, apresenta após cada adição de glicose o mesmo valor de densidade de corrente, mostrando que o sensor sem a enzima imobilizada em sua superfície não é capaz de oxidar a glicose. O biossensor PEDOT/TC/GOx apresenta perturbações degrau seguindo um padrão de decréscimo de densidade de corrente e detectando maiores concentrações de glicose. O potencial para a detecção de glicose através da oxidação direta pela GOx no biossensor PEDOT/TC/GOx foi definido como -500 mV.

5.2.3.3. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica do Biossensor de PEDOT/TC/GOx

O biossensor, construído na configuração de síntese eletroquímica do PEDOT, com tratamento corona e camada de GOx aplicada por *casting*, é capaz de detectar a reação de oxidação da glicose pela GOx em cada perturbação do sistema, apesar da degradação do polímero e formação de estrutura rica em carbono sobre a superfície do eletrodo (Figura 43).

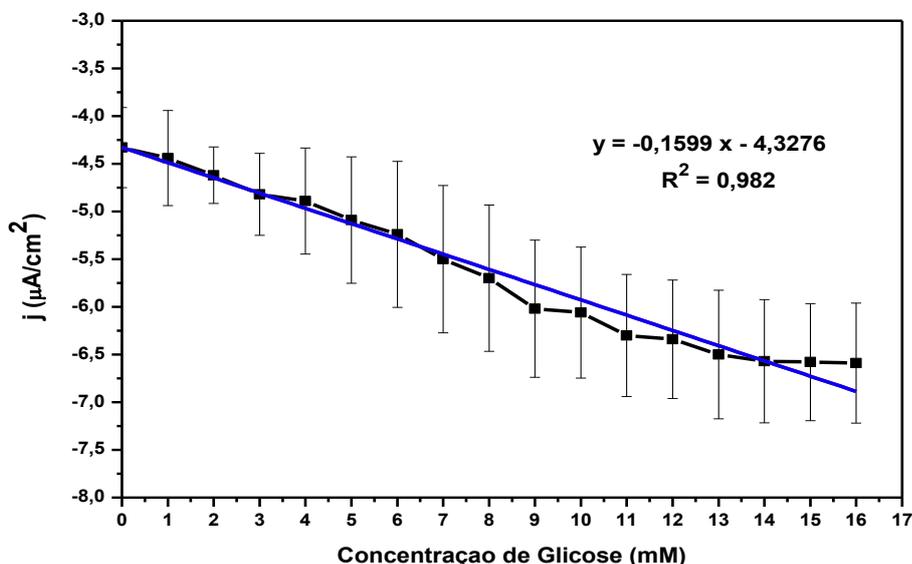
A Figura 43 mostra a densidade de corrente obtida para cada adição de glicose no biossensor PEDOT/TC/GOx a cada 50 s. A resposta do biossensor é rápida, sendo capaz de detectar concentrações de glicose mais elevadas, como 12 mM, que caracterizam níveis de glicose no corpo humano em condições patológicas.

Figura 43 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 10 mM, com adições de glicose 1 mM a cada 50 s em potencial de -500 mV.



As perturbações realizadas na análise de cronoamperometria (Figura 43), permitem definir a curva característica do biossensor de PEDOT/TC/GOx e obter a equação da reta, ou equação característica. A Figura 44 apresenta a relação da densidade de corrente de pico versus concentração de glicose aplicada em oito biossensores distintos realizando medidas em cada concentração.

Figura 44 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicada no eletrodo e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.



A Figura 44 mostra a relação linear entre a densidade de corrente e a concentração de glicose no intervalo de concentrações de 1 a 14 mM, onde o coeficiente linear (R^2) neste intervalo foi de 0,982. A sensibilidade do biossensor, obtida pelo declive da equação característica no intervalo linear, é de 0,1599 $\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$ e o limite de detecção, calculado com base na relação sinal-ruído de 3, é de 7,29 mM. Para concentrações superiores a 14 mM o biossensor apresenta um desvio da linearidade da equação característica maior do que 5%, quando este é superior a 5% o biossensor não apresenta uma resposta ideal conforme verificado por Skoog et al. (2006) A afinidade biológica apresentada pelo biossensor na difusão do substrato pode ser definida pelo K_m em 1,73 mM, indicando uma boa afinidade biológica e elevada velocidade de dissociação da glicose pela enzima e formação de ácido glucônico.

Pela equação da reta pode-se determinar um valor de concentração conforme uma medida de densidade de corrente, onde o PEDOT com tratamento corona é responsável pelo transporte de elétrons até a base do eletrodo, atuando como transdutor e caracterizando o funcionamento de um biossensor amperométrico de terceira geração. Ao adicionar uma amostra com glicose no biossensor PEDOT/TC/GOx e realizar uma leitura de densidade de corrente é possível determinar a concentração de glicose pela equação característica do biossensor, equação (5):

$$j = -0,1599 C - 4,3276 \quad (5)$$

Rearranjando a equação em função da variável desconhecida, ou seja, em função da concentração de glicose, resulta a equação (6):

$$C = - \left(\frac{j + 4,3276}{0,1599} \right) \quad (6)$$

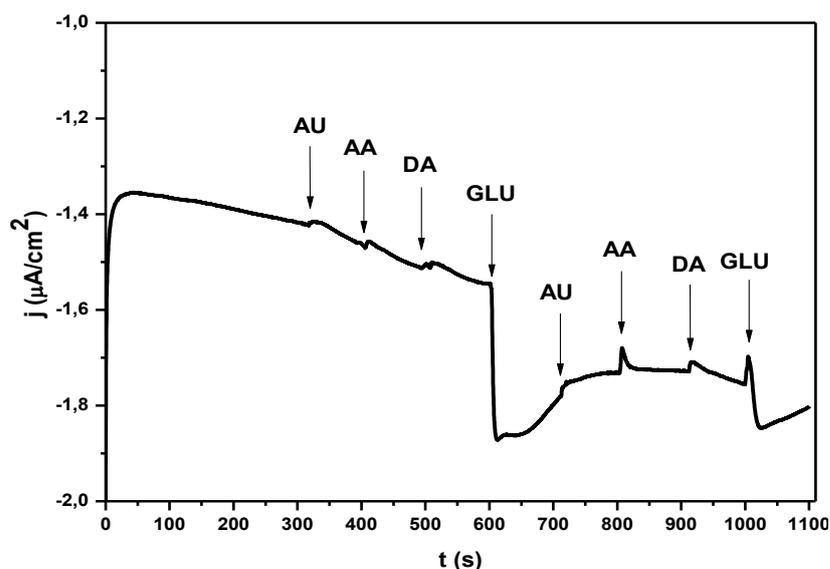
Onde: C= concentração de glicose a ser medida em mM; j= densidade de corrente elétrica produzida na detecção da glicose pela enzima em $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

O protótipo desenvolvido permite medir níveis de glicose no sangue para uma pessoa saudável e em condições patológicas nas concentrações de 2 a 14 mM de glicose que equivalem de 30 a 240 mg/dL.

5.2.3.4. Detecção de Interferentes

A especificidade do sensor frente a adição de interferentes, ou seja, de substâncias que estão presentes no fluido corporal, foi verificada através da adição de alíquotas de 1 mM de dopamina, ácido úrico ou ácido ascórbico. Após a adição dos interferentes foi realizada a adição de glicose. As perturbações obtidas pela adição de cada interferente podem ser visualizadas na Figura 45.

Figura 45 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 10 mM e potencial de -500 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s.



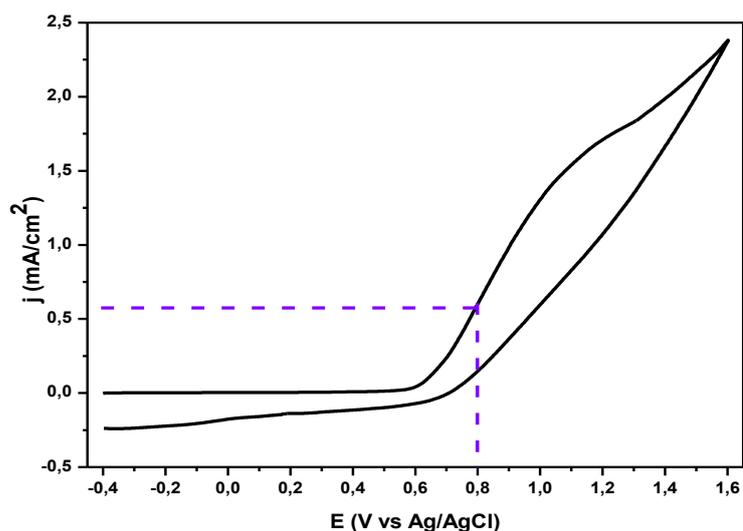
A curva mostra que o biossensor de PEDOT/TC/GOx para as primeiras adições não apresentava sua densidade de corrente estável, pois com as adições a densidade de corrente diminuiu continuamente. Com a adição da glicose a densidade de corrente do sistema alterou de -1,5 para -1,8 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ e após ao adicionar novamente os interferentes o sistema permaneceu praticamente estável. Uma nova adição de GLU provocou nova alteração da densidade de corrente menor que a primeira adição de GLU, mostrando diminuição da sensibilidade do sensor.

5.3. Sensor Não-Enzimático desenvolvido com PEDOT-OH

5.3.1. Construção do Sensor de PEDOT-OH

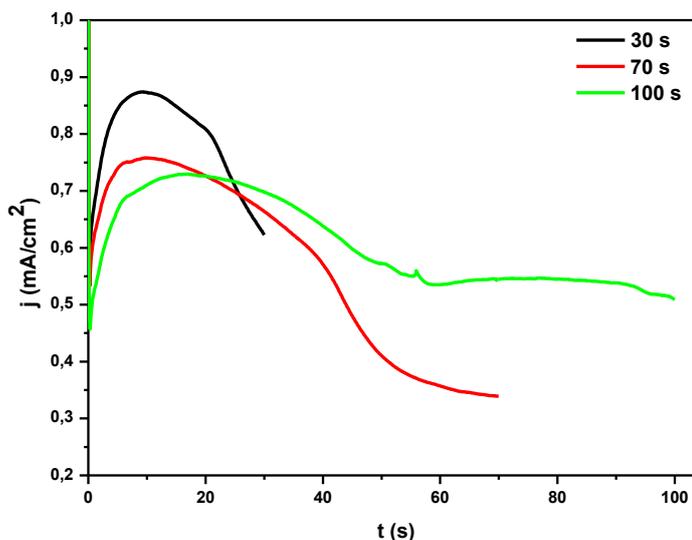
A síntese do PEDOT-OH foi realizada por cronoamperometria em potencial de 0,8 V durante 10 s. O potencial foi determinado a partir dos dados de voltametria cíclica em célula eletroquímica de acrílico, onde para cada eletrodo era utilizado um volume de 100 μL de solução aquosa contendo 0,1 M de monômero de EDOT-OH; 0,1 M de LiClO_4 e GOx na concentração de 2000 U/mL (Figura 46).

Figura 46 – Voltametria cíclica de polimerização do PEDOT-OH a partir do monômero EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO_4 e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens e velocidade de varredura de 50 mV/s.



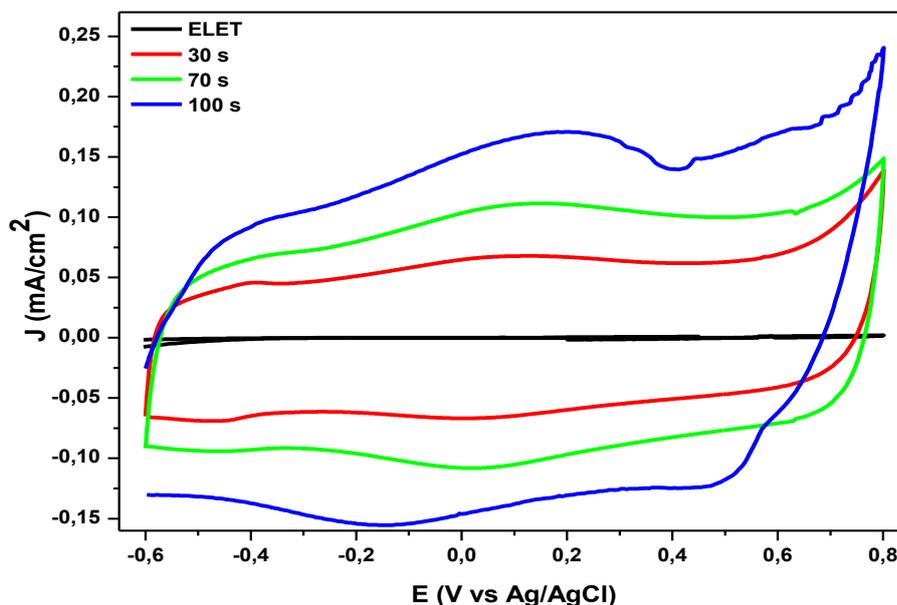
Foi escolhido o potencial de polarização de 0,8 V por estar situado no início do aumento da corrente durante a varredura de potencial (Figura 46). A imobilização da GOx durante a síntese eletroquímica do PEDOT-OH ocorreu por *entrapment*. O polímero foi sintetizado em diferentes tempos, 30; 70 e 100 s. As curvas de eletropolimerização nos diferentes tempos podem ser visualizadas na Figura 47.

Figura 47 - Eletropolimerização do EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO₄ e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens.



O comportamento eletroquímico dos sensores obtidos com diferentes tempos de eletropolimerização está representado na Figura 48.

Figura 48 – Voltametria cíclica dos sensores recobertos com PEDOT-OH e GOx sintetizados com diferentes tempos de polimerização, em PBS 0,1 M e velocidade de varredura de 50 mV/s.

