

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais - POSMAT

Daniela Branco Tavares Mascagni

Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido.

SOROCABA

2017

Daniela Branco Tavares Mascagni

Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido.

Tese apresentada como requisito à obtenção de título de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração Ciência e Engenharia de Interfaces, sob a orientação da Profa. Dra. Marystela Ferreira.

SOROCABA

2017

Mascagni, Daniela Branco Tavares.

Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido / Daniela Branco Tavares Mascagni, 2017
131 f. : il.

Orientador: Marystela Ferreira


Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017

1. Layer-by-Layer. 2. Langmuir Blodgett. 3. Biossensores eletroquímicos. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIELA BRANCO TAVARES MASCAGNI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

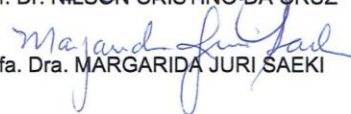
Aos 24 dias do mês de abril do ano de 2017, às 13:30 horas, no(a) UFSCar - Câmpus de Sorocaba, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA - Orientador(a) do(a) Campus Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. THIAGO REGIS LONGO CESAR DA PAIXÃO do(a) INSTITUTO DE QUÍMICA / UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Profa. Dra. LAURA OLIVEIRA PÉRES PHILADELPHI do(a) Ciências Exatas e da Terra / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ do(a) ICT / UNESP/SOROCABA, Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de DANIELA BRANCO TAVARES MASCAGNI, intitulada **Biossensores de glicose baseado na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Profa. Dra. MARYSTELA FERREIRA


Prof. Dr. THIAGO REGIS LONGO CESAR DA PAIXÃO


Profa. Dra. LAURA OLIVEIRA PÉRES PHILADELPHI


Prof. Dr. NILSON CRISTINO DA CRUZ


Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI

Ao meu grande amor,
José Carlos Mascagni Junior

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Profa. Dra. Marystela Ferreira pela confiança, amizade, paciência, aprendizado e principalmente pela valiosa orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz da UNESP-Sorocaba pelo aprendizado, discussões e colaboração nas análises de DRX. Ao Prof. Dr Osvaldo Novaes de Oliveira Junior do Instituto de Física de São Carlos (IFSC), USP, pela correção do artigo. Ao grupo de Polímeros “Benhard Gross” pelas análises de FTIR.

Ao prof. Dr Antônio Riul Junior, ao prof. Dr. Sandro Donnini Mancini, à Profa. Dra. Elidiane Cipriane Rangel e ao Dr. José Roberto Ribeiro Bortoleto pelo aprendizado.

À UFSCar-Sorocaba, em especial aos professores Dra. Elisabete Alves Pereira, Dr. Francisco Trivinho Strixino e Dr. Fabio Leite. A Dra Janaína Soares Santos.

Aos meus amigos de laboratório pelo aprendizado diário e pela amizade. Em especial para a Paula por toda paciência e parceria, Michelle, Eduardo, Ane, Ju Graça, Celina, Aline, Daiane, Tamyres, Jéssica, Natália, Jaqueline, Jamilie, Gustavo, Anna Flávia, Thaís, Douglas, Lucas e Letícia. À todas as meninas do grupo do Prof. Dr. Fabio Leite (não vou correr o risco de esquecer um nome). Obrigada pelas risadas, principalmente nos momentos difíceis.

Aos amigos de laboratório da UNESP-Sorocaba, em especial ao Rafael Parra pela ajuda com o DRX.

Aos meus filhos por todo amor, pela compreensão nas ausências e carinho: ao Pietro por sentir (na maior plenitude da palavra) e por me ensinar a compreender o seu mundo, o seu amor. Ao Mateus por ser quem é, amor transbordado e por toda a ajuda diária. À Nina por seu amor incondicional. A mamãe ama vocês com o maior amor do mundo!

Ao meu grande amor: José Carlos Mascagni Junior (Ju) pelo amor diário, companheirismo, parceria, carinho mesmo quando estou brava, dedicação à família, superação (olha que não foram poucas), suporte nos momentos mais difíceis, compreensão das ausências ou da “presença ausente”, enfim por tudo. Eu amo ser mimada por você!

Às minhas afilhadas Elis e Alice. Eu sei que a ausência física foi grande, mas as duas estão sempre presente no meu coração. A dinda ama vocês!

À minha mãe, por sempre acreditar em mim, pelo amor e por se fazer presente na minha vida. Espero um dia poder te encontrar novamente! Ao meu pai, por permitir a minha evolução, por me ensinar as diferentes formas do amor.

Aos meus irmãos e suas famílias pelo amor e carinho: ao Ro e Rafa, por me aturar, pela alegria, incentivo e presença, principalmente nos momentos difíceis. À Vanessa e à Kharyn,

pela alegria, presença, paciência, principalmente com os meus irmãos. Aos meus sobrinhos: Elis, Lucas, Clara e Laura por toda a alegria nos encontros. Eu amo vocês!

À minha tia Constância pelo amor, carinho materno e incentivo. À Gabi pelo amor e incentivo. À Dri, ao Dé, André Jr, Cezar e Zeca pelo amor e compreensão. À minha madrinha Madalena pelo amor. À toda grande família pelo carinho.

À Vivi pelo amor, carinho, amizade e compreensão. À Júlia pelo amor, carinho e amizade. À Malu pelo amor, carinho, apoio e aprendizado. À Márcia pela ajuda. À Tania por toda ajuda.

Aos meus alunos pelo carinho, atenção, dedicação, questionamentos e compreensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, POSMAT, UNESP.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos biossensores eletroquímicos enzimáticos fabricados com óxido de grafeno reduzido (rGO) e funcionalizado depositados pelas técnicas LbL (Layer-by-Layer) e Langmuir-Blodgett (LB) para a detecção de glicose. Para isso, primeiramente foi sintetizado quimicamente o óxido de grafeno (GO) pela oxidação do grafite, em seguida, o GO foi reduzido para aumentar a sua condutividade elétrica e foi funcionalizado em meio estabilizante contendo cloridrato de poli(dialildimetilamônio), formando o GPDDA, ou poli(4-estireno sulfônico) PSS, formando GPSS. Com isso, foi possível formar dispersões aquosas estáveis das nanofolhas de grafeno, essencial para a fabricação de filmes LbL. Em um primeiro momento, foram fabricados biossensores com filmes LbL contendo GPDDA, GPSS e a enzima glucose oxidase (Gox). O desempenho desses biossensores na detecção de glicose foi avaliado em função do número de bicamadas contendo Gox. O melhor desempenho na detecção de glicose foi apresentado pelo biossensor com o filme LbL com a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GPSS)₂. Este biossensor apresentou limite de detecção de 13,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sensibilidade 2,47 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ e faixa analítica entre 0,04 e 0,95 mmol.L^{-1} . Este biossensor foi eficiente na detecção de glicose na presença de interferentes comumente encontrados em fluidos corporais, alimentos e fármacos. Quando avaliado na detecção de glicose em amostras reais, recuperou 100,8% para uma solução eletrolítica comercial e 88,8% para leite sem lactose. Em um segundo momento, foram fabricados biossensores a partir de filmes LB contendo os mesmos materiais utilizados para fabricar os biossensores com filmes LbL (GPDDA, GPSS e Gox), com a finalidade de comparar os dois métodos de fabricação de filmes no desempenho dos biossensores. O desempenho dos biossensores fabricados com filmes LB foi avaliado em relação à quantidade de monocamadas (GPDDA/GPSS/Gox) depositadas. O melhor desempenho na detecção de glicose entre os biossensores com filme LB foi apresentado pelo biossensor de arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox)₃. Este biossensor apresentou limite de detecção 0,54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sensibilidade de 8,69 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ e faixa analítica entre 0,0018 e 1,5 mmol.L^{-1} . Também se mostrou eficiente na detecção de glicose na presença de interferentes e na detecção de glicose em amostra real, com recuperação de 101,2 % para o leite sem lactose. A partir dos resultados de desempenho dos biossensores com filme LbL e LB foi possível concluir que a técnica LB promoveu uma maior sinergia entre os nanomateriais, atribuída ao maior ordenamento dos nanomateriais proporcionado pela técnica LB.

ABSTRACT

In this work, enzymatic electrochemical biosensors fabricated with reduced graphene oxide (rGO) and functionalized deposited by the LbL (Layer-by-Layer) and Langmuir-Blodgett (LB) techniques were developed for the detection of glucose. Firstly, to get this, graphene oxide (GO) was chemically synthesized by the oxidation of graphite and after GO was reduced to increase its electrical conductivity and it was functionalized in stabilizing medium containing the poly (diallyl dimethyl ammonium chloride) PDDA, forming the GPDDA, or poly (4-styrene sulphonic) PSS, forming GPSS. Hence, stable aqueous dispersions of graphene nanosheets were formed, essential for the fabrication of LbL films. In a first moment, biosensors with LbL films containing GPDDA, GPSS and the enzyme glucose oxidase (Gox) were fabricated. The performance of these biosensors in the detection of glucose was evaluated as a function of the number of bilayers containing Gox. The best performance in the detection of glucose was presented by the biosensor with the LbL film with the architecture (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GPSS)₂. It presented a detection limit of 13.4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sensitivity 2.47 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ and analytical range between 0.04 and 0.95 mmol.L^{-1} . This biosensor was efficient in detecting glucose in the presence of interferents commonly found in body fluids, foods and drugs. When evaluated in the detection of glucose in real samples, it recovered 100.8% for a commercial electrolytic solution and 88.8% for lactose-free milk. In a second moment, biosensors were fabricated from LB films containing the same materials used to fabricate the biosensors with LbL films (GPDDA, GPSS and Gox), in order to compare the two methods of films deposition in the performance of the biosensors. The performance of biosensors fabricated with LB films was evaluated in relation to the amount of deposited monolayers (GPDDA/GPSS/Gox). The best performance on the detection of glucose among LB film biosensors was presented by the architecture biosensor (GPDDA/GPSS/Gox)₃. The detection limit was 0.54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sensitivity of 8.69 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ and analytical range between 0.0018 and 1.5 mmol.L^{-1} . This biosensor was also efficient in the detection of glucose in the presence of interferents and in the detection of glucose in a real sample, with a recovery of 101.2% for lactose-free milk. A conclusion derived from the performance results of the biosensors with LbL and LB films, may support that LB technique promoted a greater synergy among the nanomaterials, attributed to the best arrangement of nanomaterials provided by LB technique.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.1: Ilustração do processo de formação de uma bicamada por LbL.....	26
Figura 1.2.1: Ilustração de uma Cuba de Langmuir-Blodgett.	27
Figura 1.2.2: Isoterma da pressão de superfície em função da área ocupada por uma molécula anfifílica.	28
Figura 1.2.3: Ilustração os tipos de filme LB X, Y e Z.	30
Figura 1.3.1: Esquema ilustrativo de um biossensor.	31
Figura 1.4.1: Ilustração da estrutura de fitas da Gox obtida do fungo <i>Aspergillus niger</i>	34
Figura 1.5.1: (a) Representação da estrutura do grafite. (b) Representação da estrutura do grafeno, nanotubo e fulereno.	35
Figura 1.6.1: Esquema ilustrativo de uma célula eletroquímica de três eletrodos.	37
Figura 1.6.2: (a) Potencial em função do tempo. (b) Voltamograma cíclico. No voltamograma, corrente de pico anódico (I_{pa}) e corrente de pico catódico (I_{pc}).	38
Figura 1.6.3: Voltamograma ilustrativo das correntes faradaica (I_f) e capacitiva (I_c).....	39
Figura 1.6.4: Resposta amperométrica anódica da detecção de um analito.	41
Figura 2.2.1: Fluxograma da síntese do óxido de grafite.	46
Figura 2.2.2: Fluxograma da síntese do GPSS.	47
Figura 2.2.3: Ilustração da estrutura química do PSS.....	48
Figura 2.2.4: Fluxograma da síntese do GPDDA.	49
Figura 2.2.5: Ilustração da estrutura química do PDDA.	50
Figura 2.3.1: Difractogramas de raio-X do pó do grafite, GO, GPSS e GPDDA sintetizados quimicamente.....	50