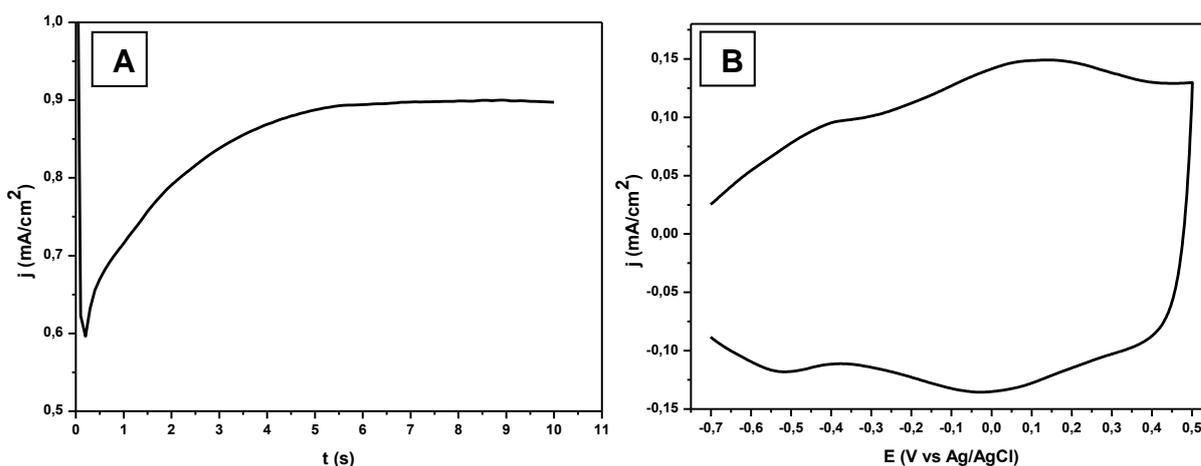


No voltamograma do sensor polimerizado durante 30 s é observado o par redox da GOx na região de potenciais de -500 a -300 mV. Como o par redox foi observado apenas no menor tempo de síntese, e Xu et al. (2013) observaram que tempos de

síntese maiores produzem um filme polimérico de maior espessura sobre o eletrodo sem aumento da porosidade e da área superficial de penetração do eletrólito, dificultando o transporte de elétrons da reação da enzima com a glicose até a superfície do eletrodo de trabalho do sensor, foi decidido diminuir o tempo de síntese para 10 s.

A eletropolimerização do EDOT-OH com GOx sobre o eletrodo de carbono durante 10 s pode ser visualizada na Figura 49 (A). O comportamento eletroquímico (Figura 49 (B)) do sensor recoberto com PEDOT-OH e GOx mostra o par redox da GOx e do PEDOT-OH.

Figura 49 - (A) Eletropolimerização do EDOT-OH em solução aquosa contendo 0,1 M de LiClO₄ e 2000 U/mL de GOx, em eletrodo de carbono da empresa DropSens. (B) Voltametria cíclica dos sensor recoberto com PEDOT-OH e GOx durante 10 s de polimerização, em PBS 0,1 M e velocidade de varredura de 50 mV/s.



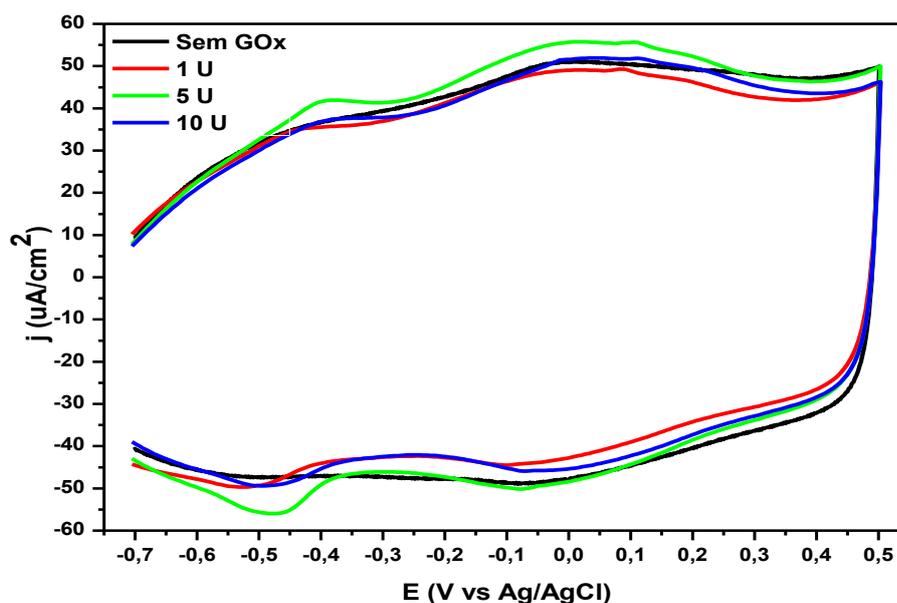
A formação de um filme fino de polímero condutor apresentou uma maior sensibilidade para a detecção direta dos elétrons do processo de oxirredução do cofator FAD da GOx. Xia; Wei e Wan (2010) afirmaram que filmes finos de polímero condutor apresentam uma maior área específica para a interação do substrato, permitindo que este seja adsorvido e difundido na película formada, o que favorece uma maior sensibilidade e menor tempo de resposta do sensor.

Definidas as condições de síntese para o sensor de PEDOT-OH com GOx imobilizada durante a síntese eletroquímica, foram produzidos sensores sem enzima nas mesmas condições para comparação. Ainda foram produzidos sensores pelo

mesmo método de síntese, mas com a enzima imobilizada por adsorção, para estudar a eficiência de dois métodos de imobilização.

Após a síntese do PEDOT-OH, o eletrodo com a camada polimérica seguiu para geladeira durante 5 horas para garantir a completa secagem, após foi aplicada por *casting* a alíquota de 1 μL de solução enzimática, preparada com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 e 1, 5 ou 10 U/ μL de GOx. Os sensores foram armazenados em geladeira durante a noite garantindo a secagem das camadas que compõem o eletrodo de trabalho. A quantidade de GOx imobilizada por adsorção foi definida através da verificação da eletroatividade dos sensores com diferentes concentrações de GOx aplicada por *casting* (Figura 50).

Figura 50 - Voltametria cíclica para determinação da quantidade de GOx imobilizada no eletrodo de trabalho recoberto com PEDOT-OH, em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



Nos voltamogramas foi possível verificar os picos de oxidação e de redução do PEDOT-OH além do par redox da GOx. O eletrodo com 5 U/sensor apresentou incremento na eletroatividade do pico anódico do polímero e nos picos de oxidação e de redução da GOx quando comparado aos sensores com 1 ou 10 U/sensor. Os eletrodos com 1 ou 10 U/sensor apresentaram uma eletroatividade semelhante a

eletroatividade do sensor sem GOx. Desta forma decidiu-se imobilizar 5 U/sensor de GOx.

Os sensores foram nomeados da seguinte forma: sensores produzidos apenas com PEDOT-OH passaram a ser chamados de PEDOT-OH, biossensores produzidos com PEDOT-OH e GOx imobilizada durante a síntese por *entrapment* foram chamados de PEDOT-OH+GOx, biossensores produzidos com PEDOT-OH e GOx imobilizada por adsorção foram chamados de PEDOT-OH/GOx, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Nomenclatura recebida pelos biossensores e quantidades de reagentes utilizados.

Amostras	Condições de Síntese PIC	Método de Imobilização	Nomenclatura
Sensor	10 s à 800 mV	---	PEDOT-OH
Biossensor	10 s à 800 mV	2000 U/mL por <i>entrapment</i>	PEDOT-OH+GOx
Biossensor	10 s à 800 mV	5 U/sensor por adsorção	PEDOT-OH/GOx

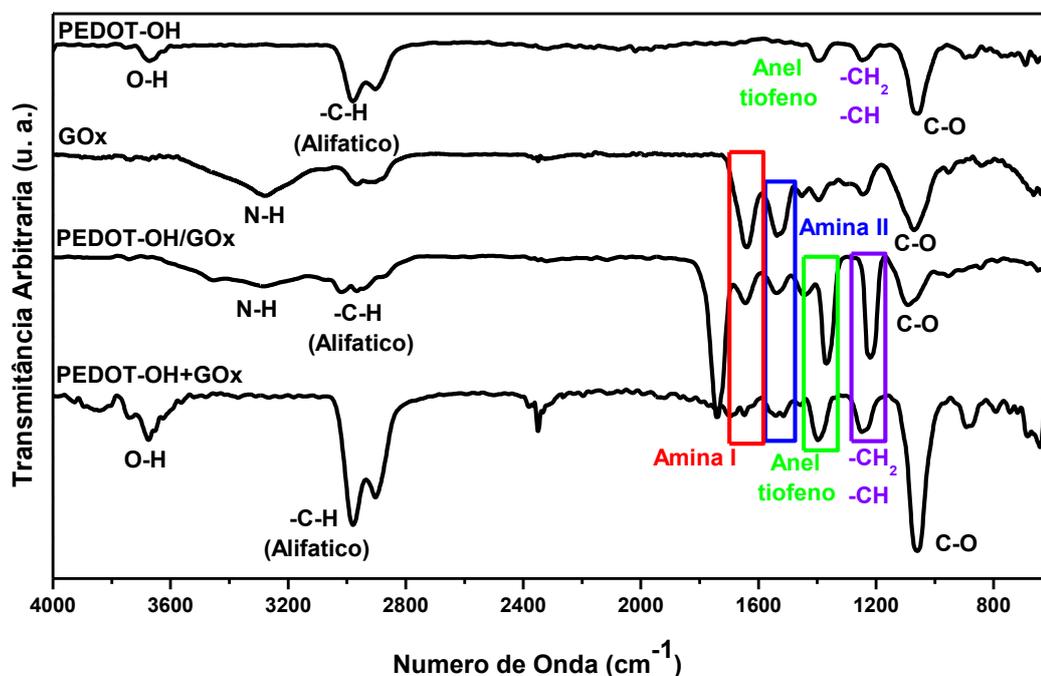
5.3.2.1. Espectroscopia FTIR

A espectroscopia de FTIR foi realizada para verificar a formação do PEDOT-OH e a imobilização da GOx no biossensor. Os espectros de FTIR-ATR do PEDOT-OH e da GOx foram comparados com os dos sensores PEDOT-OH+GOx e PEDOT-OH/GOx (Figura 51).

As bandas mais relevantes no espectro (Figura 51) para a formação do PEDOT-OH são observados em 3669 cm^{-1} e $2980\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento O – H e ao estiramento alifático – C – H, e em 1238 cm^{-1} devido a deformação – C – H, de grupos laterais CH_2 e grupos metilenodioxi. As vibrações em 1388 e 1059 cm^{-1} são atribuídos aos modos de estiramento do anel do tiofeno e grupo éter, respectivamente. A ausência da banda de absorção a 3099 cm^{-1} no espectro do polímero prova que a polimerização anódica dos monómeros ocorre nos carbonos 2

e 5 dos anéis de tiofeno, proporcionando moléculas lineares. (FABREGAT et al., 2014; LU et al., 2012)

Figura 51 - Espectros de FTIR do PEDOT-OH sintetizado sobre o eletrodo de trabalho, após da enzima GOx, e das amostras PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx.



A presença da GOx pode ser percebida pelas bandas em 1527 cm^{-1} relacionado ao estiramento das ligações C – N da amida II e em 1640 cm^{-1} relativo ao estiramento das ligações C = O da amida I. (BAGHAYERI, 2015; WISITSORAAT et al., 2013)

Ambos os sensores recobertos com PEDOT-OH e com GOx, apresentam as bandas características do PEDOT-OH e da GOx nos espectros da Figura 51. No espectro obtido para o sensor PEDOT-OH/GOx, onde a enzima é imobilizada por adsorção, é possível visualizar as bandas relacionadas a amida I e amida II em 1644 e 1535 cm^{-1} respectivamente, indicando a presença da enzima na superfície do sensor. As bandas relevantes ao PEDOT-OH podem ser observadas em $3017\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ atribuídas ao estiramento alifático – C – H, em 1223 cm^{-1} devido a deformação – C – H, de grupos laterais CH_2 e grupos metilenodioxo, em 1372 cm^{-1} relativo ao alongamento do anel de tiofeno e em 1093 cm^{-1} atribuído ao alongamento do grupo éter. Não é possível verificar a presença da banda característica do estiramento da ligação O – H, porém é possível observar uma banda em 1739 cm^{-1} sugerindo a

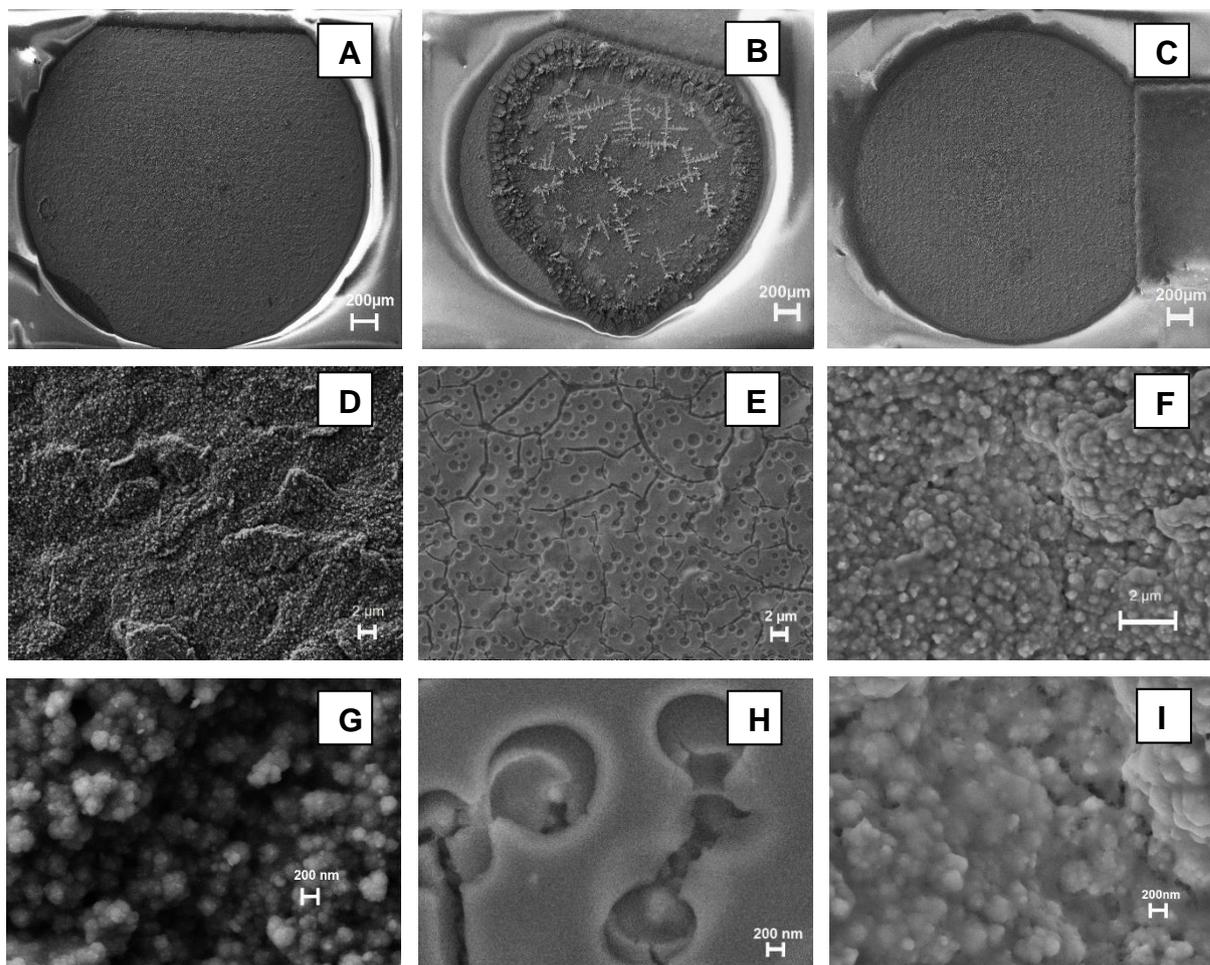
formação de grupos ésteres a partir do grupo $-OH$ do PEDOT-OH com ácidos carboxílicos oriundos dos aminoácidos presentes na GOx.

O espectro do biossensor PEDOT-OH+GOx apresenta os picos característicos do PEDOT-OH, inclusive a banda de estiramento das ligações $O-H$ em 3677 cm^{-1} , e da GOx, indicando que a enzima foi imobilizada entre as estruturas do PEDOT-OH, mas não sofreu interação durante a síntese eletroquímica.

5.3.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura com Espectroscopia de Difração de Raio - X

Na Figura 52 é possível observar as imagens de microscopia eletrônica de varredura para os sensores PEDOT-OH, PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx.

Figura 52 - Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura para os sensores recobertos com PEDOT-OH em (A), (D) e (G); PEDOT-OH/GOx em (B), (E) e (H); e PEDOT-OH+GOx em (C), (F) e (I).



As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 52 (A), (B) e (C)) mostram um completo recobrimento da superfície ativa dos eletrodos de trabalho durante a polimerização eletroquímica por 10 s. Na amostra PEDOT-OH/GOx (Figura 52 (B)) é possível verificar o recobrimento do filme de PEDOT-OH com a solução enzimática por *casting*. A solução de PBS 0,1 M com 5 U/ μ L não recobriu por completo o eletrodo polimerizado, ficando uma pequena área sem enzima adsorvida, porém a presença dessa só pode ser observada na micrografia. Ainda, observa-se a presença de cristais de sais, da solução de PBS 0,1 M, após completa secagem do biossensor.

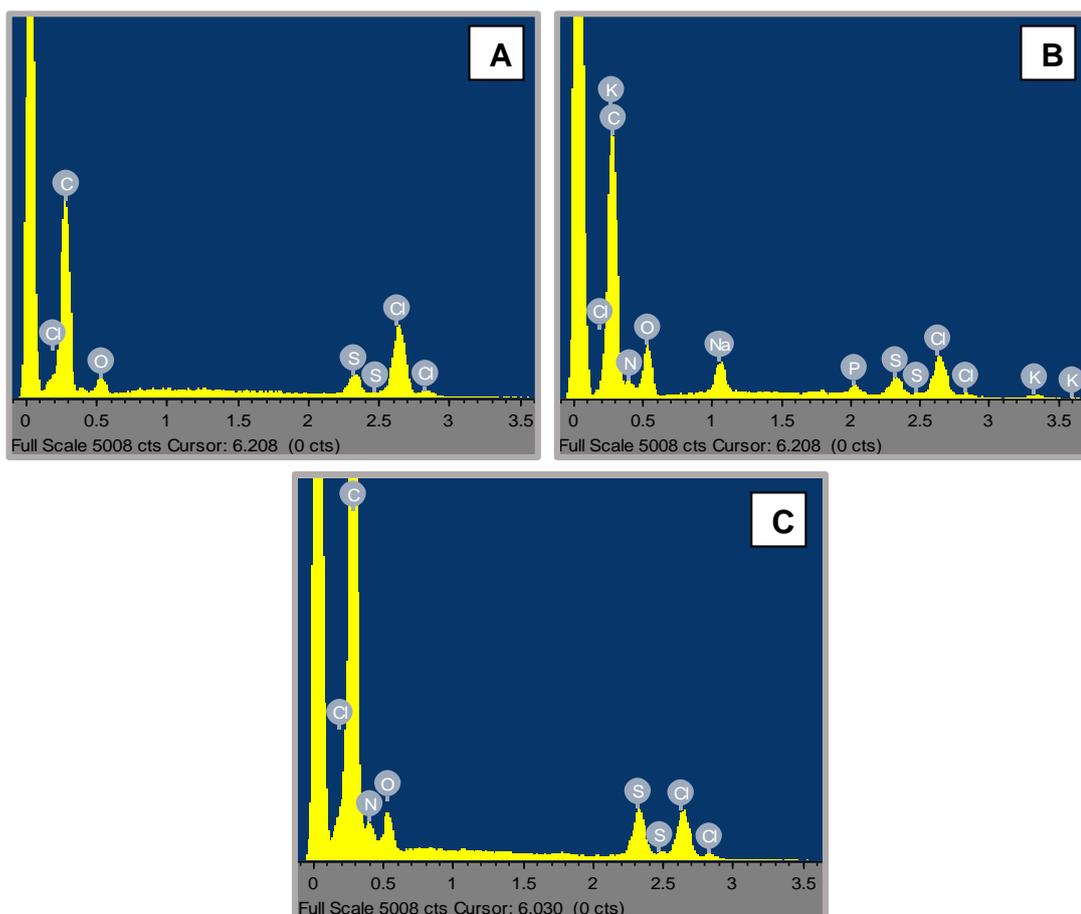
A superfície do sensor PEDOT-OH (Figura 52 (D)), é homogênea sendo recoberta com uma estrutura com a mesma morfologia em toda a sua extensão. A estrutura é formada por grânulos de diferentes tamanhos e poros, o que contribui para o aumento da área superficial. Os tamanhos dos grânulos obtidos não podem ser definidos de forma exata, mas a Figura 52 (G) permite afirmar que os mesmos variam de 100 a 400 nm.

A imobilização da enzima sobre a camada polimérica por *casting* formou uma camada enzimática sobre o polímero na amostra PEDOT-OH/GOx (Figura 52 (B), (E) e (H)). Pequenos poros e rachaduras são visualizados na superfície (Figura 52 (E)), em algumas rachaduras (Figura 52 (H)) onde é possível verificar o polímero condutor, indicando que a GOx não penetra na camada polimérica, ficando adsorvida apenas na superfície, ou penetra apenas na camada superficial do PEDOT-OH e não em toda sua espessura. A formação desta camada enzimática na superfície do polímero pode ser desfavorável para o biossensor devido a facilidade de remoção da enzima durante a detecção, prejudicando o transporte de elétrons da oxidação da glicose pela GOx até a superfície do sensor.

Com a adição da enzima ao meio de síntese para a obtenção da amostra PEDOT-OH+GOx (Figura 52 (C), (F) e (I)), foi obtida uma estrutura com a mesma morfologia homogênea do polímero em toda a superfície. O PEDOT-OH sintetizado com a presença da GOx possui uma estrutura granular, como observado para o PEDOT-OH sintetizado sem a presença da GOx, recoberto por uma espécie de membrana ligando um grânulo a outro.

As análises de espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios – X (EDX) obtidas para as amostras PEDOT-OH, PEDOT-OH+GOx e PEDOT-OH/GOx podem ser observadas na Figura 53.

Figura 53 - Espectroscopia de EDX das amostras (A) PEDOT-OH, (B) PEDOT-OH/GOx, e (C) PEDOT-OH+GOx.



Todas as amostras apresentam a presença de enxofre, característico da estrutura do anel do PEDOT-OH. O nível de dopagem do PEDOT-OH foi estimado usando a relação Cl / S pela % de átomos derivados da espectroscopia EDX (Tabela 8), e foi de aproximadamente 0,87; valor este muito superior quando comparado ao valor de 0,54 obtido por Ocampo et al. (2006) para o PEDOT. Este alto grau de dopagem explica a alta eletroatividade observada no voltamograma do PEDOT-OH.

Nas amostras PEDOT-OH/GOx (Figura 53 (B)) e PEDOT-OH+GOx (Figura 53 (C)), foi possível verificar pequenas quantidades de nitrogênio, indicando a presença da enzima na superfície do eletrodo após imobilização por *entrapment*, na

polimerização eletroquímica ou por adsorção na aplicação por *casting*. Os cristais de sais visualizados no MEV para o sensor PEDOT-OH/GOx são verificados no EDX (Figura 53 (B)) pela presença de picos de sódio e potássio, elementos presentes na composição da solução tampão fosfato salino 0,1 M. Pode-se visualizar na Tabela 8 as quantidades de cada elemento em cada amostra.

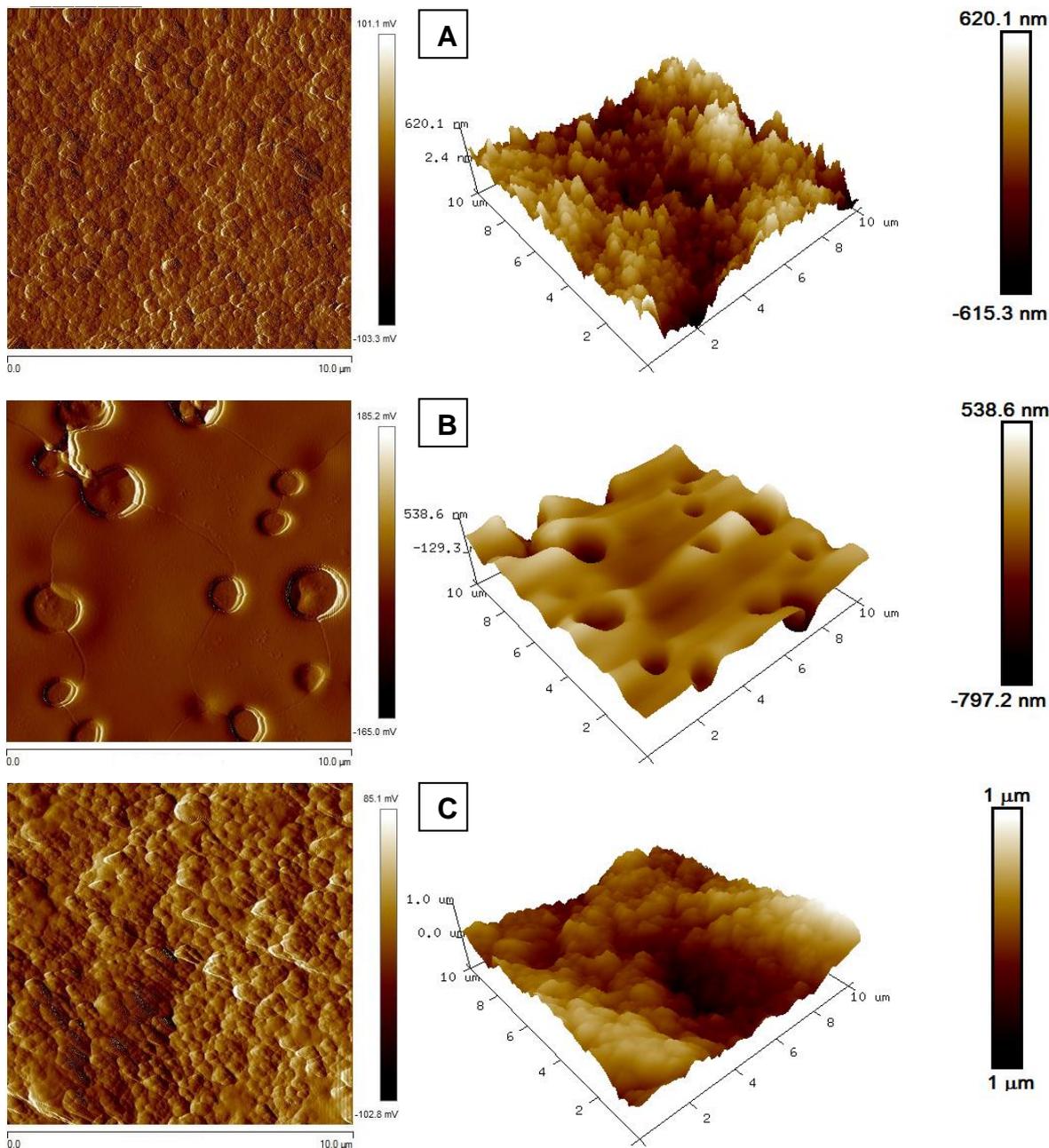
Tabela 8 - Porcentagens de cada elemento atômico nas amostras de PEDOT-OH, PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx obtidas por EDX.

Amostra	PEDOT-OH		PEDOT-OH/GOx		PEDOT-OH+GOx	
Elemento	Peso %	Átomos %	Peso %	Átomos %	Peso %	Átomos %
Carbono (C)	72,04	64,08	72,17	59,76	185,57	74,38
Oxigênio (O)	5,89	3,98	15,34	9,53	12,03	3,62
Enxofre (S)	49,60	16,71	14,69	4,56	40,05	6,01
Nitrogênio (N)	---	---	6,09	4,32	21,01	7,22
Cloro (Cl)	46,02	14,52	52,40	14,70	64,59	8,77
Potássio (K)	---	---	11,13	2,83	---	---
Sódio (Na)	---	---	6,17	2,67	---	---
Fósforo (P)	---	---	5,05	1,62	---	---
Total	173,55	100	183,04	100	323,26	100

5.3.2.3. Microscopia de Força Atômica

Os biossensores produzidos com PEDOT-OH e GOx foram analisados através de AFM para visualização das diferenças na superfície e na rugosidade média quando a enzima é imobilizada durante a síntese ou por adsorção, além de verificar a área superficial disponível para penetração da solução contendo glicose durante a detecção. As imagens topográficas da superfície dos biossensores são apresentadas na Figura 54.

Figura 54 - Microscopia topográfica das superfícies dos biossensores durante as etapas de construção, (a) PEDOT-OH, (b) PEDOT-OH/GOx e (c) PEDOT-OH+GOx.