Figura 2.3.2: Espectros UV-Vis das soluções de PDDA e PSS e das sínteses de GO, GPDDA e GPSS dispersas em tampão fosfato pH = 6,3.	52
Figura 2.3.3: Espectros FTIR do PDDA e PSS puro e das sínteses de GO, GPDDA e GPSS obtidos em pastilhas de KBr.	53
Figura 2.4.1: Espectro de absorção UV-Vis da Gox em solução tampão pH = 6,3.	55
Figura 2.4.2: Espectro FTIR de um filme <i>cast</i> da Gox.....	56
Figura 3.3.1: Ilustração do procedimento para a formação dos filmes LbL.....	60
Figura 3.4.1: Absorção em UV-Vis de cada bicamada de (PDDA/GPSS) depositada em diferentes tempos de adsorção do GPSS.	62
Figura 3.4.2: Absorção em UV-Vis de cada bicamada UV-Vis de cada bicamada de (GPDDA/GPSS) depositada em diferentes tempos de adsorção do GPDDA.	63
Figura 3.4.3: Absorção em UV-Vis de cada bicamada UV-Vis de cada bicamada de (GPDDA/Gox) depositada em diferentes tempos de adsorção do Gox.....	64
Figura 3.4.4: Espectros UV-Vis das bicamadas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₁₀ . Inserido: crescimento da absorção das bicamadas no λ da principal banda da Gox (280 nm).	65
Figura 3.4.5: Espectros de FTIR dos filmes LbL com arquiteturas (GPDDA/Gox) ₁₀ , (GPDDA/GPSS) ₅ /(GPDDA/Gox) ₅ , (GPDDA/GPSS) ₁₀ e de um filme <i>cast</i> da Gox depositados em substratos de silício puro.....	67
Figura 3.4.6: Espectro CD da Gox livre em solução tampão pH = 6,3 (curva em preto) e do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₁₀ (curva em vermelho). Inserido: espectro CD amplificado do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₁₀	68
Figura 3.4.7: Espectros SPR para o sensor de ouro a cada camada depositada do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂ excitada pelo laser com (a) comprimento de onda (λ) = 670 nm e (b) λ = 785 nm, ambas medidas realizadas no ar.	69
Figura 3.4.8: Representação esquemática de um instrumento típico de SPR.....	70

- Figura 3.4.9: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GoX)₁ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose (curvas em marrom). Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre 0,3 e 1,1 mmol.L⁻¹ e E = -0,38 V vs. ECS. 71
- Figura 3.4.10: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GoX)₂ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de glicose (curvas em azul). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre 0,2 e 2,9 mmol.L⁻¹ e E = -0,38 V vs. ECS. 73
- Figura 3.4.11: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GoX)₂ em diferentes velocidades de varredura (0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250, 0,275 e 0,300 V.s⁻¹) em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 10 mmol.L⁻¹, solução (1:1). Inserido: corrente de pico anódico em função da raiz da velocidade de varredura. 74
- Figura 3.4.12: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GoX)₂ depositado sobre ITO, medida realizada em -0,3 V vs. ECS com sucessivas adições de glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear entre 0,1 e 1,0 mmol.L⁻¹. 75
- Figura 3.4.13: Voltamogramas dos filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOX)₂, (GPDDA/GPSS/GPDDA), (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOX)₁₀. Gráfico inserido: ampliação do voltamograma do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOX)₂. Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato pH = 6,3 com saturação de N₂. 77
- Figura 3.4.14: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GoX)₂, medida realizada em -0,3 V vs. ECS com adições de 100 µL de glicose (G), ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), lactose (L), sacarose (S) e frutose (F) 20 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato (pH 6.3). 78
- Figura 3.4.15: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOX)₂ após sucessivas adições de 100 µL de (a) solução hidroeletrólítica comercial (diluída

dez vezes) e (b) leite sem lactose (diluído 10 vezes), medida realizada em tampão fosfato pH = 6,3, em -0,3 V vs. ECS.	79
Figura 3.4.16: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₅ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de 100 µL glicose 20 mmol.L ⁻¹ em tampão fosfato (pH 6,3) (curvas em verde). Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre 0,3 e 2,4 mmol.L ⁻¹ , E = -0,30 V vs. ECS.....	81
Figura 3.4.17: Resposta amperométrica do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₅ depositado sobre ITO, medida realizada em -0,3 V vs ECS com sucessivas adições de 100 µL glicose 10 mmol.L ⁻¹ em tampão fosfato (pH 6.3). Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear entre 0,3 e 0,8 mmol.L ⁻¹	82
Figura 4.3.1: Fluxograma do procedimento de preparo da dispersão do GPDDA.....	86
Figura 4.3.2: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPDDA.....	88
Figura 4.3.3: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPDDA/Gox).....	88
Figura 4.3.4: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPSS.....	88
Figura 4.3.5: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPDDA/Gox).....	89
Figura 4.3.6: Fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS).....	90
Figura 4.3.7: Fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS/Gox).....	90
Figura 4.4.1: Isotermas de pressão de superfície em função da área de compressão das barreiras para as monocamadas de (a) GPDDA sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPDDA/Gox), (b) do GPSS sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPSS/Gox) e (c) do GPDDA e do GPSS sobre a solução de Gox (GPDDA/GPSS/Gox). (d) Estabilidade da monocamada de (GPDDA/GPSS/Gox) em uma pressão de superfície de 20 mN.m ⁻¹ em função do tempo.....	93

Figura 4.4.2: Espectros FTIR dos filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) com 10 monocamadas, (GPDDA/GPSS) com 120 monocamadas e de um filme <i>cast</i> da Gox.	95
Figura 4.4.3: Espectros Raman dos filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) com 10 monocamadas, (GPDDA/GPSS) com 120 monocamadas e de um filme <i>cast</i> de GO.	97
Figura 4.4.4: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em marrom). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,3 e 1,1 mmol.L ⁻¹ no E = -0,38 V vs. ECS.	98
Figura 4.4.5: Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) depositado sobre ITO, medida em potencial de -0,3 V vs. ECS, em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear de trabalho entre 0,13 e 0,48 mmol.L ⁻¹	99
Figura 4.4.6: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em azul). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,12 e 0,61 mmol.L ⁻¹ , E = -0,38 V vs. ECS.	101
Figura 4.4.7: Voltamogramas do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ em diferentes velocidades de varredura (0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250, 0,275 e 0,300 V.s ⁻¹) em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 contendo Fe(CN) ₆ ³⁻ /Fe(CN) ₆ ⁴⁻ 10 mmol.L ⁻¹ , solução (1:1). Gráfico inserido: corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	102
Figura 4.4.8: (a) Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ depositado sobre ITO, medida realizada em potencial de -0,3 V vs. ECS, em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 e sucessivas adições glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. (b) Curva analítica com faixa linear de trabalho entre 0,0018 e 1,5 mmol.L ⁻¹	103

Figura 4.4.9: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3, na presença de oxigênio e com saturação de N ₂	105
Figura 4.4.10: Resposta amperométrica do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ , medida realizada em -0,3 V vs. ECS com adições 100 μL de glicose, sacarose, frutose, lactose, ácido ascórbico e ácido úrico 10 mmol.L ⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3.....	105
Figura 4.4.11: Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ após sucessivas adições de 100 μL de leite sem lactose diluído em tampão (1:10), medida realizada em tampão fosfato pH = 6,3, em -0,3 V vs. ECS.	106
Figura 4.4.12: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₅ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em verde). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,13 e 0,60 mmol.L ⁻¹ , E = -0,38 V vs. ECS.....	107
Figura 4.4.13: (a) Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₅ depositado sobre ITO, medida realizada em potencial de -0,3 V vs. ECS, em tampão fosfato 10 mmol.L ⁻¹ e pH 6,3 e sucessivas adições glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L ⁻¹ na concentração de glicose. (b) Curva analítica com faixa linear de trabalho entre 0,0078 e 1,28 mmol.L ⁻¹	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.3.1: Atribuições das principais bandas FTIR do GO, GPDDA e GPSS obtidas em pastilhas de KBr.....	54
Tabela 2.4.1: Atribuições das principais bandas FTIR da Gox obtidas em filme <i>cast</i>	56
Tabela 3.4.1: Ângulos de reflexão do espectro SPR a cada camada depositada e espessura de cada camada do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx) ₂	70
Tabela 3.4.2: Comparação do desempenho analítico do biossensor ITO/(GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂ com outros similares da literatura.	76
Tabela 3.4.3: Quantidade de glicose nas amostras reais especificada pelo fabricante e o desempenho do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂ na análise de amostras reais.....	80
Tabela 3.5.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica dos biossensores amperométricos com filmes LbL.....	83
Tabela 4.4.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica do biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂ e para o biossensor com filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃	104
Tabela 4.5.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica dos biossensores amperométricos com filmes LB.	109