A topografia do sensor recoberto apenas com o filme de PEDOT-OH apresenta pequenos aglomerados de macromoléculas agregadas distribuídas homogeneamente. Isto corresponde à topografia tipicamente encontrada nos PIC's heterocíclicos com um crescimento linear. A rugosidade média obtida foi de 86,8 nm, indicando a presença de poros e grânulos aglomerados na superfície, o que é

verificado pelo valor absoluto da espessura da camada de PEDOT-OH de 1,235 μm (Figura 54 (A)).

O biossensor PEDOT-OH/GOx sofreu um acréscimo na espessura do recobrimento do eletrodo de trabalho (Figura 54 (B)), quando comparado ao eletrodo PEDOT-OH, onde o valor absoluto da espessura das camadas de PEDOT-OH e GOx imobilizada por adsorção, foi de 1,335 μm , sendo este acréscimo proveniente da aplicação da camada enzimática. A rugosidade média apresentou valores elevados, 109 nm, quando comparado a amostra de PEDOT-OH, devido a presença de poros profundos, apesar de visualmente a amostra aparentar ser plana. A presença destes poros é favorável para aumento da área superficial de contato da solução de glicose com a enzima imobilizada.

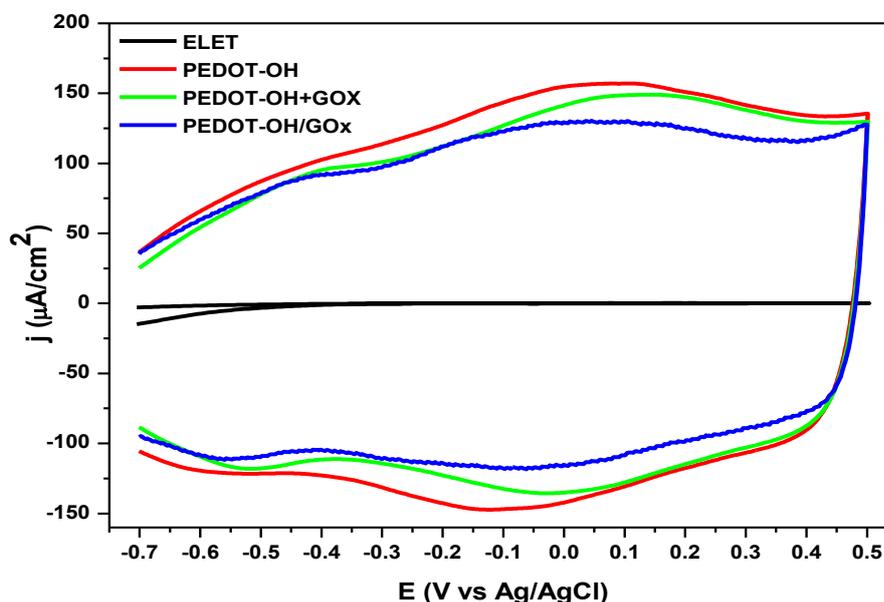
A topografia apresentada pelo sensor com PEDOT-OH+GOx (Figura 54 (C)), apresenta um recobrimento mais espesso, com valor absoluto de 2 μm . A superfície apresentou novamente a presença de grânulos aglomerados distribuídos homogeneamente como encontrado na superfície do filme de PEDOT-OH, porém a presença da enzima durante a síntese fez com que os grânulos fossem envolvidos por uma espécie de membrana, unindo uns aos outros e aumentando a espessura do filme. A rugosidade média do filme foi medida em 132 nm, devido a presença de poros e de aglomerados, os quais favorecem no aumento da área superficial de contato e uma maior interação das enzimas com a solução de glicose.

5.3.2. Caracterização Eletroquímica do Sensor de PEDOT-OH

5.3.3.1. Voltametria Cíclica

O comportamento eletroquímico dos biossensores, com a enzima imobilizada por adsorção ou durante a síntese, foi verificado por voltametria cíclica em solução de PBS 0,1 M (Figura 55).

Figura 55 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do sensor para as duas condições de imobilização da GOx. A ciclagem foi realizada em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.



O eletrodo sem recobrimento (ELET) não apresenta eletroatividade (Figura 55). O voltamograma do sensor recoberto com PEDOT-OH apresenta um pico anódico de corrente em aproximadamente 50 mV, o qual indica o estado mais oxidado do polímero, e em -125 mV o pico catódico. O polímero possui comportamento de oxirredução reversível e o alto grau de dopagem calculado pelo EDX pode ser verificado na elevada eletroatividade apresentada pelo voltamograma do PEDOT-OH.

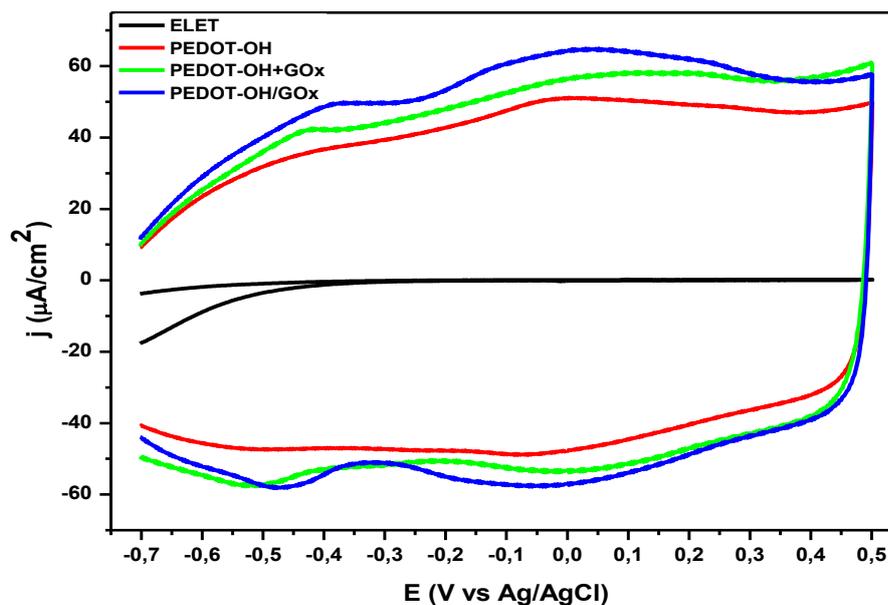
Os voltamogramas das amostras PEDOT-OH+GOx e PEDOT-OH/GOx mostram uma mudança no ciclo apresentando o par redox da enzima. O pico de oxidação da GOx no sensor PEDOT-OH+GOx ocorre em -380 mV e o de redução em -510 mV, o sensor PEDOT-OH/GOx apresenta em -430 mV o pico de oxidação e -570 mV o pico de redução, valores próximos aos verificados por Xu et al. (2014) e Hu; Feng e Zhan (2015). A comparação da resposta do voltamograma do PEDOT-OH com os voltamogramas dos biossensores PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx mostra que a enzima não desempenha qualquer efeito electrocatalisador nos processos de oxidação-redução do PEDOT-OH, apresentando apenas o comportamento redox de seu cofator FAD.

Os biossensores PEDOT-OH/GOx e PEDOT-OH+GOx apresentam um pequeno decréscimo de densidade de corrente nos picos redox do polímero quando

comparado ao voltamograma do sensor PEDOT-OH. Este decréscimo pode estar relacionado ao fato de que a enzima não apresenta um caráter condutor, atuando como um isolante.

Ao adicionar glicose 1 mM ao meio de análise, o sensor PEDOT-OH apresentou menor eletroatividade quando comparada com os sensores com GOx imobilizada, mostrando que os sensores com GOx são capazes de oxidar a glicose (Figura 56). O par redox da enzima pode ser observado para ambos os sensores, estando localizados para o sensor PEDOT-OH+GOx o pico de oxidação em -450 e o de redução em -525 mV, e para o sensor PEDOT-OH/GOx em -400 mV o pico anódico e em -430 mV o pico catódico.

Figura 56 - Voltametria cíclica comparativa entre as etapas de construção do sensor para as duas condições de imobilização da GOx adicionando glicose 1 mM ao meio. A ciclagem foi realizada em PBS 0,1 M pH 7,4 à velocidade de varredura de 50 mV/s.

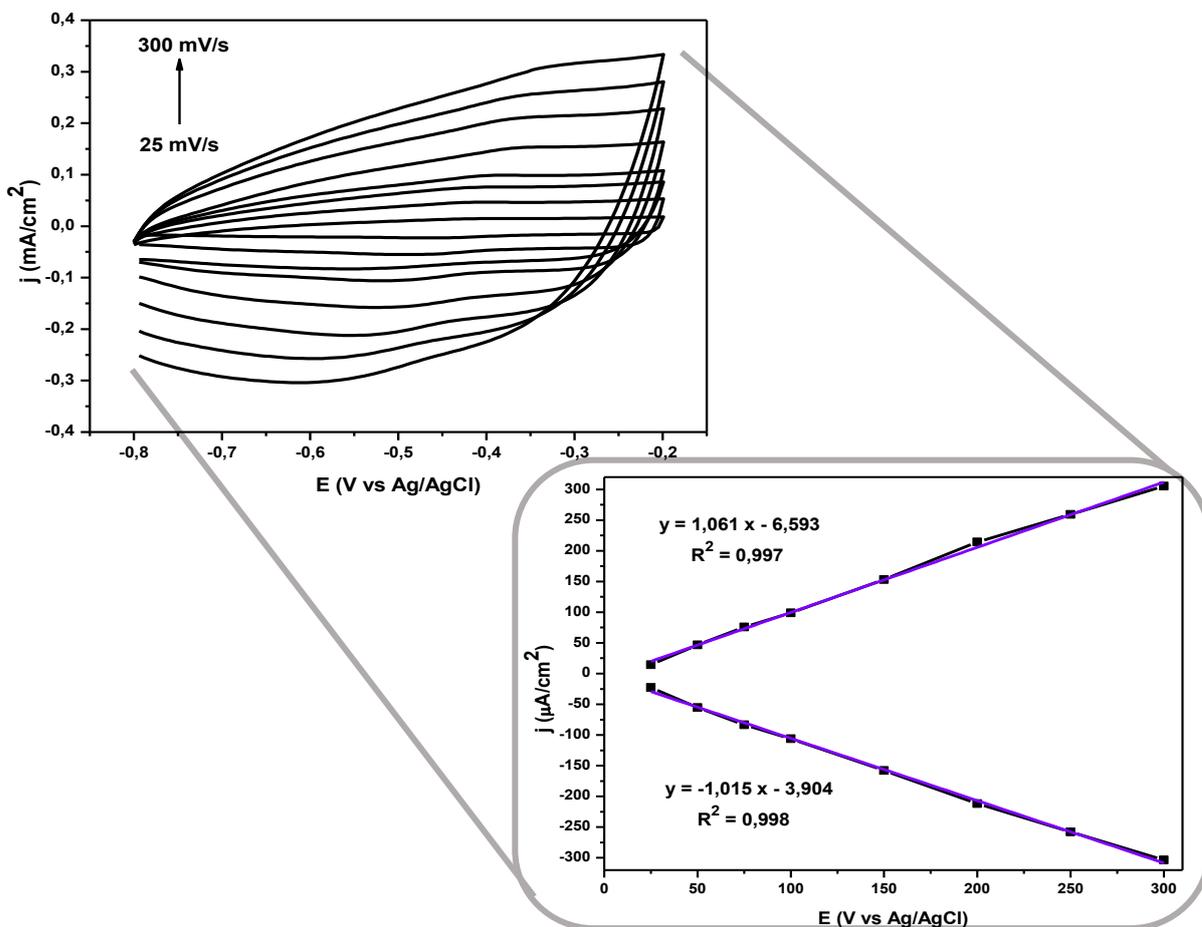


A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o sensor com GOx imobilizada por adsorção, sobre o filme polimérico, sensor PEDOT-OH/GOx, e após, os resultados do sensor com GOx imobilizada durante a síntese eletroquímica, sensor PEDOT-OH+GOx.

5.3.3.2. Eletroatividade do sensor com GOx imobilizada por Adsorção

A eletroatividade do biossensor PEDOT-OH/GOx foi testada em velocidades de varredura de 25 a 200 mV/s em PBS 0,1 M. O intervalo de potenciais utilizado para as ciclagens foi de -200 a -800 mV, pois o par redox da GOx está localizado dentro deste intervalo. A Figura 57 mostra os voltamogramas obtidos, e no detalhe a relação entre as densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos da enzima nas diferentes velocidades de varredura.

Figura 57 - Voltametria cíclica para a amostra PEDOT-OH/GOx em PBS 0,1M em velocidades de varredura de 25 a 300 mV/s, e no detalhe relação entre as densidades de corrente dos picos catódicos e anódicos e diferentes velocidades de varredura, e linha de tendência com equação característica.



Conforme a velocidade de varredura aumenta, os picos anódicos e catódicos da enzima tem um acréscimo de densidade de corrente, este aumento produz uma

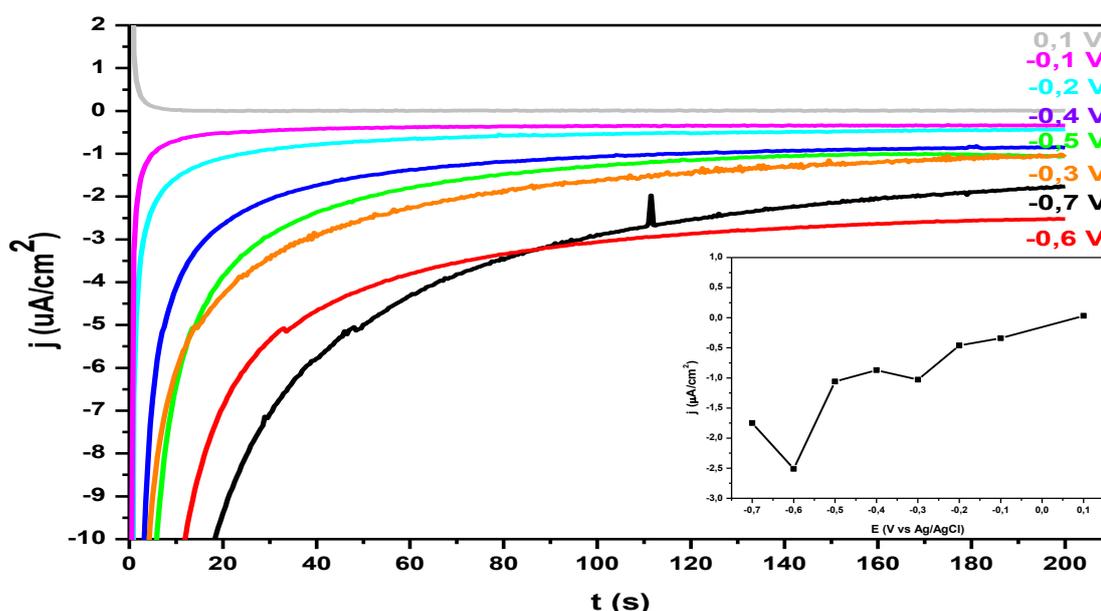
relação linear, gerando uma equação de reta, o que indica que o processo é controlado pelo transporte de massa por difusão na superfície.