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- A_L – área da monocamada removida para o substrato
- A_S – área do substrato imerso na subfase
- CD – dicroísmo circular
- CVD – (do inglês, *Chemical Vapor Deposition*)
- DNA – (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
- DET – (do inglês, *direct electron transfer*)
- ECS – eletrodo de calomelano saturado
- E_{pa} – potencial de pico anódico
- E_{pc} – potencial de pico catódico
- FAD – flavina adenina dicuclotídeo
- FADH₂ – forma reduzida do FAD
- FTIR – (do inglês, *Fourier Transform Infrared*)
- GPDDA – óxido de grafeno reduzido e funcionalizado com PDDA
- GPSS – óxido de grafeno reduzido e funcionalizado com PSS
- GO – óxido de grafeno
- Gox – enzima glicose oxidase
- I_c – corrente capacitiva
- I_f – corrente faradaica
- I_{pa} – corrente de pico anódica
- I_{pc} – corrente de pico catódica
- ITO – (do inglês, *Indium Tin Oxide*), substrato de vidro com filme fino de óxido de estanho dopado com índio
- IUPAC – (do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
- LB – Langmuir-Blodgett
- LbL – (do inglês, *Layer-by-Layer*), técnica de deposição de filmes automontados
- PDDA – poli(cloreto de dialildimetilamônio)
- PSS – poli(4-estireno sulfônico)
- rGO – óxido de grafeno reduzido
- SPR – (do inglês, *Surface plasmon resonance*, Ressonância Plasmônica de Superfície
- TNT – trinitrotolueno
- TR – (do inglês, *Transfer Ratio*, taxa de transferência
- λ – comprimento de onda

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	17
SUMÁRIO.....	18
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	21
Motivação	21
APRESENTAÇÃO.....	23
OBJETIVO GERAL.....	24
CAPÍTULO 1: Aspectos teóricos	25
1.1 Filmes automontados	25
1.2 Filmes de Langmuir-Blodgett	26
1.3 Biossensores de Glicose.....	31
1.4 Glucose Oxidase (Gox).....	33
1.5 Grafeno	34
1.6 Métodos Eletroquímicos	36
Voltametria Cíclica	38
Amperometria.....	40
CAPÍTULO 2: Métodos de caracterização, sínteses químicas e caracterização dos materiais.	42
2.1 Métodos de caracterização.....	42
Difração de Raio X.....	42
Espectroscopia UV-Vis	42
Espectroscopia FTIR	43

Espectroscopia Raman	43
Dicroísmo Circular	43
Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)	44
Voltametria Cíclica	44
2.2 Sínteses Químicas	44
Síntese de Óxido de Grafeno (GO)	45
Síntese de óxido de grafeno reduzido e estabilizado em PSS (GPSS).....	47
Síntese de óxido de grafeno reduzido e estabilizado em PDDA (GPDDA)	48
2.3 Caracterização das Sínteses Químicas	50
2.4 Caracterização da enzima Gox	55
CAPÍTULO 3: Filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) _n	57
3.1 Introdução: revisão da literatura	57
3.2 Objetivos Específicos	58
3.3 Materiais e Métodos.....	58
Preparação da dispersão de GPDDA.....	58
Preparação da solução de Gox	59
Procedimento de limpeza dos substratos.....	59
Procedimento para a formação dos filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) _n	59
Procedimento para a caracterização dos filmes LbL por espectroscopia UV-Vis e FTIR	60
Procedimento para as análises eletroquímicas – Voltametria Cíclica e Amperometria....	60
3.4 Resultados e Discussões	61
Cinéticas de crescimento da adsorção do GPSS, GPDDA e Gox em substratos de quartzo	61
.....	61
Caracterização do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) _n	65
Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₁ –	
Voltametria Cíclica e Amperometria	71
Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂ –	
Voltametria Cíclica e Amperometria	72
Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₅ –	
Voltametria Cíclica e Amperometria	80
3.5 Conclusão Parcial dos Filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) _n	83
CAPÍTULO 4: Filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) _n	84
4.1 Introdução: revisão da literatura	84
4.2 Objetivos Específicos	85

4.3 Materiais e Métodos.....	86
Preparação da dispersão de GPDDA.....	86
Preparação da dispersão de GPSS.....	86
Preparação da solução de Gox.....	86
Procedimento de limpeza dos substratos.....	87
Procedimento para a formação dos filmes de Langmuir e deposição dos filmes LB.....	87
Caracterização dos filmes LB por espectroscopia FTIR e Raman.....	90
Procedimento para as análises eletroquímicas – Voltametria Cíclica e Amperometria....	91
4.4 Resultados e Discussões.....	91
Caracterização das monocamadas de Langmuir.....	91
Caracterização por espectroscopia FTIR.....	94
Caracterização por espectroscopia Raman.....	96
Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) – Voltametria Cíclica e Amperometria.....	98
Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₃ – Voltametria Cíclica e Amperometria.....	100
Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) ₅ – Voltametria Cíclica e Amperometria.....	107
4.5 Conclusão Parcial dos Filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) _n	109
CONCLUSÃO GERAL.....	110
TRABALHOS PRODUZIDOS.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Motivação

Diabetes é um grupo de doenças metabólicas e afeta cerca de 350 milhões de pessoas no mundo. É uma das principais causas de morte. De acordo com a federação mundial de diabetes, 4,9 milhões de pessoas morreram em 2014 devido ao diabetes (RIBET; STEMME; ROXHED, 2017). O diabetes também é responsável por elevados índices de incapacitação de pessoas por degeneração de nervos, falência dos rins e retinopatia (AMOUZADEH TABRIZI; VARKANI, 2014). Em 2004, Organização Mundial da Saúde previu que a população portadora de diabetes dobrará até 2030 (WILD et al., 2004). Sendo assim, o desenvolvimento de sensores cada vez mais rápidos, práticos e de baixo custo para o monitoramento da glicose tem recebido atenção para análises clínicas e de produtos e processos alimentícios e farmacêuticos (HSU et al., 2017). Neste sentido, utilizar métodos eletroquímicos para a quantificação da glicose se mostra muito interessante, por serem métodos rápidos, de elevada sensibilidade e baixo custo instrumental (WANG, 2006).

Biossensores eletroquímicos enzimáticos combinam a alta especificidade das enzimas com a elevada sensibilidade e seletividade dos transdutores eletroquímicos (SAPOUNTZI et al., 2017). Possibilitam o desenvolvimento de dispositivos portáteis, miniaturizados, múltiplos e integrados, como os “*lab-on-a-chip*” e os “*point-of-care*” (SYEDMORADI et al., 2017). Com o avanço no desenvolvimento da nanotecnologia, a fabricação de biossensores a partir da modificação da superfície de eletrodos com materiais nanoestruturados tem se mostrado muito eficiente, fato atribuído às propriedades únicas e intrínsecas dos nanomateriais e a habilidade em controlar a arquitetura destes materiais em nanoescala (WALCARIUS et al., 2013).

Entre os nanomateriais, o grafeno foi escolhido neste trabalho por sua enorme potencialidade na fabricação de biossensores, atribuída à sua rápida condução eletrônica (BONACCORSO et al., 2010). Além disso, por permitir a sua obtenção por síntese química em laboratório com baixo custo efetivo (ZAHARIE-BUTUCEL et al., 2017) e possibilitar a fabricação de filmes nanoestruturados eficientes na imobilização de biomoléculas, como as enzimas (GAN; ZHAO, 2015). Desta forma, este trabalho envolveu aspectos relevantes na fabricação de biossensores, desde a obtenção do nanomaterial por síntese química até a investigação de diferentes técnicas de nanoestruturação dos filmes (LbL e LB) para compor o

biossensor, e avaliar a influência destas duas técnicas no desempenho do biossensor na quantificação de glicose em amostras reais.

APRESENTAÇÃO

Este trabalho está dividido em Capítulos. No Capítulo 1 serão tratados os aspectos teóricos sobre as técnicas de deposição de filmes LbL e LB utilizadas para fabricar os biossensores e dos materiais escolhidos para a fabricação dos biossensores: grafeno e Gox. Também estão contidos neste Capítulo os aspectos teóricos dos métodos eletroquímicos utilizados neste trabalho para transdução do sinal dos biossensores.

No Capítulo 2 serão abordados os procedimentos experimentais dos métodos de caracterização dos materiais e dos filmes LbL e LB. Neste Capítulo também serão apresentadas e discutidas as caracterizações dos materiais a base de grafeno sintetizados (GPSS e GPDDA) e da Gox.

No Capítulo 3 serão tratados a parte experimental e o desenvolvimento de biossensores de glicose a partir de filmes LbL contendo GPSS, GPDDA e Gox. Será feita uma análise da influência do número de bicamadas contendo a Gox no desempenho na detecção de glicose.

No Capítulo 4 serão abordados a parte experimental e o desenvolvimento de biossensores de glicose a partir de filmes LB contendo os mesmos materiais utilizados para fabricar os biossensores formados por filmes LbL (GPDDA, GPSS e Gox), com o objetivo de comparar dois métodos de fabricação de filmes no desempenho dos biossensores. Será feita uma análise da influência do número de monocamadas (GPDDA/GPSS/Gox) no desempenho na detecção de glicose.

Uma conclusão geral dos resultados obtidos para os biossensores contendo os filmes LbL e LB será apresentada nas Considerações Finais. Por fim, serão listados os trabalhos apresentados em congressos e workshops, bem como o trabalho publicado em forma de artigo científico.

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento e avaliação de biossensores eletroquímicos para a detecção de glicose fabricados com filmes LbL e LB de GPDDA, GPSS e Gox.

Objetivos específicos:

- ✓ Caracterizar os nanomateriais obtidos por síntese química.
- ✓ Caracterizar os filmes LbL por espectroscopia UV-Vis e FTIR (do inglês, Fourier Transform Infrared), Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), Dicroísmo Circular (CD) e Voltametria Cíclica.
- ✓ Caracterizar os filmes LB por espectroscopia UV-Vis, FTIR e Raman e por Voltametria Cíclica.
- ✓ Fabricar os biossensores com os filmes LbL e LB.
- ✓ Investigar dois métodos de deposição de filmes no desempenho dos biossensores na detecção de glicose.
- ✓ Analisar o desempenho dos biossensores na detecção de glicose em função da quantidade de bicamadas contendo a Gox por LbL e monocamadas (GPDDA/GPSS/Gox) por LB.
- ✓ Avaliar o desempenho na detecção de glicose dos biossensores com filmes LbL e LB na presença de interferentes e na análise de amostras reais.

CAPÍTULO 1: Aspectos teóricos

1.1 Filmes automontados

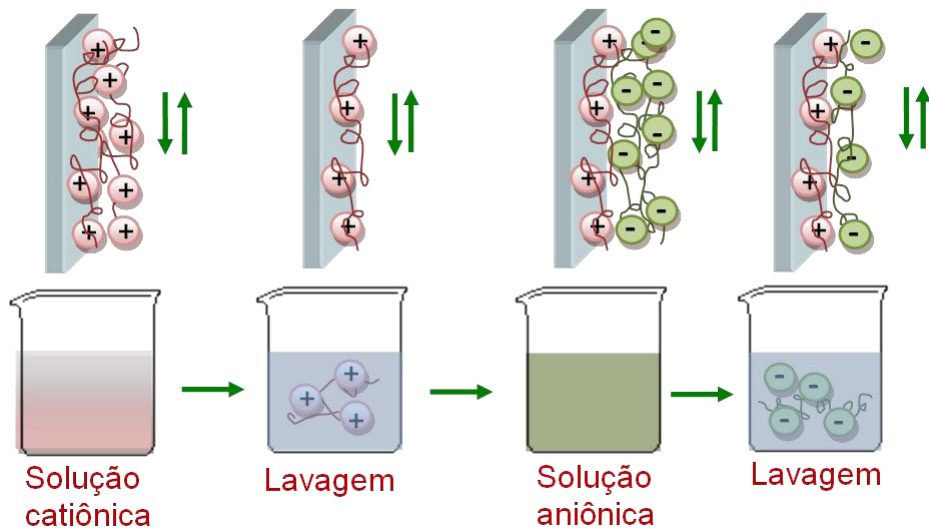
A técnica de automontagem (LbL) foi proposta por Decher e colaboradores na década de 90 (DECHER, 1997) e consiste em formar multicamadas a partir de interações eletrostáticas de polieletrólitos de cargas opostas adsorvidos sequencialmente na superfície do substrato. Brevemente, há um equilíbrio de forças provenientes de interações intermoleculares (interações de van de Waals, ligações Hidrogênio e interações eletrostáticas) de maneira a favorecer a aglomeração espontânea de material durante a nanoestruturação (HORNYAK; TIBBALS; DUTTA, 2009; DECHER; SCHLENOFF, 2012). Esta técnica permite fabricar filmes em escala nanométrica com espessura e regularidade controlada a partir da repetição dos ciclos de deposição, podendo ser aplicada em diferentes superfícies, como vidros, eletrodos metálicos, tecidos, papel, e até mesmo em frutas (DECHER; SCHLENOFF, 2012).

Experimentalmente, o processo de deposição dos filmes consiste na imersão sequencial de um substrato sólido, previamente limpo, em uma solução catiônica e/ou aniônica de interesse. Entre a imersão das soluções de interesse (catiônica/aniônica) o substrato é imerso em uma solução de lavagem com pH próximo das soluções dos polieletrólitos, para remoção do excesso de material adsorvido. A Figura 1.1.1 ilustra a formação de uma bicamada depositada pela técnica LbL. Este processo pode ser repetido quantas vezes forem necessárias para respectivas caracterizações e aplicações (DANTAS, 2009). Para uma melhor adsorção das espécies químicas de interesse, o substrato deve ficar em contato com as soluções catiônicas e aniônicas por um período de tempo pré-estabelecido (normalmente alguns minutos). Esse tempo é determinado através de estudos de cinética de crescimento dos filmes nanoestruturados (SILVA; DE SOUZA; OLIVEIRA, 2010).

LbL é uma técnica de deposição de filmes ultrafinos relativamente simples, prática e de baixo custo (DECHER; SCHLENOFF, 2012; MIYAZAKI et al., 2017), permitindo a aplicação em diversas áreas, incluindo o sensoriamento, como na fabricação de sensores de gás (SU; SHIU, 2011; LIN; LI; YANG, 2012), líquidos (AOKI et al., 2013) e com muita potencialidade para análise de combustíveis (BUENO; PAIXÃO, 2011), detecção de drogas antiterrorismo (antibióticos usados contra infecções causadas, por exemplo, pelo *Bacillus Anthracis* = antrax) (SADRIEH et al., 2005) e detecção específica de trinitrotolueno (TNT) e nitrocompostos usados em minas explosivas em $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ppm) (MATSUMOTO et al.,

2005). E em biossensores a incorporação de enzimas, proteínas, antígeno-anticorpo e DNA nas nanoestruturas do filme possibilita o reconhecimento específico de algumas espécies de interesse. Para ilustrar, a incorporação de colesterol oxidase (ChOx) para colesterol (CAI et al., 2013), imunoglobulina G (IgG) para bactéria intestinal patogênica (ZUCOLOTTO et al., 2007), DNA para ácido nucleico (SUN et al., 2016) e acetilcolinesterase para parationa (LUAN et al., 2016).

Figura 1.1.1: Ilustração do processo de formação de uma bicamada por LbL.



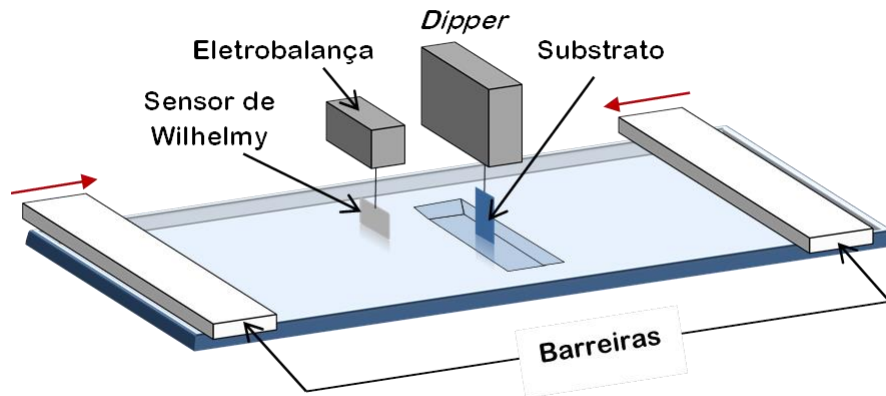
Fonte: elaborada pelo autor.

1.2 Filmes de Langmuir-Blodgett

Um filme muito fino e resistente pode ser formado quando uma gota de óleo é espalhada sobre a água. A primeira observação com caráter científico sobre este tipo de filme foi realizada por Benjamin Franklin em 1773. Ao enviar uma carta para um colega, descreveu o efeito calmante no mar quando uma fina camada de óleo é espalhada na interface ar-água. Embora Rayleigh tenha sugerido que este tipo de filme podia ter a espessura de uma única molécula, as evidências científicas da espessura molecular destes filmes foram propostas em 1917 por Irving Langmuir (PETTY, 1983). E assim foi definido que um filme de Langmuir consiste na formação de uma monocamada de um material flutuante na superfície de um líquido na interface ar-água (ROBERTS, 1984). Alguns anos depois, Katherine Blodgett

desenvolveu o método de transferência sequencial das monocamadas do filme de Langmuir para um substrato sólido, sendo assim, a técnica de fabricação é referida como Langmuir-Blodgett (ROBERTS, 1984). A Figura 1.2.1 ilustra uma Cuba de Langmuir-Blodgett.

Figura 1.2.1: Ilustração de uma Cuba de Langmuir-Blodgett.

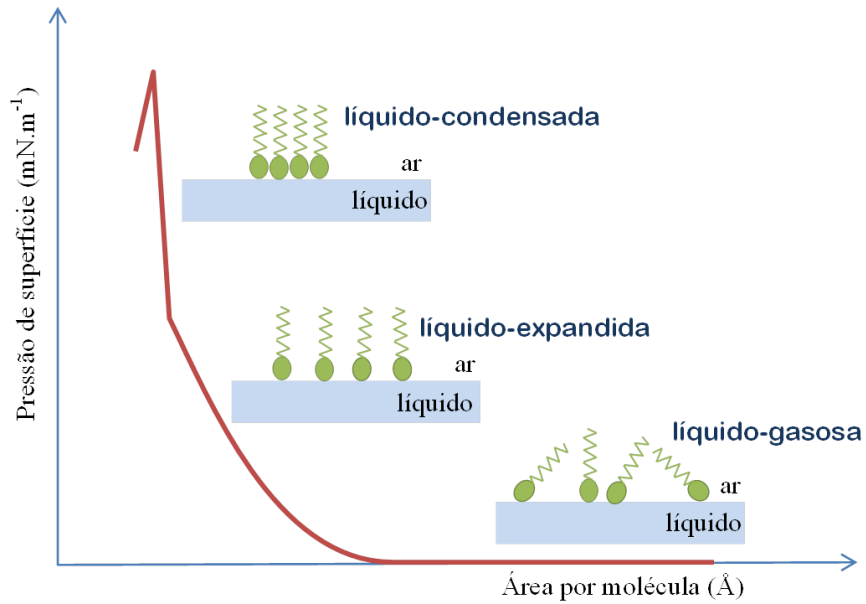


Fonte: elaborada pelo autor.

De um modo geral o equipamento para a fabricação dos filmes de Langmuir-Blodgett é composto por uma cuba retangular fabricada com material hidrofóbico, como o Teflon®, contendo um poço central mais profundo, para permitir a imersão do substrato. Sobre este poço é posicionado um *dipper*, responsável por imergir e emergir o substrato sólido no qual o filme será depositado. Nas extremidades da cuba são posicionadas duas barreiras móveis, responsáveis pela compressão das moléculas flutuante sobre o líquido contido na cuba. A pressão da superfície é monitorada por um sensor de Wilhelmy acoplado a uma eletrobalaça.