Essas características eletroquímicas de uma reação enzimática controlada por um processo de superfície é o esperado devido ao tipo de imobilização realizada, o que também foi verificado por Tang; Li e Zeng (2015) e Xu et al. (2014). A enzima GOx demonstrou ter modificado a superfície do eletrodo, onde a razão entre a densidade de corrente do pico anódico e a densidade de corrente do pico catódico são praticamente constantes, indicando que a transferência de elétrons entre a GOx e o eletrodo é facilmente realizada pelo PEDOT-OH.

5.3.3.3. Cronoamperometria para definição do Potencial de Detecção de Glicose no sensor com GOx imobilizada por Adsorção

O potencial foi definido pela variação do potencial de polarização de -700 até 500 mV em uma solução de glicose 1 mM, utilizando um sensor novo para cada potencial testado, com o intuito de verificar uma mudança no comportamento da corrente de estabilização para cada potencial com a presença de glicose no meio de análise durante 200 s (Figura 58).

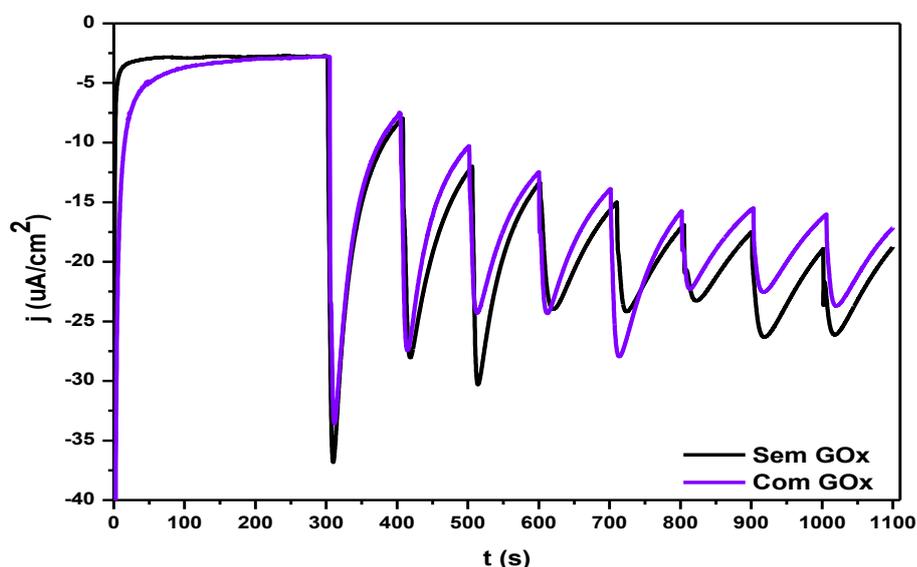
Figura 58 - Cronoamperometria para definição do potencial de detecção de glicose para o sensor construído com PEDOT-OH/GOx em PBS 0,1 M. Detalhe indica a densidade de corrente de estabilização para cada potencial verificado em 200 s.



A Figura 58 mostra que a densidade de corrente catódica em estado estacionário sofre diminuição com o alteração do potencial de -100 até -600 mV e após sofre um aumento com a alteração do potencial para -700 mV. Nos potenciais positivos, ao aumentar o potencial aplicado ocorria um acréscimo na j , como verificado nos potenciais de 100 e 200 mV, por isto os demais potenciais não foram apresentados. O potencial de -600 mV apresentou o menor valor de densidade de corrente indicando que o potencial de detecção poderia estar localizado no valor negativo. O potencial de -600 mV é superior aos potenciais encontrados para o par redox da GOx na voltametria cíclica (Figura 56).

A detecção de glicose por cronoamperometria foi confirmado com a resposta dos sensores PEDOT-OH e PEDOT-OH/GOx, no potencial de polarização de -600 mV vs Ag/AgCl em solução de PBS 0,1M com adições de alíquotas de solução de glicose 1 mM. A Figura 59 mostra as perturbações sofridas pelos sensores com as adições de glicose.

Figura 59 - Determinação do potencial de detecção de glicose para o sensor produzido com PEDOT-OH (sem GOx) e PEDOT-OH/GOx (com GOx) em -600 mV PBS 0,1 M e adições de glicose 1 mM a cada 100s.

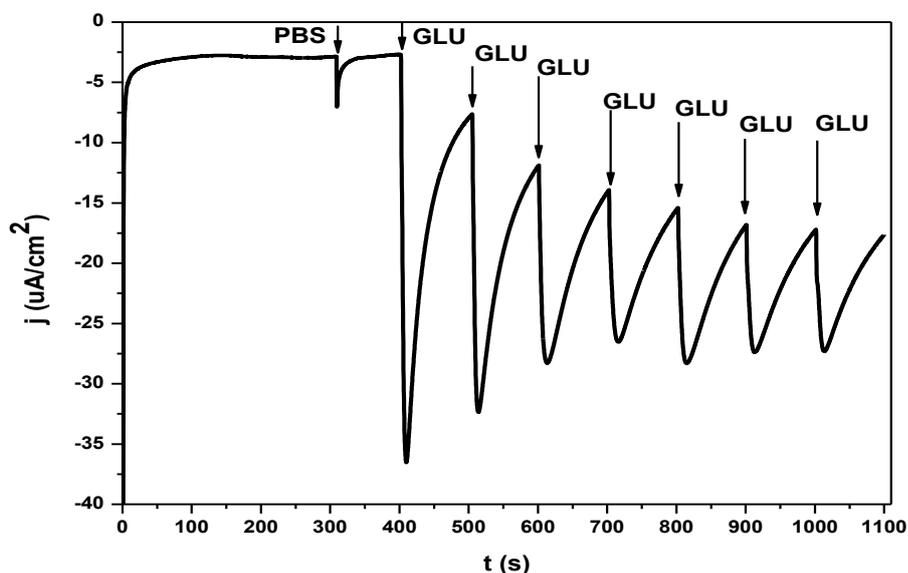


Os sensores PEDOT-OH e PEDOT-OH/GOx apresentaram comportamento semelhante para cada adição de glicose, conforme realizava uma adição de glicose no meio ambos os sensores sofriam um incremento de densidade de corrente muito

similar, indicando que o sensor sem a presença de enzima imobilizada apresenta resposta idêntica ao sensor com enzima, sendo capaz de oxidar a glicose a ácido glucônico.

Como a resposta cronoamperométrica para a injeção de glicose nos sensores foi muito semelhante, o sensor PEDOT-OH foi perturbado por uma injeção de solução PBS 0,1 M para ver se o eletrodo não detectava o mesmo (Figura 60).

Figura 60 - Cronoamperometria para detecção de PBS e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de -600 mV. Cada perturbação ocorreu na concentração de 1mM a cada 100 s.

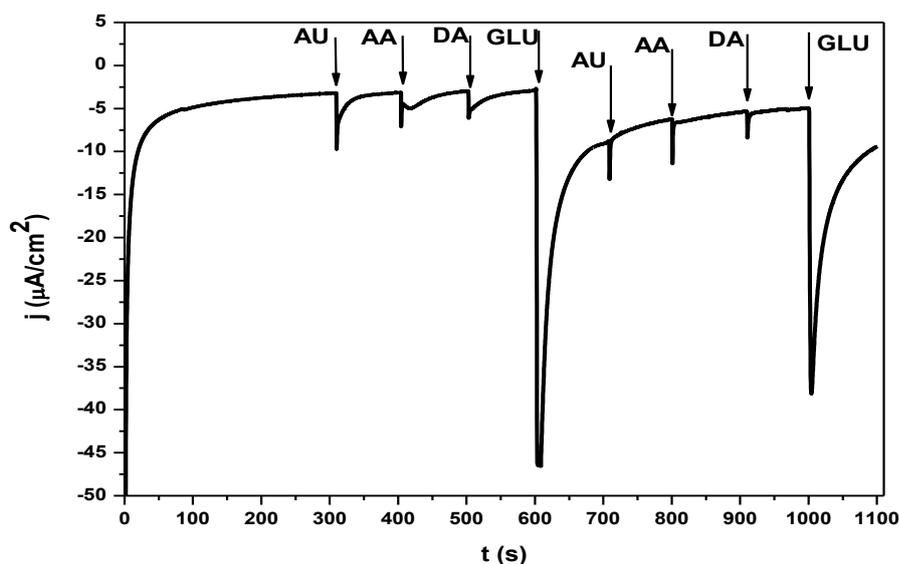


A injeção provocou uma variação na densidade de corrente, porém esta voltou a estabilizar no seu valor inicial, mostrando que as perturbações detectadas pelo sensor não foram ocasionadas pela injeção da solução tampão fosfato salino sobre o sensor. Após a adição de PBS 0,1 M foram realizadas injeções de glicose 1 mM em PBS 0,1 M, que produziram perturbações degrau da densidade de corrente.

A seletividade do sensor PEDOT-OH foi examinada mediante a injeção sucessiva de glicose e de interferentes na célula contendo PBS 0,1 M. Este estudo foi realizado para verificar se o sensor não enzimático detecta a oxidação da glicose a ácido glucônico com a presença de outras substâncias e se o sensor é seletivo frente as espécies interferentes, ácido úrico, (AU), ácido ascórbico (AA) e dopamina (DA),

as quais estão presentes em amostras biológicas, respondendo apenas as injeções de glicose (Figura 61).

Figura 61 - Cronoamperometria para detecção de interferentes, ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e glicose (GLU) em PBS 0,1 M e potencial de -600 mV. A adição de cada interferente ocorreu na concentração de 1 mM a cada 100 s.



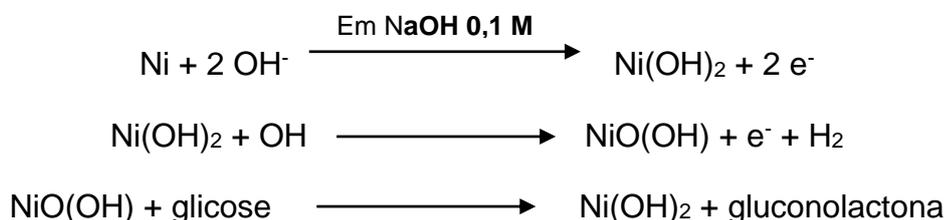
A Figura 61 mostra que AU, AA e DA não bloqueiam o sinal de glicose. As injeções de interferentes produzem uma variação no sistema, mas este retorna ao seu valor de densidade de corrente antes da perturbação, não produzindo um degrau na resposta. A injeção de glicose após a adição dos interferentes provocou uma variação significativa da densidade de corrente, não retornando ao seu valor inicial. Estes resultados indicam que o sensor PEDOT-OH pode ser utilizado com sucesso na presença destes agentes interferentes, oferecendo seletividade analítica para o sensor.

5.3.3.4. Detecção de Glicose por Cronoamperometria e Definição da Equação Característica para o Sensor PEDOT-OH

O sensor construído com PEDOT-OH sem a presença de GOx é capaz de detectar os elétrons produzidos pela reação de oxidação da glicose em cada perturbação do sistema (Figura 63). Estudos utilizam eletrocatalizadores, como metais de transição, (CHOI et al., 2014; HUI et al., 2015) para a oxidação eletroquímica direta

da glicose por sensores não enzimáticos, onde a catalise ocorre em um meio alcalino devido a capacidade de oxirredução presente nos metais. Os eletrodos recobertos com metais induzem a formação de uma camada de hidroxilas adsorvidas na superfície, ocorrendo a dehidrogenação e a reação de oxidação da glicose conforme verificado por Ismail et al. (2014). Porém a eletrooxidação direta da glicose por estes agentes catalizadores metálicos é muito lenta.

Choi et al. (2014) descreveram o processo de oxidação da glicose por eletrodos modificados com níquel (Figura 62), como agente catalisador metálico em meio alcalino, através das seguintes reações químicas:



O processo de oxidação eletrocatalítica da glicose por eletrodos modificados com níquel é baseada na formação de uma película superficial de níquel-oxi-hidróxido possuindo excelente reversibilidade e elevada atividade eletrocatalítica.

Figura 62 – Ilustração de célula eletroquímica com três eletrodos ligados a um potenciostato, e no detalhe o eletrodo de trabalho de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono recobertos com níquel, que catalisam a oxidação da glicose.

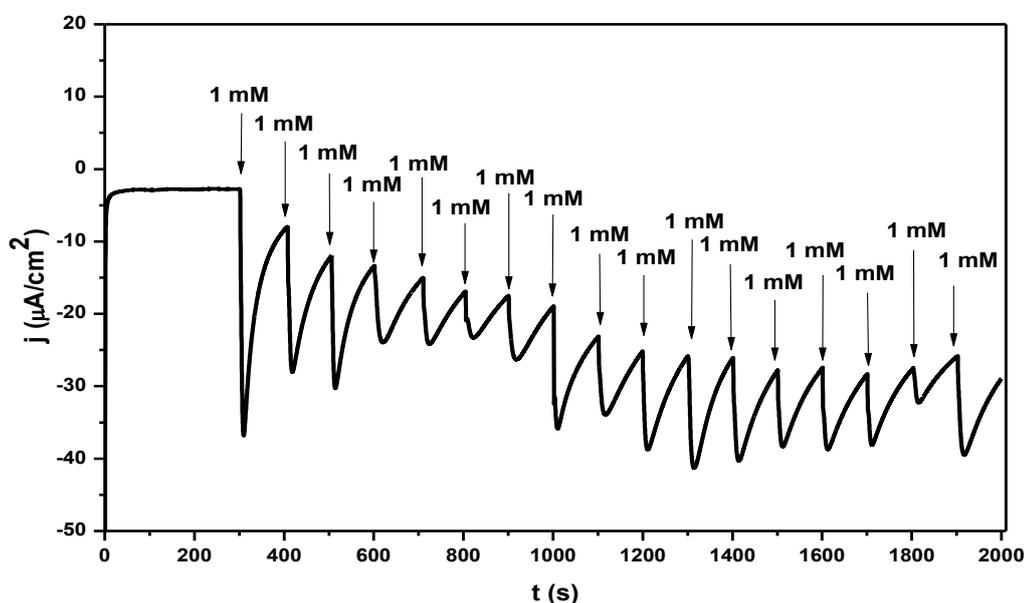


Fonte: Adaptado de Choi et al. (2014, apendice A, material suplementar).