Os filmes de Langmuir clássicos são constituídos por moléculas com regiões polar (hidrofílica) e apolar (hidrofóbica), denominadas anfifílicas, como o ácido esteárico por exemplo. A parte polar da molécula de ácido esteárico é atribuída ao grupo carboxílico e a parte apolar está relacionada com os dezesseis grupos CH_2 . Este tipo de molécula quando espalhada e comprimida de forma controlada na superfície de um líquido tende a se organizar em fases bem definidas (ROBERTS, 1985). Este tipo de comportamento pode ser observado a partir de isotermas de pressão de superfície pela área média ocupada por estas moléculas. A Figura 1.2.2 apresenta uma isoterma de pressão de superfície por área média ocupada por uma molécula anfifílica.

Figura 1.2.2: Isoterma da pressão de superfície em função da área ocupada por uma molécula anfifílica.



Fonte: elaborada pelo autor.

Em um primeiro momento, ao espalhar uma pequena quantidade de uma molécula anfifílica sobre um líquido (subfase), as mesmas ficarão dispostas na superfície sem nenhum grau de organização, de modo que a interação molécula/líquido é maior do que a interação molécula/molécula, sendo assim, a pressão de superfície nesta fase é igual a zero e esta fase é denominada líquido-gasosa. Ao diminuir a área ocupada por estas moléculas pela compressão das barreiras, as moléculas começam a se organizar na superfície do líquido e um aumento na pressão de superfície é gerado pelo início da interação molécula/molécula. Esta fase é denominada líquido-expandida. Na fase líquido-condensada as moléculas assumem o grau máximo de ordenamento, após esta fase, se continuar a compressão das moléculas há um colapso no ordenamento e na isoterma é observada uma diminuição brusca da pressão de superfície, característico de desorganização. O arranjo ordenado das moléculas na superfície apresentando as três fases de ordenamento é característico de moléculas anfifílicas. Porém, quando esta técnica é utilizada para materiais mais complexos, como polímeros, estas fases nem sempre podem ser identificadas de maneira clara (BARROS, 2015). Segundo Kim, J., Cote, L. J., e Huang J. (KIM; COTE; HUANG, 2010) a técnica LB permite controlar o espaçamento entre as folhas de GO pelo monitoramento da pressão de superfície obtida pela isoterma da pressão da superfície pela área de compressão das barreiras, com isso, possibilita a fabricação de filmes com folhas interconectadas e sem sobreposição, características desejáveis para a aplicação em dispositivos eletrônicos.

Além da natureza das moléculas e dos parâmetros de deposição, como velocidade de compressão das barreiras, velocidade de imersão/emersão do substrato, outros fatores influenciam na fabricação e reprodutibilidade dos filmes LB, como o pH da subfase, estabilidade da monocamada, limpeza da cuba e do substrato e material do substrato (hidrofóbico ou hidrofílico) (PETTY, 1983).

Como os filmes LB são essencialmente ultrafinos, uma forma de monitorar a transferência do material para o substrato é pela diminuição da área ocupada pelas moléculas ao imergir e emergir o substrato, denominada taxa de transferência (TR, do inglês *transfer ratio*), dada por:

$$TR = A_L/A_S \quad (1)$$

Sendo, A_L igual à área da monocamada removida para o substrato em pressão constante e A_S igual à área do substrato imerso na subfase. Quando a TR é igual a 1, significa que toda a área imersa do substrato foi recoberta pela monocamada. Entretanto, quando o material possui pouca afinidade pelo substrato, o material pode se desprender, implicando em baixos valores de TR. Por outro lado, valores de TR maior do que 1 indica não homogeneidade microscópica do substrato.

A arquitetura do filme é dependente da interação do material entre si e com o substrato. Sendo assim, as estruturas dos filmes podem assumir três tipos, X, Y, e Z. A Figura 1.2.3 ilustra os tipos X, Y e Z das estruturas dos filmes LB.

O Tipo X é formado quando a monocamada é transferida na imersão de um substrato hidrofóbico. Já os tipos Y e Z, os substratos são hidrofílicos, sendo que para o tipo Y a monocamada é transferida durante a imersão e emersão do substrato e para o tipo Z a transferência ocorre apenas na imersão do substrato (ROBERTS, 1984).

Trabalhos na literatura reportam a fabricação de biossensores utilizando a técnica LB. A enzima malato desidrogenase foi imobilizada em um filme de Langmuir de octadecilamina e transferida para o substrato contendo ITO para detectar ácido málico por Voltametria Cíclica (GÜR et al., 2016). Um biossensor de epinefrina foi fabricado injetando DNA na subfase sobre a qual já continha o filme de Langmuir de octadecilamina. O limite de detecção de epinefrina apresentado por este biossensor foi de $0,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$, com recuperação de 103,8 % em amostras de urina de indivíduos fumantes (WANG et al., 2012a). Barbosa, C. G., Caseli L., e Péres, L. O., (BARBOSA; CASELI; PÉRES, 2016) evidenciaram a preservação da atividade catalítica da urease imobilizada em filme LB de polímeros conjugados baseados em tiofeno e fluoreno. A preservação da atividade catalítica é uma característica muito importante para o desempenho de um biossensor.

Figura 1.2.3: Ilustração os tipos de filme LB X, Y e Z.

	Tipo X	Tipo Y	Tipo Z
Sentido da transferência da monocamada para o substrato			
Estrutura do filme			

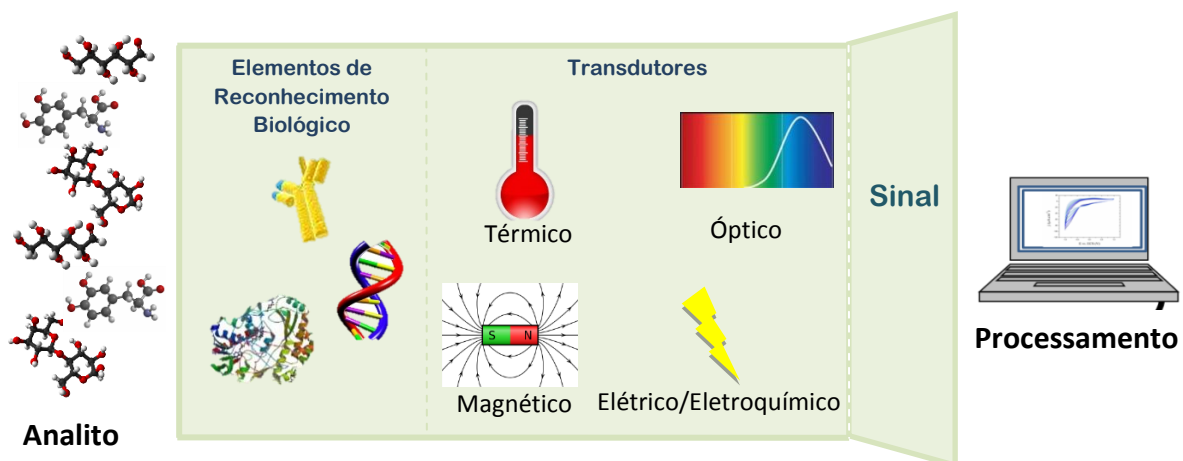
Fonte: elaborada pelo autor.

Também foi encontrado na literatura biossensores de glicose usando diferentes maneiras para imobilizar a Gox nos filmes LB. Um biossensor de glicose amperométrico e impedimétrico bifuncional foi fabricado recobrando a enzima glicose oxidase, a qual estava previamente ancorada em substrato de ouro, com um filme de LB de azul da prússia. O biossensor apresentou detecção de glicose analiticamente entre 0 e 25 mmol.L⁻¹ em ambas as técnicas de detecção (WANG et al., 2015). Outro biossensor de glicose foi reportado usando uma solução de Gox como subfase sobre a qual foi espalhado ácido esteárico ou octadecilamina. O filme LB contendo octadecilamina/Gox apresentou maior sensibilidade atribuída a maior interação da Gox com octadecilamina, quando comparado ao filme LB de ácido esteárico/Gox. Entretanto, o filme LB contendo octadecilamina/Gox apresentou maior mudança na conformação da enzima (WANG et al., 2012b). Já outro biossensor de glicose foi fabricado imobilizando a Gox pela imersão do filme LB de octadeciltrimetilamônio e azul da prússia em uma solução de Gox 1 mg.mL⁻¹. Este biossensor apresentou uma resposta amperométrica linear até 8 mmol.L⁻¹ em um potencial de 0,0 V vs. Ag/AgCl (OHNUKI et al., 2008).

1.3 Biossensores de Glicose

Segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) um sensor químico é um dispositivo capaz de transformar uma informação, originada de uma reação química ou de uma propriedade física, em um sinal analiticamente útil. Sendo denominado biossensor quando nestes dispositivos são incorporadas biomoléculas, como as enzimas (ADAM; STANISLAW; FOLKE, 1991). Basicamente, um biossensor é composto por um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, e um transdutor (por exemplo: elétrico, térmico, magnético ou óptico), responsável por converter o sinal biológico em elétrico para o processamento do sinal amplificado. Na Figura 1.3.1 é apresentado um esquema ilustrativo de um biossensor.

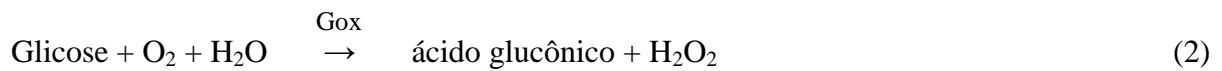
Figura 1.3.1: Esquema ilustrativo de um biossensor.



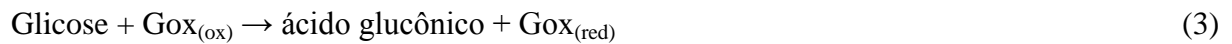
Fonte: elaborada pelo autor.

Particularmente, os transdutores eletroquímicos podem utilizar diferentes métodos para converter o sinal elétrico (HIGSON, 2009), como a voltametria de onda quadrada, a voltametria de pulso diferencial e a amperometria. Nesse trabalho foram utilizados transdutores eletroquímicos, mais especificamente o amperométrico.

O primeiro biossensor de glicose foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 (CLARK; LYONS, 1962). Para fabricar o biossensor, a Gox foi imobilizada em uma membrana de diálise diretamente sobre um eletrodo de oxigênio. A detecção de glicose foi feita pelo consumo de oxigênio na oxidação da glicose, catalisada pela enzima, conforme a reação (WANG, 2001):



Quando a Gox é imobilizada diretamente sobre o eletrodo, o biossensor é classificado como de primeira geração. Normalmente, o monitoramento de glicose neste tipo de biossensor é feito pela detecção de O_2 ou H_2O_2 e requer potenciais elevados, gerando problemas com interferentes (como o ácido ascórbico e ácido úrico) comumente presentes em amostras reais (como sangue e urina) (ZHU et al., 2012). Neste tipo de biossensor, o potencial elevado é requerido devido a Gox possuir uma estrutura tridimensional na qual o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ser centralizado e distante da extremidade da enzima (KANG et al., 2009), dificultando a transferência do elétron diretamente do cofator para o eletrodo. Para reduzir o potencial utilizado neste tipo de biossensor, torna-se necessário o uso de materiais que possibilitem uma comunicação entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo. Esta comunicação pode ser feita, por exemplo, por um mediador de elétrons, conforme a reação (ZHU et al., 2012):



sendo $\text{M}_{(\text{ox})}$ o mediador na forma oxidada e $\text{M}_{(\text{red})}$ o mediador na forma reduzida. O $\text{M}_{(\text{ox})}$ é reduzido pelos elétrons gerados na oxidação da glicose, em seguida, oxida-se transferindo esses elétrons para o eletrodo (CASH; CLARK, 2010). Nessa reação são comumente utilizados como mediadores os ferrocenos (GHICA; BRETT, 2005) e ferrocianetos (ZHU et al., 2002; FERREIRA et al., 2004; GRAÇA et al., 2014). Estes biossensores são classificados como de segunda geração.

Atualmente, com o avanço no desenvolvimento da nanotecnologia, outra forma de reduzir o potencial elétrico é imobilizar a enzima em nanomateriais, como o grafeno (KANG et al., 2009; WU et al., 2010; PALANISAMY; KARUPPIAH; CHEN, 2014; YU et al., 2014), os nanotubos de carbono (LIANG; ZHUOBIN, 2003) e nanopartículas metálicas (TELLECHEA et al., 2012). Estes nanomateriais facilitam o transporte direto dos elétrons de uma forma rápida entre o sítio ativo da enzima e o eletrodo. Desta forma, a reação envolvida na detecção da glicose é feita pela detecção dos elétrons gerados na oxidação da glicose, conforme a reação abaixo, classificando estes biossensores como de terceira geração.



sendo FAD o cofator flavina adenina dicuclotídeo presente na estrutura da enzima e FADH₂ a forma reduzida do FAD. Uma forma de avaliar a ocorrência de transferência direta de elétrons da enzima para o eletrodo é analisar o comportamento da enzima imobilizada no nanomaterial por voltametria cíclica. O voltamograma deverá apresentar os picos bem definidos de oxidação e redução da enzima na ausência de oxigênio. Entretanto, a quantidade de enzima e também do nanomaterial pode influenciar visualização na definição dos picos da enzima (MASCAGNI et al., 2016).

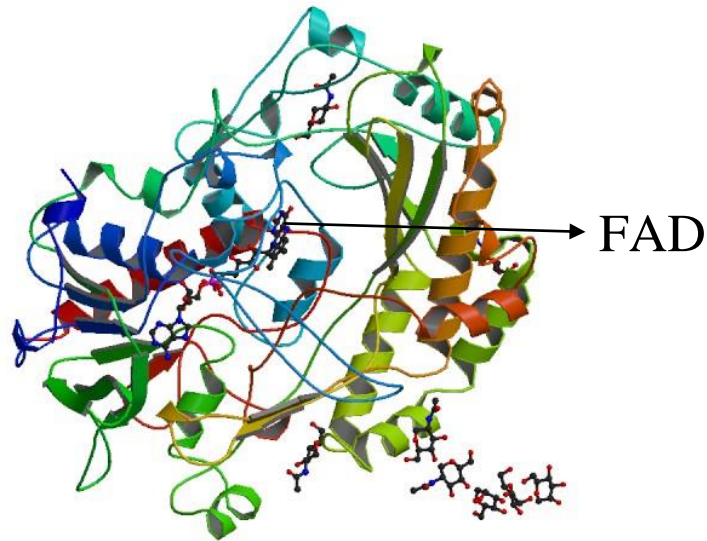
1.4 Glucose Oxidase (Gox)

Enzimas são formadas por longas cadeias poliméricas constituídas de aminoácidos (unidades monoméricas), unidos por ligações peptídicas, como nas proteínas. As ligações peptídicas são formadas quando um grupo carboxila (-COOH) de um aminoácido se liga a um grupo amina (-NH₂) de outro aminoácido, dando origem a uma amida, que se intercalam ao longo de uma cadeia polipeptídica, cuja posição relativa é responsável pela conformação da enzima. Tendo em vista que as enzimas são responsáveis por catalisar reações bioquímicas e sua atividade catalítica está relacionada diretamente com a preservação da sua conformação estrutural. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em subunidades, sua atividade catalítica é destruída (NELSON; LEHNINGER; COX, 2002).

A enzima Gox é uma flavoproteína homodimérica (HAOUZ et al., 1998), da classe das oxidoredutases, obtida principalmente da cultura do fungo *Aspergillus niger*, com massa molecular entre 130 e 175 kDa, com estrutura molecular apresentando de 11 a 13% de carboidratos (BANKAR et al., 2009). Possui ponto isoelétrico em pH 4,2 e sua atividade ótima ocorre na faixa de pH entre 3,5 e 6,5. Na Figura 1.4.1 está ilustrada a estrutura na forma de fitas da Gox.

A Gox é responsável por catalisar a reação de oxidação da β-D-glicose em D-glucono-δ-lactona e H₂O₂, usando oxigênio molecular como um aceptor de elétrons, conforme a reação (FERREIRA et al., 2004):

Figura 1.4.1: Ilustração da estrutura de fitas da Gox obtida do fungo *Aspergillus niger*.



Fonte: figura extraída e adaptada da fonte (“RCSB PDB - 1CF3: GLUCOSE OXIDASE FROM APERGILLUS NIGER Structure Summary Page”)



O monitoramento da glicose pode ser feito pela medição de H_2O_2 durante o curso da reação enzimática pelos métodos analíticos como a espectrofotometria (BANKAR et al., 2009), quimiluminescência e eletroquímica (MORAES et al., 2012). Outra forma de monitorar a oxidação da glicose pode ser feita através da detecção dos elétrons gerados na oxidação da glicose, por eletroquímica, na qual o cofator flavina adenina dicuclotídeo (FAD) recebe dois elétrons, sendo reduzido a FADH_2 , conforme a reação:

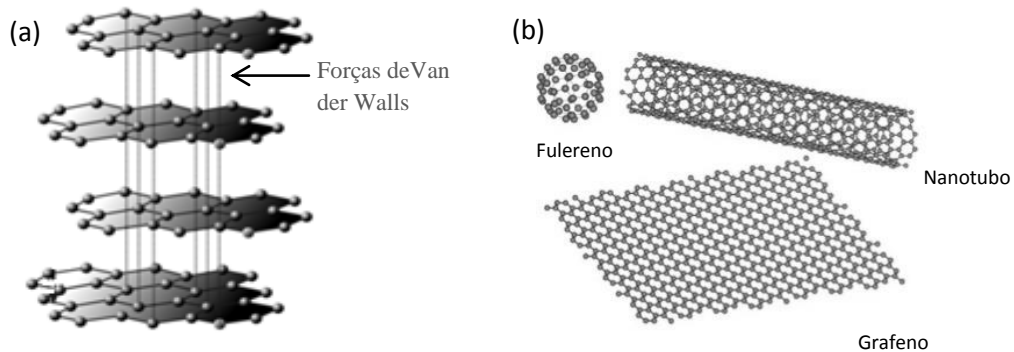


1.5 Grafeno

O grafite é constituído por átomos de carbono de hibridização sp^2 ligados entre si, formando hexágonos em repetição arranjado em uma estrutura de duas dimensões (2D) do tipo “colmeia” (WOO et al., 2012) (Figura 1.5.1a). Estas redes formam planos sobrepostos e

ligados através de forças intermoleculares fracas (van der Waals), e cada plano da estrutura do grafite (também chamado de folha), quando isolado, pode formar outros alotrópos de carbono, como o grafeno (planar), nanotubos (tubular) e fulerenos (esféricos), ilustrados na Figura 1.5.1b, com elevado potencial para desenvolvimentos tecnológicos (MEISSNER et al., 2012).

Figura 1.5.1: (a) Representação da estrutura do grafite. (b) Representação da estrutura do grafeno, nanotubo e fulereno.



Fonte: figura extraída da fonte e adaptada pelo autor (SOLDANO; MAHMOOD; DUJARDIN, 2010).

O grafeno possui propriedades eletrônicas, de transporte e estrutural singulares. Uma característica importante deste alotrópo do carbono é a elevada condutividade elétrica, atribuída a propagação dos seus elétrons pela sua estrutura 2D (BONACCORSO et al., 2010). Mais especificamente, o grafeno possui em sua estrutura de banda eletrônica determinados pontos no qual a energia de separação entre a banda de valência e a banda de condução é igual a zero (do inglês, *zero-band-gap*), chamados de pontos de Dirac (DASH; PATTANAİK; BEHERA, 2014). Uma folha simples de grafeno possui a condutividade elétrica dez vezes maior à do cobre, com seus elétrons se deslocando com velocidade próxima à da luz ($\sim 10^6$ m/s (BASU; BHATTACHARYYA, 2012)). Por apresentar resposta eletrônica muito rápida o grafeno é bastante interessante para aplicação em dispositivos eletrônicos, e como estes materiais também podem apresentar transparência óptica, (LIU et al., 2009; SIERROS et al., 2010; SOLDANO; MAHMOOD; DUJARDIN, 2010) são uma alternativa interessante em telas (BLAKE et al., 2008), células solares (WANG; ZHI; MÜLLEN, 2008), biossensores (DALMASSO; PEDANO; RIVAS, 2013; UNNIKRIŠHMAN; PALANISAMY; CHEN, 2013a) e sensores (BASU; BHATTACHARYYA, 2012; GAUTAM; JAYATISSA, 2012).