O processo de detecção no sensor de PEDOT-OH é baseado na substituição da atividade eletrocatalítica da GOx e/ou agentes inorgânicos por grupos hidroxila exocíclicos. Os espectros de FTIR para o polímero evidenciam um desvio da vibração

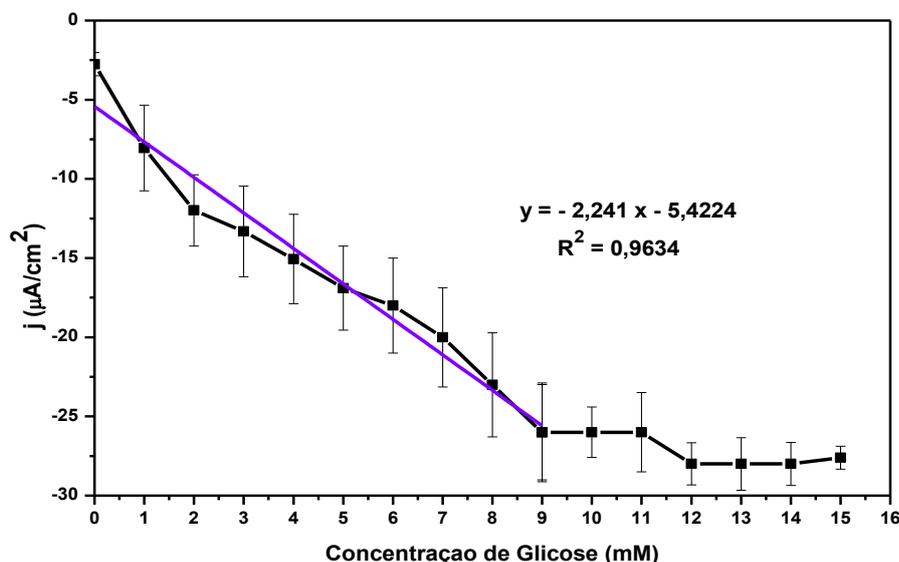
de alongamento das ligações O – H, o qual foi atribuído a uma redução das ligações de hidrogênio intermoleculares entre polímero – polímero, facilitando a acessibilidade de grupos hidroxila secundários e, por conseguinte, a sua participação na catálise da oxidação da glicose. Assim, a proximidade dos grupos hidroxila no esqueleto de politiofeno eletroativo, combinado com meios de acessibilidade, favorece a sua ativação em resposta à aplicação do potencial elétrico, induzindo a sua participação como catalisador no mecanismo de reação global oxidando a glicose.

Figura 63 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 100 s em potencial de -600 mV.



O sensor de PEDOT-OH detecta glicose sem necessitar da enzima GOx para a catálise, e as injeções de glicose no sistema produzem perturbações na densidade de corrente (Figura 63), que permitem definir a equação característica do sensor PEDOT-OH (Figura 64), apresentando a relação da densidade de corrente de pico versus concentração de glicose aplicada em oito sensores distintos realizando medidas para cada concentração.

Figura 64 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.



A Figura 64 apresenta a relação linear entre a densidade de corrente e a concentração de glicose. Esta foi estabelecida no intervalo de concentração de 1 a 9 mM, obtendo um coeficiente linear, R^2 , de 0,963, e uma sensibilidade, obtida a partir do declive do intervalo linear, de $2,241 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$. Quando a concentração é superior a 9 mM, o desvio da linearidade é 6%, indicando que as medidas não são mais ideais, presumivelmente devido a uma alteração do transporte de massa, controlando a corrente cineticamente nas concentrações superiores a 9 mM. O limite de detecção, o qual foi calculado com base na relação sinal-ruído de 3, é de 0,9 mM. Como este sensor não possui uma enzima imobilizada a constante de Michaelis-Menten não é calculada pois não existe esta interação entre enzima e substrato.

Pela equação da reta pode-se a partir de uma densidade de corrente medida determinar o valor de concentração de glicose aplicada, onde o PEDOT-OH é responsável pela oxidação da glicose e transporte de elétrons até a base do eletrodo, caracterizando o funcionamento de um sensor amperométrico não enzimático. Ao adicionar uma amostra com glicose no sensor PEDOT-OH e realizar uma leitura de densidade de corrente é possível determinar a concentração de glicose pela equação característica do biossensor, equação (7):

$$j = -2,241 C - 5,4224 \quad (7)$$

Rearranjando a equação em função da variável desconhecida, ou seja, em função da concentração de glicose, resulta a equação (8):

$$C = - \left(\frac{j + 5,4224}{2,241} \right) \quad (8)$$

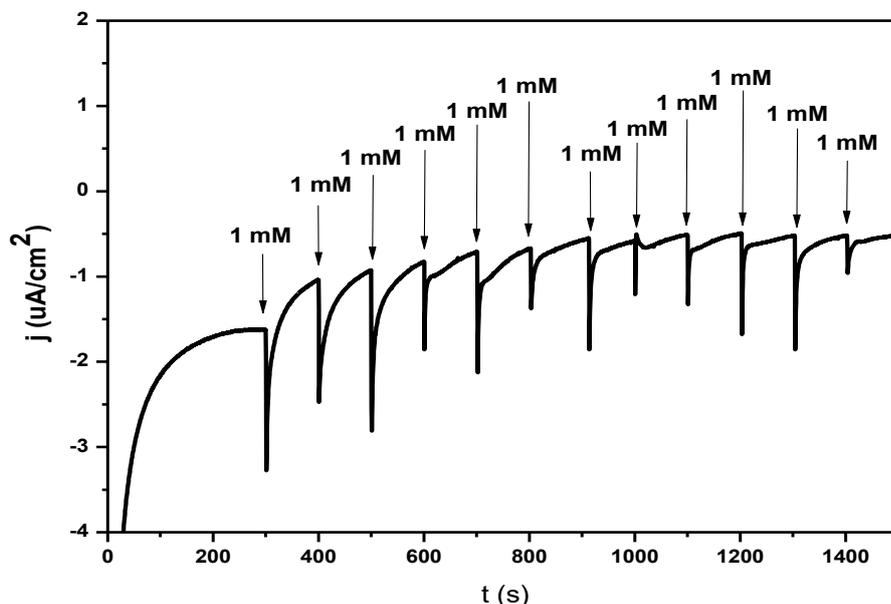
Onde: C= concentração de glicose a ser medida em mM; j= densidade de corrente elétrica produzida na detecção da glicose pela enzima em $\mu\text{A}/\text{cm}^2$.

O protótipo permite medir níveis de glicose no sangue para uma pessoa saudável e em condições patológicas nas concentrações de 2 a 9 mM de glicose que equivalem de 30 a 155 mg/dL, podendo ser utilizado por pessoas que necessitam do acompanhamento dos níveis de glicose.

Devido aos resultados apresentados pelo sensor PEDOT-OH frente a detecção de glicose sem a presença da enzima GOx imobilizada em sua superfície, caracterizando um sensor não enzimático, e a pobre sensibilidade obtida pelos sensores PEDOT-OH+GOx, conforme pode ser observado na Figura 65, a utilização da enzima GOx na construção deste sensor não é viável tanto do ponto de vista prático quanto econômico.

Os resultados obtidos para o sensor PEDOT-OH+GOx para a detecção de glicose através de cronoamperometria com as perturbações ocasionadas por adições de glicose 1 mM em PBS 0,1 M, são apresentados na Figura 65. As perturbações foram realizadas em potencial fixo de -300 mV, pois este caracterizou-se como o mais adequado para este sensor.

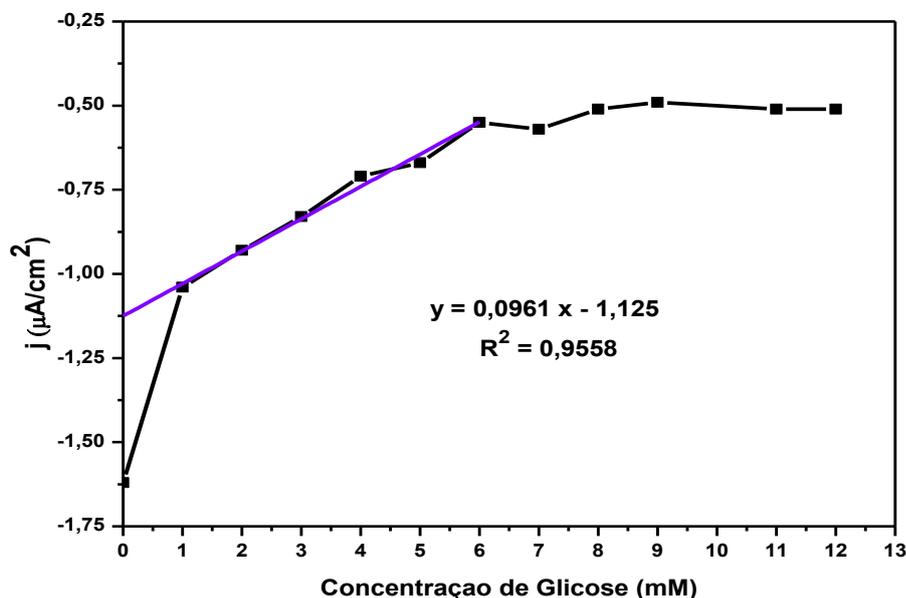
Figura 65 - Cronoamperometria para detecção de glicose em PBS 0,1 M, com adições de glicose 1 mM a cada 50 s, representadas pelas flechas pretas no sensor de PEDOT-OH+GOx.



O sensor sofre perturbações degrau seguindo um padrão de acréscimo de densidade de corrente, diminuindo o acréscimo em cada adição até que a mesma se estabiliza. Ainda percebe-se que o acréscimo não é muito significativo de uma adição para a outra, não ocorrendo uma variação significativa de valores. O biossensor, construído na configuração de síntese eletroquímica com adição de GOx na síntese para imobilização por ligações covalentes é capaz de detectar os elétrons produzidos pela reação de oxidação da glicose catalisada pela presença da GOx, porém as perturbações não são expressivas, o que pode prejudicar a sensibilidade do sensor para níveis de glicose muito semelhantes.

Pelos resultados das perturbações realizadas na análise de cronamperometria, pode ser definida a curva característica do biossensor de PEDOT-OH+GOx e a equação da reta. A Figura 66 apresenta a relação da concentração de glicose aplicado nas tiras de teste rápido e a corrente elétrica obtida através da equação da reta e o R^2 , coeficiente de relação da reta calculada.

Figura 66 - Curva e equação características para determinação de glicose. Relação entre a concentração de glicose aplicado nas tiras e a corrente obtida. Representação da equação da reta para o sensor.



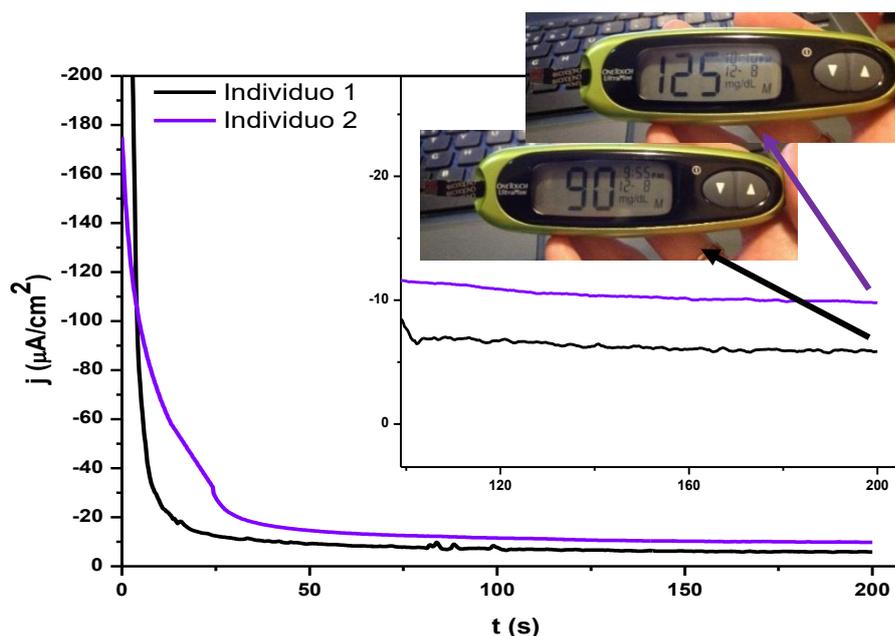
A sensibilidade do biossensor, que é de $0,0961 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ e o intervalo de linearidade que é de 1 a 6 mM de glicose. O sensor não apresenta valores de detecção satisfatórios para portadores de diabetes. Os valores de leitura de densidade de corrente para cada adição de glicose são muito próximos não representando um sensor confiável além de apresentar o valor de R^2 igual a 0,9558, indicando uma pobre linearidade podendo ser prejudicial para as medidas.

A construção do sensor PEDOT-OH+GOx não é viável tanto do ponto de vista econômico, por utilizar a GOx durante a síntese e em excesso para garantir sua imobilização, quanto do ponto de vista tecnológico, pois os resultados obtidos com as adições de glicose não foram satisfatórios.

6. TESTES PRELIMINARES COM AMOSTRAS DE SANGUE

A aplicabilidade dos sensores PEDOT-OH foi examinada considerando amostras de sangue reais extraídas a partir de cinco indivíduos diferentes, e comparado com a resposta de um sensor comercial. O sensor desenvolvido com PEDOT-OH recebeu aproximadamente três gotas de sangue em sua superfície e a análise foi realizada em potenciostato 910 PSTAT mini da Metrohm, com utilização do software PSTAT. O potencial de polarização utilizado para a análise foi de -600 mV e a medida foi realizada durante 200 s permitindo o equilíbrio da densidade de corrente (Figura 67). Os resultados, obtidos através da aplicação da curva de calibração apresentada na Figura 64 foram confrontados com resultados obtidos para a mesma amostra de sangue, analisadas pelo dispositivo de medida de glicose no sangue OneTouch UltraMini®, comercializado pela companhia Johnson&Johnson, e apresentados na Tabela 9.

Figura 67 - Detecção de glicose em duas amostras sanguíneas de dois indivíduos diferentes depositadas na superfície do sensor de PEDOT-OH em potencial de -600 mV. No detalhe são mostrados os valores para cálculo da concentração equivalente a densidade de corrente obtida e as medidas obtidas com o sensor comercial OneTouch UltraMini®.



O nível de glicose medido pelo sensor comercial One Touch UltraMini® é considerado preciso quando está dentro do intervalo de $\pm 20\%$ da medida do laboratório (JOHNSON&JOHNSON, 2015). As concentrações de glicose determinadas pelo sensores PEDOT-OH apresentaram para quatro sensores um erro inferior a 20% (Tabela 9) e um sensor apresentou um erro superior a 20% quando comparado ao sensor comercial One Touch UltraMini®, provando o desempenho do sensor baseado em PEDOT-OH quando comparado a sensores comerciais.

Tabela 9 - Comparação entre os resultados analisados através do sensor desenvolvido com PEDOT-OH e o sensor comercial OneTouch UltraMini® da empresa Jonhson & Jonhson para cinco amostras de sangue.

	Concentração de glicose através da Equação Característica (mM)	PEDOT-OH (mg/dL)	OneTouch UltraMini® (mg/dL)	Erro (%)
Indivíduo 1	5,049	90,96	90	1,07
Indivíduo 2	6,817	122,81	125	-1,75
Indivíduo 3	4,17	75,14	77	-2,41
Indivíduo 4	4,33	78,01	61	27,88
Indivíduo 5	4,40	79,33	90	11,85

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biossensores para a detecção de glicose são desenvolvidos e pesquisados exaustivamente por inúmeros centros de estudo. A Tabela 10 mostra o desempenho dos sensores desenvolvidos neste estudo em comparação a sensores reportados na literatura em relação ao intervalo linear, o limite de detecção e a sensibilidade.

Tabela 10 – Performance de diferentes sensores eletroquímicos para detecção de glicose.

Biossensor Glicose	Intervalo linear	Limite de detecção	Sensibilidade ($\mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$)	Referência
PPiAA^(a)-Au-GOx	1 – 18 mM	0,05 mM	0,42	(ŞENEL; NERGIZ, 2012)
PPi/AuNPs/GOx	2,5 μM – 5 mM	2,1 μM	15,33	(NJAGI; ANDREESCU, 2007)
NiNPs/PEDOT/RGO^(b)	1 μM – 5,1 mM	0,8 μM	36,15	(HUI et al., 2015)
GRA^(c)-PAni/CS^(d)-GOx	10 μM – 1,48 mM	2,76 μM	22,1	(FENG et al., 2015)
GRA/PEDOT:PSS/GOx	20 – 900 μM	0,3 μM	7,23	(WISITSORAAT et al., 2013)
PRGO^(e)-AuNPs/GOx	0,4 – 4 μM	0,06 μM	15,04	(SABURY; KAZEMI; SHARIF, 2015)
PPi-NiO	0,01 – 0,5 mM 1 – 20 mM	0,33 μM 5,77 μM	1094,80 62,87	(MARIMUTHU; MOHAMAD; ALIAS, 2015)
PPi/PEO	1 – 7 mM	0,53 mM	16	Este Trabalho
PEDOT/TC/GOx	1 – 14 mM	7,29 mM	0,982	Este Trabalho
PEDOT-OH	1 – 9 mM	0,9 mM	2,241	Este Trabalho

(a) – poli(pirrol ácido propílico); (b) – óxido de grafeno reduzido; (c) – grafeno, (d) – quitosana; (e) – óxido de grafeno parcialmente reduzido.

A literatura reporta o desenvolvimento de sensores através de inúmeras formas de síntese de polímeros condutores ou sem polímeros condutores, com a adição de nanoestruturas metálicas, de grafeno, óxido de grafite; com a presença ou não da enzima GOx; porém poucos grupos de pesquisa acabam produzindo um protótipo possível de ser comercializado e utilizado pela população com um baixo valor agregado.

Os protótipos desenvolvidos neste estudo buscaram atender a necessidade de desenvolvimento de um sensor possível de ser comercializado. O sensor PEDOT-OH foi desenvolvido sobre eletrodos de carbono comerciais, através de uma única etapa de produção, a síntese do polímero condutor que dura 10 s, sendo seletivo a glicose sem a adição da enzima GOx, fatores que contribuem para a diminuição do valor agregado do protótipo.

O sensor PPI/PEO não apresentou seletividade apenas a glicose, sendo capaz de detectar dopamina, ainda possui um intervalo linear que permite detectar glicose em níveis saudáveis, não estando apto a utilização para níveis patológicos. Por outro lado as etapas de produção deste protótipo são ideais para a produção em larga escala por uma unidade fabril. O suporte do sensor para aplicação do polímero condutor e imobilização da enzima são eletrodos de carbono comerciais de baixo valor agregado, a síntese do polímero condutor apesar de demorar 6 horas e mais 24 horas para purificação permite a produção de 2.500 sensores com 10 mL de polímero sintetizado, representando um ótimo rendimento.

O único sensor que não atendeu as características para ser produzido e comercializado foi o PEDOT/TC/GOx, devido a impossibilidade de aplicar o tratamento corona sobre eletrodos comerciais de carbono, exigindo o desenvolvimento sobre eletrodos de carbono vítreo. Ainda o tratamento corona foi aplicado individualmente, exigindo mais etapas de produção por sensor. Por outro lado este protótipo apresentou os melhores valores de intervalo linear, detectando glicose em níveis saudáveis e patológicos, permitindo o controle de diabetes.

Os sensores desenvolvidos neste estudo apresentam como principal vantagem a utilização de materiais simples e um número pequeno de processos, todos praticáveis e não muito complexos. Outra vantagem é o intervalo linear de detecção apresentado pelos protótipos estudados, que variam em intervalos muito próximos da

concentração de glicose no sangue humano, diferentemente do verificado em grande maioria dos sensores apresentados na Tabela 10.

8. CONCLUSÃO

Sensores para a detecção de glicose foram produzidos com polímeros condutores (PEDOT-OH) e polímeros condutores e enzima glicose oxidase (PPI/PEO/GOx e PEDOT/TC/GOx) imobilizada na superfície. Os polímeros condutores foram produzidos por síntese química e eletroquímica e a enzima foi imobilizada por adsorção.

Os três polímeros estudados e os métodos de produção dos três protótipos mostram-se favoráveis para o desenvolvimento de sensores para a detecção de glicose. O recobrimento dos eletrodos pelos polímeros condutores foi efetivo e favorável para a imobilização da enzima, porém a imobilização ocorreu apenas na superfície exterior da camada polimérica, não sendo adsorvida entre as estruturas.

O método de produção utilizado para preparar o biossensor PPI/PEO/GOx é simples e favorável para sua produção em escala, onde o PPI foi sintetizado quimicamente na presença PEO e obtenção de uma dispersão em água, permitindo sua preparação por *casting*. A configuração do biossensor pela aplicação de uma camada de PPI/PEO e após uma camada de GOx foi favorável para a detecção de glicose nas concentrações de 1 a 7 mM, com sensibilidade de $16 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, permitindo a detecção de níveis de glicose em pessoas saudáveis. O biossensor detectou além de glicose, dopamina, o que caracteriza um limitante a sua utilização.

O biossensor preparado com PEDOT por síntese eletroquímica, tratamento corona e imobilização da enzima GOx, apesar da degradação do polímero e formação de estrutura ricas em carbono, foi capaz de detectar glicose em concentrações de 1 a 14 mM a uma sensibilidade de $0,15 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, permitindo medir níveis de glicose no sangue de pessoas saudáveis e em condições patológicas. O biossensor PEDOT/TC/GOx foi específico não detectando interferentes. O tratamento corona impossibilitou o desenvolvimento deste protótipo sobre eletrodos de carbono comerciais, devido a queima de seus circuitos elétricos, permitindo a sua construção para estudos laboratoriais.

Utilizando o polímero PEDOT-OH foi possível a construção de um sensor capaz de detectar glicose sem a ajuda de agentes catalisadores enzimáticos ou inorgânicos, com desempenho comparável a sensores sofisticados; que utilizam nanopartículas de ouro, grafeno; ou sensores comerciais. A estrutura química do PEDOT-OH com propriedades aromáticas e grupos hidroxilas próximos ao anel de tiofeno promoveram a oxidação das moléculas de glicose. O sensor foi capaz de detectar concentrações de glicose de 1 a 9 mM, com sensibilidade de $2,241 \mu\text{A}/\text{mM}\cdot\text{cm}^2$, e seletividade a detecção de interferentes, o que possibilita a utilização por pessoas que necessitam do acompanhamento dos níveis de glicose no sangue. O desenvolvimento do sensor PEDOT-OH pode ser realizado sobre eletrodos de carbono comerciais, o que facilita o processo de fabricação e a obtenção de um protótipo simples, com apenas uma etapa de produção.

Os resultados alcançados com o sensor PEDOT-OH fomentam a continuação de estudos promissores quanto a detecção com amostras biológicas e o desenvolvimento de um protótipo comercial.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar testes com sangue para determinar a precisão dos resultados em diversas amostras, com diferentes níveis de glicose, e comparar os resultados obtidos para o sensor com análises realizadas em laboratórios clínicos.
- Determinar o tempo de vida útil do sensor PEDOT-OH viabilizando a sua produção.
- Estimar o custo de produção do sensor PEDOT-OH e de um dispositivo eletrônico que realize a leitura do sinal e converta em concentração de glicose.
- Estudar a aplicação do tratamento corona sobre polímeros convencionais, e testar a eletroatividade apresentada para a estrutura molecular formada após o tratamento, verificando se a mesma pode ser utilizada para a detecção de glicose.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MASHAT, L. et al. Conductometric hydrogen gas sensor based on polypyrrole nanofibers. **IEEE Sensors Journal**, v. 8, n. 4, p. 365–369, 2008.

ANSARI, R. Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies. **E-Journal of Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 186–201, 2006.

AUGUSTO, T. **Síntese química de poli(3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT): novas arquiteturas para diferentes aplicações**. Thesis—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2012.

BAGHAYERI, M. Glucose sensing by a glassy carbon electrode modified with glucose oxidase and a magnetic polymeric nanocomposite. **RSC Adv.**, v. 5, n. 24, p. 18267–18274, 2015.

BANKAR, S. B. et al. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489–501, 2009.

BAZZAOUI, E. A. et al. Resonance Raman study of polythiophene films in the doped and undoped states. Relations between spectral data and physicochemical properties. **Synthetic Metals**, v. 66, n. 3, p. 217–224, 1994.

BELAIDI, F. S. et al. PEDOT-modified integrated microelectrodes for the detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 214, p. 1–9, 2015.

BISWAS, S.; DRZAL, L. T. Multilayered Nanoarchitecture of Graphene Nanosheets and Polypyrrole Nanowires for High Performance Supercapacitor Electrodes. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 20, p. 5667–5671, 2010.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, p. 309–315, 1985.

CARRADÒ, A. et al. Influence of corona treatment an adhesion and mechanical properties in metal/polymer/metal systems. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 120, p. 3709–3715, 2011.

CASSEMIRO, S. D. M. **Síntese , caracterização e propriedades eletro-ópticas de copolímeros conjugados contendo unidades fluoreno alternadas com heterocíclicos para a confecção de dispositivos eletroluminescentes e fotovoltaicos**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3ª ed. [s.l.] Artmed Editora SA, 2006.

CHEN, W.; YAN, L.; BANGAL, P. R. Preparation of graphene by the rapid and mild thermal reduction of graphene oxide induced by microwaves. **Carbon**, v. 48, n. 4, p. 1146–1152, 2010.

CHIANG, C. K. et al. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. **Physical Review Letters**, v. 39, n. 17, p. 1098–1101, 1977.

CHOE, J. E.; AHMED, M. S.; JEON, S. Trouble Free Dopamine Sensing by Palladium Nanoparticles Fabricated Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Functionalized Graphene. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 3, p. B113–B118, 2016.

CHOI, T. et al. Synthesis of carbon nanotube-nickel nanocomposites using atomic layer deposition for high-performance non-enzymatic glucose sensing. **Biosensors & bioelectronics**, v. 63C, p. 325–330, 2014.

CUTLER, C. A.; BOUGUETTAYA, M.; REYNOLDS, J. R. PEDOT Polyelectrolyte based electrochromic films via electrostatic adsorption. **Advanced Materials**, v. 14, n. 9, p. 684–688, 2002.

D'SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, n. 1, p. 59–62, 2002.

DAS, P. et al. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 386–397, 2016.

DAVOGLIO, R. A. **Eletrossíntese, caracterização e testes de compósitos de polipirrol e poli (DMcT) sobre fibra de carbono como catodos de baterias secundárias e eletrodos de supercapacitores**. Thesis—São Paulo: UFSCar, 2009.

DE JESUS, C. G. et al. Glucose biosensor based on the highly efficient immobilization of glucose oxidase on layer-by-layer films of silsesquioxane polyelectrolyte. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 186, p. 44–51, 2013.

DE OLIVEIRA, Z. T.; DOS SANTOS, M. C. Relative stability of polarons and bipolarons in emeraldine oligomers: A quantum chemical study. **Solid State Communications**, v. 114, n. 1, p. 49–53, 2000.

DIABETES, C. A. **O que é a diabetes?** Disponível em: <<http://www.apnf.eu/nfm.htm>>. Acesso em: 9 mar. 2016.

DIABETES, F. I. **Diabetes Atlas**. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 7 jan. 2016.

DROPSENS. **Eletrodos DropSens**. Disponível em: <http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html>. Acesso em: 10 abr. 2016.

FABIANO, S. et al. Poly 3,4-ethylenedioxythiophene as an entrapment support for amperometric enzyme sensor. **Materials Science and Engineering C**, v. 21, n. 1–2, p. 61–67, 2002.

FABREGAT, G. et al. A rational design for the selective detection of dopamine using conducting polymers. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 17, p. 7850–7861, 2014.

FABRETTO, M. et al. The role of water in the synthesis and performance of vapour phase polymerised PEDOT electrochromic devices. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 7871–7878, 2009.

FAEZ, R. et al. Polímeros Condutores. **Química Nova**, v. 11, p. 13–18, 2000.

FARAH, A. A. et al. Conductivity enhancement of poly(3,4-

ethylenedioxythiophene)-poly(styrenesulfonate) films post-spincasting. **Journal of Applied Physics**, v. 112, n. 11, p. 113709, 2012.