O grafeno pode ser obtido por diversas técnicas, como a esfoliação do grafite utilizando fita adesiva (BASU; BHATTACHARYYA, 2012) denominada clivagem micromecânica (AVOURIS; DIMITRAKOPOULOS, 2012) que rompe as forças

intermoleculares, separando o material em uma rede de estrutura estritamente bidimensional (o grafeno). Outra técnica utilizada para obter o grafeno é através do crescimento epitaxial por deposição química na fase vapor (CVD) (*do inglês, Chemical Vapor Deposition*) de hidrocarbonetos sobre metais catalisadores (BATZILL, 2012; ZELLER et al., 2012). Quando o hidrocarboneto é aquecido até a fase de vapor as moléculas são quebradas e reagrupadas formando o grafeno, depositado sobre o metal (por exemplo, níquel). Também é possível produzir grafeno através do aquecimento de carvão de silício (MEISSNER et al., 2012), pois em temperatura adequada favorece a sublimação do silício, conseqüentemente, os átomos de carbono vão se ligando e a superfície do substrato é recoberta, formando o grafeno. Entretanto, o grafeno é altamente hidrofóbico e forma *cluster* quando disperso em água (STANKOVICH et al., 2006). Para aumentar sua aplicabilidade, particularmente para filmes LbL, é comum que as nanofolhas de grafeno sejam funcionalizadas com estabilizantes para tornar possível a formação de dispersão aquosa.

As nanofolhas de grafeno utilizadas foram produzidas através de uma síntese química, na qual o grafite é oxidado segundo o método descrito por Hummers (HUMMERS JR; OFFEMAN, 1958a) formando o GO, posteriormente, reduzido à nanofolhas de grafeno (rGO) de duas maneiras: a) dispersas em solução aquosa contendo hidrazina e ácido poli(4-estireno sulfônico) (PSS), nomeado aqui como GPSS; com esta funcionalização as nanofolhas apresentarão carga negativa; e b) dispersa em solução aquosa contendo hidrazina e poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), nomeado aqui com GPDDA, apresentando carga positiva.

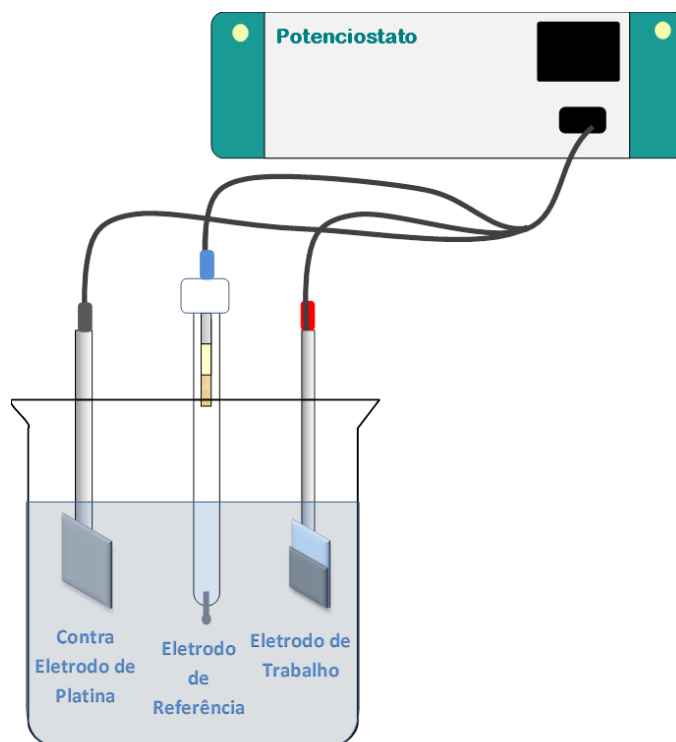
O GO apresenta grupos funcionais oxigenados ancorados na superfície da sua estrutura gráfica, como hidroxilas, grupamentos epóxi (ZHANG et al., 2013a) e carboxilas (LAYEK; NANDI, 2013). Estes grupos funcionais favorecem a dispersão do GO em água (LIU et al., 2009), não sendo necessário nenhum processo adicional para a sua aplicação em filmes LbL contendo GO.

1.6 Métodos Eletroquímicos

A eletroquímica consiste no estudo de reações químicas que envolvem transferência de elétrons em processos de oxidação e redução. É uma técnica de análise com muitas aplicações na química analítica, com aplicação no desenvolvimento de sensores e biossensores para análises biomédicas (YU et al., 2017), controle de qualidade de produtos

alimentícios (SIERRA-ROSALES; TOLEDO-NEIRA; SQUELLA, 2017) e farmacêuticos (BHAT et al., 2016) e estudos ambientais (FERANCOVÁ et al., 2016; KHADEM et al., 2016; LU et al., 2016; TAN et al., 2016). É crescente o interesse por técnicas analíticas baseadas na eletroquímica, por serem de elevada sensibilidade, rápida e de baixo custo instrumental. Basicamente, para realizar as análises analíticas é necessário um potenciostato acoplado a uma célula eletroquímica. De forma geral a célula eletroquímica é composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra eletrodo. A Figura 1.6.1 ilustra uma célula eletroquímica composta por três eletrodos. O eletrodo de trabalho é responsável por detectar os elétrons provenientes das reações de oxidação-redução. Os eletrodos de referência mais usuais são de calomelano saturado e Ag/AgCl. Este eletrodo deve manter seu potencial constante durante a medida. Para isso, é utilizado um contra-eletrodo, para assegurar a condição potenciostática. Os contra-eletrodos mais utilizados são de platina, ouro ou carbono vítreo. O potencial é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o de referência, para prevenir que a corrente gerada percorra o eletrodo de referência. O amplificador operacional do potenciostato aumenta a resistência do eletrodo de referência, por consequência a resistência do contra-eletrodo é menor e a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo (HEINZE, 1984).

Figura 1.6.1: Esquema ilustrativo de uma célula eletroquímica de três eletrodos.



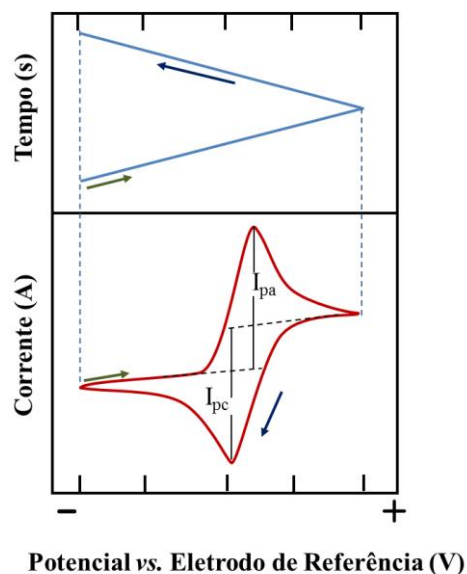
Fonte: elaborada pelo autor

Voltametria Cíclica

A Voltametria é uma técnica eletroquímica baseada na medição de corrente gerada pela aplicação de um potencial de polarização. Mais especificamente, o potencial variável é aplicado no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, esta polarização produz uma resposta na forma de corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo. O potencial elétrico é aplicado em função do tempo e pode ser variado comumente de quatro formas: rampa de potencial linear, onda quadrada, pulso diferencial e triangular (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Na Voltametria Cíclica a forma perfil de potencial com o tempo é triangular. O potencial é variado linearmente com o tempo até um potencial máximo. Quando este potencial é alcançado ocorre uma inversão do sentido da variação de potencial tendendo ao potencial inicial, formando um ciclo. Quando a varredura é feita no sentido negativo de potencial é denominada de varredura direta, como resultado é obtido uma corrente catódica, e quando a varredura é feita no sentido do potencial positivo a corrente gerada é anódica, sendo denominada de varredura reversa. A curva obtida da variação de corrente em função do potencial recebe o nome de voltamograma (PACHECO et al., 2013). A Figura 1.6.2 ilustra um voltamograma relacionado com a varredura triangular da Voltametria Cíclica.

Figura 1.6.2: (a) Potencial em função do tempo. (b) Voltamograma cíclico. No voltamograma, corrente de pico anódico (I_{pa}) e corrente de pico catódico (I_{pc}).



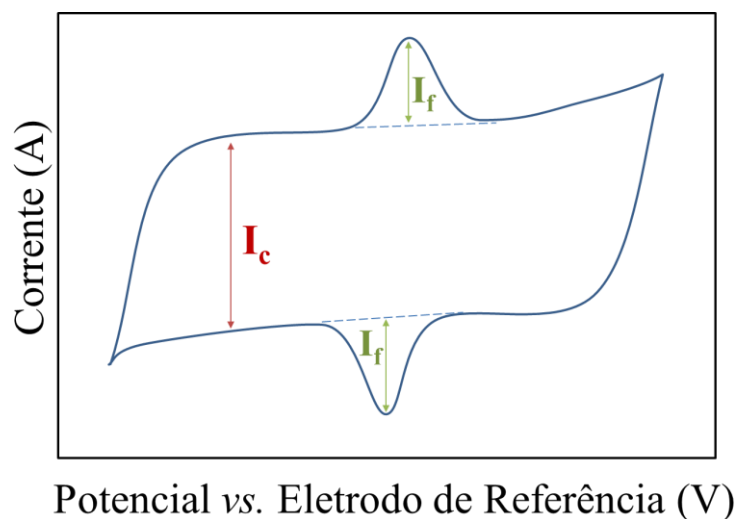
Fonte: elaborada pelo autor.

A Voltametria Cíclica é amplamente utilizada principalmente para obter informações sobre aspectos qualitativos de um processo do eletrodo. O tipo de resposta na forma de onda pode tornar o método impreciso para análises quantitativas (BARD; FAULKNER, 2000). Entretanto, trabalhos recentes na literatura também reportam o uso da voltametria cíclica para medidas quantitativas (ARONOFF-SPENCER et al., 2016; KIM et al., 2016; CHAUHAN et al., 2017; JAIN; CHAUHAN, 2017).

Os dados mais úteis em Voltametria Cíclica são os potenciais de picos anódicos E_{pa} e catódicos E_{pc} e a corrente de pico anódico I_{pa} e catódico I_{pc} . Em condições ideais, as reações reversíveis apresentam os potenciais de picos anódicos e catódicos praticamente iguais em módulo. Para ser classificado como reação reversível a diferença de potencial de pico, ΔE_p , não deverá ultrapassar $60\text{mV}/\text{número de elétrons}$, a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Outro fator de classificação do sistema como reversível é a relação linear entre a corrente de pico pela velocidade de varredura, o $I_p/v^{1/2}$ (BARD; FAULKNER, 2000), também aplicado para os sistemas quasi-reversíveis.