FARLEY, J. M.; MEKA, P. Heat sealing of semicrystalline polymer films. III. Effect of corona discharge treatment of LLDPE. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 51, n. 1, p. 121–131, 1994.

FENG, J.; YAN, W.; ZHANG, L. Synthesis of polypyrrole micro/nanofibers via a self-assembly process. **Microchimica Acta**, v. 166, n. 3–4, p. 261–267, 2009.

FENG, X. et al. Development of glucose biosensors based on nanostructured graphene-conducting polyaniline composite. **Biosensors & bioelectronics**, v. 70, p. 411–7, 2015.

FERRARI, A. C.; ROBERTSON, J. Raman spectroscopy of amorphous, nanostructured, diamond-like carbon, and nanodiamond. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 362, n. 1824, p. 2477–2512, 2004.

FERRAZ, N. et al. Haemocompatibility and ion exchange capability of nanocellulose polypyrrole membranes intended for blood purification. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 73, p. 1943–1955, 2012.

FORTIER, G.; BRASSARD, E.; BÉLANGER, D. Optimization of a polypyrrole glucose oxidase biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 5, n. 6, p. 473–490, 1990.

FRANÇA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Novos compósitos de polianilina e exopolissacarídeos com aplicações em biomateriais: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, nº 1, p. 37–46, 2007.

GARREAU, S. et al. In situ spectroelectrochemical Raman studies of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDT). **Macromolecules**, v. 32, n. 20, p. 6807–6812, 1999.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345–359, 2002.

GOODSELL, D. S. **Glucose oxidase. Molecule of the month: PCSB**. Disponível em: <<http://pdb101.rcsb.org/motm/77>>. Acesso em: 2 abr. 2016.

GREENSHIELDS, M. DE W. C. C. **Sensores químicos baseados em compósitos de nanotubos de carbono**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2011.

GROENENDAAL, L. B. et al. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: Past, Present, and Future. **Advanced Materials**, v. 12, n. 7, p. 481–494, 2000.

GSI TECHNOLOGIES, L. **GSI Technologies**. Disponível em: <<http://www.gsitech.com/therapeutic-diagnostic-medical-electrode-printing-supplier/>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

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

HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, B. J. Factors regulating production of

glucose oxidase by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 6, p. 530–534, 1995.

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

HELLER, A.; FELDMAN, B. Electrochemistry in diabetes management. **Accounts of chemical research**, v. 43, n. 7, p. 963–73, 2010.

HELLMUTH, K. et al. Optimization of glucose oxidase production by *Aspergillus niger* using genetic-and process-engineering techniques. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 978–984, 1995.

HSIAO, A.-E. et al. Preparation of poly (hydroxymethyl EDOT)/nano-silver composite films by oxidative polymerization with low-baking temperature, low resistance and good adhesion on PET substrate. **Synthetic Metals**, v. 160, n. 21–22, p. 2319–2322, 2010.

HU, H.; FENG, M.; ZHAN, H. A glucose biosensor based on partially unzipped carbon nanotubes. **Talanta**, v. 141, p. 66–72, 2015.

HUANG, J. et al. Nanostructured Polyaniline Sensors. **Chemistry – A European Journal**, v. 10, n. 6, p. 1314–1319, 2004.

HUI, N. et al. Nickel nanoparticles modified conducting polymer composite of reduced graphene oxide doped poly (3 , 4-ethylenedioxythiophene) for enhanced nonenzymatic glucose sensing. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 221, p. 606–613, 2015.

HWANG, B. J. A Microscopic Gas-Sensing Model for Ethanol Sensors Based on Conductive Polymer Composites from Polypyrrole and Poly(ethylene oxide). **Journal of The Electrochemical Society**, v. 146, n. 3, p. 1231, 1999.

HYUN, K. et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase immobilized on carbon nanotube for improving glucose sensing. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 40, n. 5, p. 2–9, 2015.

ISMAIL, N. S. et al. Development of Non-enzymatic Electrochemical Glucose Sensor Based on Graphene Oxide Nanoribbon – Gold Nanoparticle Hybrid. **Electrochimica Acta**, v. 146, p. 98–105, 2014.

JOHNSON&JOHNSON. **Manual do Usuário OneTouch UltraMini**, 2015.

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.

KUO, C.-W.; WEN, T.-C. Dispersible polyaniline nanoparticles in aqueous poly(styrenesulfonic acid) via the interfacial polymerization route. **European Polymer Journal**, v. 44, n. 11, p. 3393–3401, 2008.

LANGE, U.; ROZNYATOVSKAYA, N. V.; MIRSKY, V. M. Conducting polymers in chemical sensors and arrays. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, n. 1, p. 1–26, 2008.

LAWRENCE, C. S. K.; TAN, S. N.; FLORESCA, C. Z. A “green” cellulose paper based glucose amperometric biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v.

193, p. 536–541, 2014.

LI, C.; BAI, H.; SHI, G. Conducting polymer nanomaterials: electrosynthesis and applications. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 8, p. 2397–2409, 2009.

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.

LIN, C. W.; YANG, J. Y.; HWANG, B. J. Methanol sensors based on conductive polymer composites from polypyrrole and poly(ethylene oxide)-sensing properties (I). **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 30, n. 6, p. 449–456, 1999.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, p. 79–91, 2006.

LU, X. et al. One-dimensional conducting polymer nanocomposites: Synthesis, properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 5, p. 671–712, 2011.

LU, Y. et al. Electrosynthesis and characterization of poly(hydroxy-methylated-3,4-ethylenedioxythiophene) film in aqueous micellar solution and its biosensing application. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 30, n. 6, p. 824–836, 2012.

LYUTOV, V. et al. An acoustic impedance study of PEDOT layers obtained in aqueous solution. **Electrochimica Acta**, v. 190, p. 285–293, 2016.

MACHIDA, S.; MIYATA, S.; TECHAGUMPUGH, A. Chemical synthesis of highly electrically conductive polypyrrole. **Synthetic Metals**, v. 31, p. 311–318, 1989.

MAIA, D. J. et al. Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 204–215, 2000.

MARIMUTHU, T.; MOHAMAD, S.; ALIAS, Y. Needle-like polypyrrole–NiO composite for non-enzymatic detection of glucose. **Synthetic Metals**, v. 207, p. 35–41, 2015.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: Síntese, Estrutura e Propriedades. **Química Nova**, v. 4, n. 19, p. 388–399, 1996.

MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7.2, p. 62–77, 2012.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**, v. 72, n. 2, p. 335–348, 2007.

MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

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.

MOCAK, J. et al. **A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and**

new procedures for determining the limits of detection and quantification: application to voltammetric and stripping techniques *Pure and Applied Chemistry*. [s.l.: s.n.].

MOHAMMADI, A. et al. Direct Electron Transfer of Polyphenol Oxidase on Carbon Nanotube Surfaces: Application in Biosensing. *International Journal of Electrochemical Science*, v. 4, p. 895–905, 2009.

MÜNSTEDT, H. et al. Rechargeable polypyrrole/lithium cells. *Synthetic Metals*, v. 18, p. 259–264, 1987.

NALWA, H. S. **Handbook of organic conductive molecules and polymers; Conductive Polymers: Synthesis and Electrical Properties**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997.

NARDES, A. M. et al. Conductivity, work function, and environmental stability of PEDOT:PSS thin films treated with sorbitol. *Organic Electronics: physics, materials, applications*, v. 9, n. 5, p. 727–734, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 4^a ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NEWMAN, J. D.; TURNER, A. P. F. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 20, n. 12, p. 2435–2453, 2005.

NIEN, P. C.; TUNG, T. S.; HO, K. C. Amperometric glucose biosensor based on entrapment of glucose oxidase in a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) film. *Electroanalysis*, v. 18, n. 13–14, p. 1408–1415, 2006.

NJAGI, J.; ANDREESCU, S. Stable enzyme biosensors based on chemically synthesized Au–polypyrrole nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 23, n. 2, p. 168–175, 2007.

OCAMPO, C. et al. Electrochemical synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on steel electrodes: Properties and characterization. *Journal of Polymer Research*, v. 13, n. 3, p. 193–200, 2006.

OH, S. G.; IM, S. S. Electroconductive polymer nanoparticles preparation and characterization of PANI and PEDOT nanoparticles. *Current Applied Physics*, v. 2, n. 4, p. 273–277, 2002.

PERCEC, S. et al. In situ polymerization and morphology of polypyrrole obtained in water-soluble polymer templates. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 50, n. 23, p. 4966–4976, 2012.

PHONGPHUT, A. et al. A disposable amperometric biosensor based on inkjet-printed Au/PEDOT-PSS nanocomposite for triglyceride determination. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 178, p. 501–507, 2013.

PIMENTA, M. A. et al. Studying disorder in graphite-based systems by Raman spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 9, n. 11, p. 1276–1290, 2007.

QUINTINO, M. DO S. M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (BIA) para aplicações analíticas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2003.

RADHAKRISHNAN, S. et al. Polypyrrole–poly(3,4-ethylenedioxythiophene)–Ag (PPy–PEDOT–Ag) nanocomposite films for label-free electrochemical DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 133–140, 2013.

RAJESH; AHUJA, T.; KUMAR, D. Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 136, n. 1, p. 275–286, 2009.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

RIBEIRO, C. DA C. S. **Síntese e Caracterização de Polímeros Condutores com Aplicações em Células Solares**. [s.l.] Instituto Politécnico de Bragança, 2015.

ROBERTSON, J. Diamond-like amorphous carbon. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 37, n. 4–6, p. 129–281, 2002.

SABURY, S.; KAZEMI, S. H.; SHARIF, F. Graphene-gold nanoparticle composite: application as a good scaffold for construction of glucose oxidase biosensor. **Materials Science and Engineering: C**, v. 49, p. 297–304, 2015.

SANTHOSH, P. et al. Fabrication of enzymatic glucose biosensor based on palladium nanoparticles dispersed onto poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanofibers. **Bioelectrochemistry**, v. 75, n. 1, p. 61–66, 2009.

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.

SAUNDERS, B. R.; FLEMING, R. J.; MURRAY, K. S. Recent advances in the physical and spectroscopic properties of polypyrrole films, particularly those containing transition-metal complexes as counteranions. **Chemistry of Materials**, v. 7, n. 6, p. 1082–1094, 1995.

SAVILLE, P. **Polypyrrole: Formation and Use**. Atlantic: [s.n.].

SBEM. **O que é Diabetes?** Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/o-que-e-diabetes/>>. Acesso em: 9 mar. 2016.

SCOGNAMIGLIO, V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 12–25, 2013.

SELLIN, N. **Análise da superfície de polímeros pós-tratamento corona**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2002.

ŞENEL, M.; NERGIZ, C. Novel amperometric glucose biosensor based on covalent immobilization of glucose oxidase on poly(pyrrole propylic acid)/Au nanocomposite. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 4, p. 1118–1124, 2012.

SHAN, D. et al. Colloidal laponite nanoparticles: extended application in direct electrochemistry of glucose oxidase and reagentless glucose biosensing. **Biosensors & bioelectronics**, v. 25, n. 6, p. 1427–33, 2010.

SINGH, M.; KATHUROJU, P. K.; JAMPANA, N. Polypyrrole based amperometric glucose biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n.

1, p. 430–443, 2009.

SKOOG et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição ed. São Paulo: Thomson, 2006. v. 1

SKOTHEIM, T. A. **Handbook of Conducting Polymers, Vol 1 Organic Conductors**. New York: Marcel Dekker, INC, 1986.

SOLANKI, P. R. et al. Nanostructured metal oxide-based biosensors. **NPG Asia Mater**, v. 3, p. 17–24, 2011.

SRIDHAR, V.; JEON, J.-H.; OH, I.-K. Synthesis of graphene nano-sheets using eco-friendly chemicals and microwave radiation. **Carbon**, v. 48, n. 10, p. 2953–2957, 2010.

TAMULEVIČIENĖ, A. et al. Optical properties of diamond like carbon and diamond like nanocomposite films. **physica status solidi (c)**, v. 6, n. 12, p. 2817–2819, 2009.

TANG, W.; LI, L.; ZENG, X. A glucose biosensor based on the synergistic action of nanometer-sized TiO₂ and polyaniline. **Talanta**, v. 131, p. 417–23, 2015.

TEMOÇIN, Z.; YIĞITOĞLU, M. Studies on the activity and stability of immobilized horseradish peroxidase on poly(ethylene terephthalate) grafted acrylamide fiber. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 467–474, 2009.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & bioelectronics**, v. 16, n. 5, p. 121–131, 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.

TRAN-VAN, F. et al. Fully undoped and soluble oligo(3,4-ethylenedioxythiophene)s: spectroscopic study and electrochemical characterization. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, p. 1378–1382, 2001.

VIDAL, J.-C.; GARCIA, E.; CASTILLO, J.-R. Electropolymerization of pyrrole and immobilization of glucose oxidase in a flow system: influence of the operating conditions on analytical performance. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 13, n. 3–4, p. 371–382, 1998.

WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**, p. 57–69, 2008.

WANG, Y. et al. Multifunctional carbon nanotubes for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose bioassay. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 107–111, 2011.

WEN, Y. et al. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene methanol)/ascorbate oxidase/nafion-single-walled carbon nanotubes biosensor for voltammetric detection of Vitamin C. **Chinese Journal of Polymer Science**, v. 30, n. 3, p. 460–469, 2012.

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.

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.

XIAN, Y. et al. Glucose biosensor based on Au nanoparticles-conductive polyaniline nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1996–2000, 2006.

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, 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.

YANG, C.; LIU, P. Water-dispersed polypyrrole nanoparticles via chemical oxidative polymerization in the presence of a functional polyanion. **Reactive and Functional Polymers**, v. 70, n. 10, p. 726–731, 2010.

YANG, Z. et al. Nanoflake-like SnS₂ matrix for glucose biosensing based on direct electrochemistry of glucose oxidase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 11, p. 4337–4341, 2011.

YEŞİLOĞLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2155–2159, 2005.

YOO, E.-H.; LEE, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. **Sensors**, v. 10, n. 5, p. 4558–4576, 2010.

ZHANG, D.; SUN, Q.; WADSWORTH, L. C. Mechanism of corona treatment on polyolefin films. **Polymer Engineering & Science**, v. 38, n. 6, p. 965–970, 1998.

ZHANG, Z. et al. Protein adsorption materials of the soluble conducting polymer poly(acryloyl chloride)-g-polypyrrole. **New Journal of Chemistry**, v. 34, p. 2822, 2010.