Em medidas eletroquímicas a corrente é resultado de duas contribuições: corrente faradaica e corrente capacitiva. A corrente faradaica é gerada pelas transferências de cargas das reações redox do sistema. Já a corrente capacitiva é gerada devido ao processo de carregamento da dupla camada elétrica existente na interface eletrodo-solução. Na Voltametria Cíclica, as duas correntes podem ser observadas claramente em alguns voltamogramas, como ilustrado na Figura 1.6.3.

Figura 1.6.3: Voltamograma ilustrativo das correntes faradaica (I_f) e capacitiva (I_c).



Fonte: elaborada pelo autor.

Amperometria

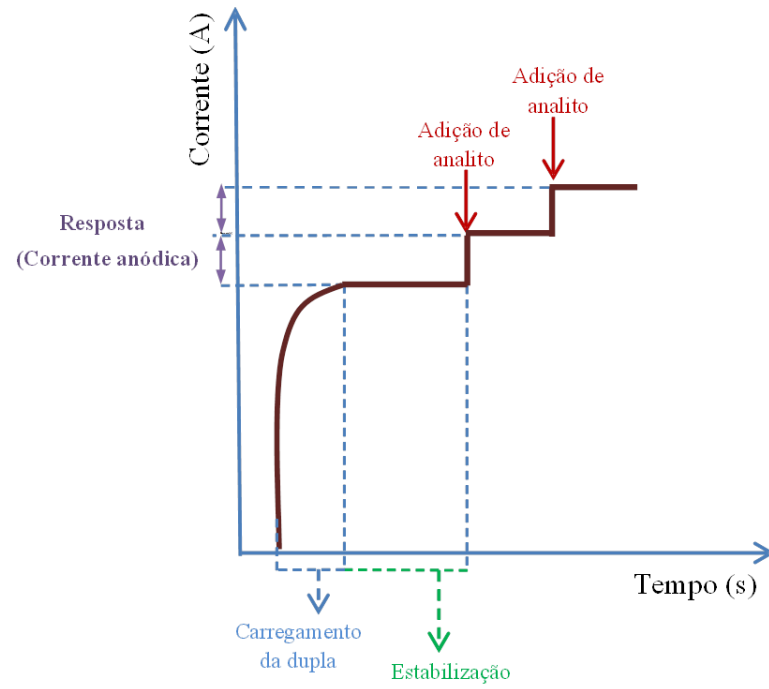
A amperometria é amplamente aplicada a biossensores por proporcionar um aumento da sensibilidade nas medidas (LIU; LIN, 2006). O aumento da sensibilidade é atribuído à diminuição da corrente residual devido o potencial aplicado ser constante, com isso, a corrente capacitiva se torna constante, virtualmente igual a zero. A medida é feita aplicando um potencial constante entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, como resposta é gerada uma corrente entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo. Em geral, o potencial utilizado na medida é o potencial de pico anódico ou catódico obtido previamente por Voltametria Cíclica. Entretanto, alguns materiais possibilitam a diminuição deste potencial, este fato é observado principalmente quando o eletrodo é modificado com nanomateriais, como o grafeno e as nanopartículas metálicas. A diminuição do potencial é desejada por diminuir ou eliminar a resposta de interferentes.

A resposta amperométrica na análise de um analito é dada pela variação na da corrente proporcional à concentração do analito. Quando a resposta amperométrica ocorre devido a um processo de oxidação ocorrerá um aumento da corrente, ou seja, haverá uma resposta de corrente anódica, quando for um processo de redução, a corrente será catódica, a resposta amperométrica apresentará uma diminuição no valor de corrente. A Figura 1.6.4 ilustra uma resposta amperométrica anódica da detecção um analito.

Nesta resposta amperométrica, inicialmente há um aumento de corrente associado ao carregamento da dupla camada elétrica. Após a estabilização da corrente, quando a corrente fica constante, o analito é adicionado ao eletrólito suporte. Com isto, há um aumento da corrente (corrente anódica) atribuída aos processos oxidativos associados à detecção do analito. Novamente, após a estabilização da corrente, o analito é adicionado ao eletrólito suporte, gerando o aumento da corrente proporcional à concentração do analito.

Neste trabalho, o limite de detecção do analito foi determinado pela razão entre o ruído (R) do sinal amperométrico e a sensibilidade (S) ($3R/S$). A sensibilidade é igual a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

Figura 1.6.4: Resposta amperométrica anódica da detecção de um analito.



Fonte: elaborada pelo autor.

CAPÍTULO 2: Métodos de caracterização, sínteses químicas e caracterização dos materiais.

Neste capítulo serão abordadas as metodologias utilizadas para caracterizar os materiais, bem como os filmes LbL e LB, os procedimentos experimentais das sínteses, a caracterização dos materiais sintetizados e a caracterização da Gox.

2.1 Métodos de caracterização

Difração de Raio X

As análises por difração de raio X foram realizadas utilizando o pó de grafite obtido comercialmente e dos materiais obtidos nas sínteses químicas: GO, GPDDA e GPSS, foram realizados utilizando um difratômetro de raio-X modelo XPERT-PRO MPD (PANalytical), usando radiação de Cu K α (comprimento de onda (λ) = 1.544 Å). Com esta técnica foi possível caracterizar e obter o espaçamento entre as nanofolhas obtidas nas diferentes sínteses. Esta análise foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Nilson Cristino da Cruz da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Experimental de Sorocaba,

Espectroscopia UV-Vis

A caracterização dos materiais obtidos por síntese química foi realizada utilizando dispersões em tampão fosfato pH = 6,3. A Gox também foi caracterizada por UV-Vis em mesma condição. Esta técnica permitiu obter a absorvância em λ característico de cada material, e analisar a eficiência da redução do GO na produção do GPDDA e do GPSS. Para a caracterização destes materiais foi utilizado uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho ótico.

Esta técnica também foi utilizada para determinar os tempos necessários para a adsorção de cada material, estudando a cinética de adsorção de cada material e monitorando o crescimento das bicamadas do filme LbL. Para esta análise, as bicamadas foram adsorvidas em substrato de quartzo.

Tais análises foram realizadas utilizando um espectrômetro modelo Genesys 6 (Thermo Fischer) instalado no laboratório de Materiais Nanoestruturados, FINEP 1, UFSCar,

campus Sorocaba. A medida foi realizada no modo absorvência com varredura a cada 0,5 nm entre 190 a 1000 nm.

Espectroscopia FTIR

As análises por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (do inglês, Fourier transformed infrared) permitiu caracterizar as sínteses dos materiais e a presença destes materiais nos filmes LbL e LbL. As medidas foram realizadas em substratos de silício para os filmes LbL, LB e *cast* da Gox. Os espectros foram obtidos na faixa entre 4000 e 500 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e média de 148 varreduras. Para os filmes LbL foi usado um espectrômetro Nexus 470 (Thermo Nicolet), em colaboração com o grupo de Polímeros “Bernhard Gross” da Universidade de São Paulo – USP, São Carlos. Já para os filmes LB, filme *cast* do GO e da Gox depositados sobre silício e para os materiais puros incorporados em pastilhas de KBr foi utilizado um Termo Scientific, modelo Nicolet IR200, UFSCar, campus Sorocaba.

Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi utilizada para caracterizar os filmes LB. Com esta técnica foi possível avaliar a eficiência da redução do GO para formar o GPDDA e o GPSS e comprovar a imobilização da Gox nos filmes. As medidas foram feitas no Instituto de Química, USP São Paulo, na qual foi utilizado o espectrômetro Raman da Horiba-Jobin Yvon T64000 com detector CCD refrigerado com nitrogênio líquido e microscópio confocal com uma objetiva 100x da Olympus para focalizar o feixe na amostra. Para excitação foi usada a linha 514 nm de um laser misto de argônio e kriptônio da marca Coherent Innova 70C com potência de 150 mW na saída.

Dicroísmo Circular

A análise por CD permitiu avaliar se a estrutura conformacional da enzima Gox foi preservada nos filmes LbL depositado sobre quartzo, também foi analisada a estrutura da Gox em solução tampão pH = 6,3. A medida foi realizada em um espectrômetro J-815 (Jasco Inc) com resolução 1 nm, tempo de resposta de 0,5 s e taxa de varredura de 100 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$, em colaboração com a Profa. Dra. Marli Moraes. O equipamento utilizado está localizado na

Universidade Estadual Paulista - UNESP, Campus de Araraquara. Para a medida da solução de Gox foi utilizada uma cela de quartzo de caminho ótico de 1 mm.

Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

A técnica SPR permitiu obter a espessura de cada camada depositada por LbL para formar a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂. As camadas foram depositadas sobre um filme de ouro depositado sobre vidro com suas espessuras controladas, adquiridos da BioNavis. O equipamento utilizado foi o SPR Navi 200 (BioNavis, Finland) com dois feixes de luz p-polarizada de $\lambda = 670$ nm e $\lambda = 785$ nm. Para obter a espessura de cada camada, foram feitas simulações do espectro SPR de cada camada, utilizando o software Winspall 3.02. Este equipamento está instalado no laboratório de Materiais Nanoestruturados, FINEP 1, UFSCar, campus Sorocaba.

Voltametria Cíclica

A análise por Voltametria Cíclica permitiu a caracterização dos potenciais anódicos e catódicos dos filmes LbL e LB, obter informações do comportamento difusional dos sistemas estudados, análise do processo de transferência direta de elétron (DET) e detecção de glicose para os diferentes sistemas estudados. As medidas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT 30 – Echochemie) instalado no laboratório de Materiais Nanoestruturados, FINEP 1, UFSCar, campus Sorocaba. Para as medidas dos filmes LbL GPDDA/GPSS/(GPDDA/Gox)_n e para o filme LB (GPDDA-GPSS-Gox)_n foi utilizado um sistema convencional de três eletrodos: o eletrodo de trabalho foram os filmes depositados sobre substrato com óxido de estanho dopado com índio (ITO, do inglês, *Indium Tin Oxide*,) o contra eletrodo foi de lâmina de platina e o eletrodo de referência foi o de calomelano saturado (ECS) (sistema Hg/Hg₂Cl₂ em solução saturada de KCl). Nestas medidas foram utilizadas velocidades de varredura de 0,025 a 0,300 V.s⁻¹.

2.2 Sínteses Químicas

Todas as sínteses foram realizadas sob forte sistema de exaustão e controle de temperatura. Todos os reagentes utilizados foram obtidos de grau analítico e sem tratamento adicional.

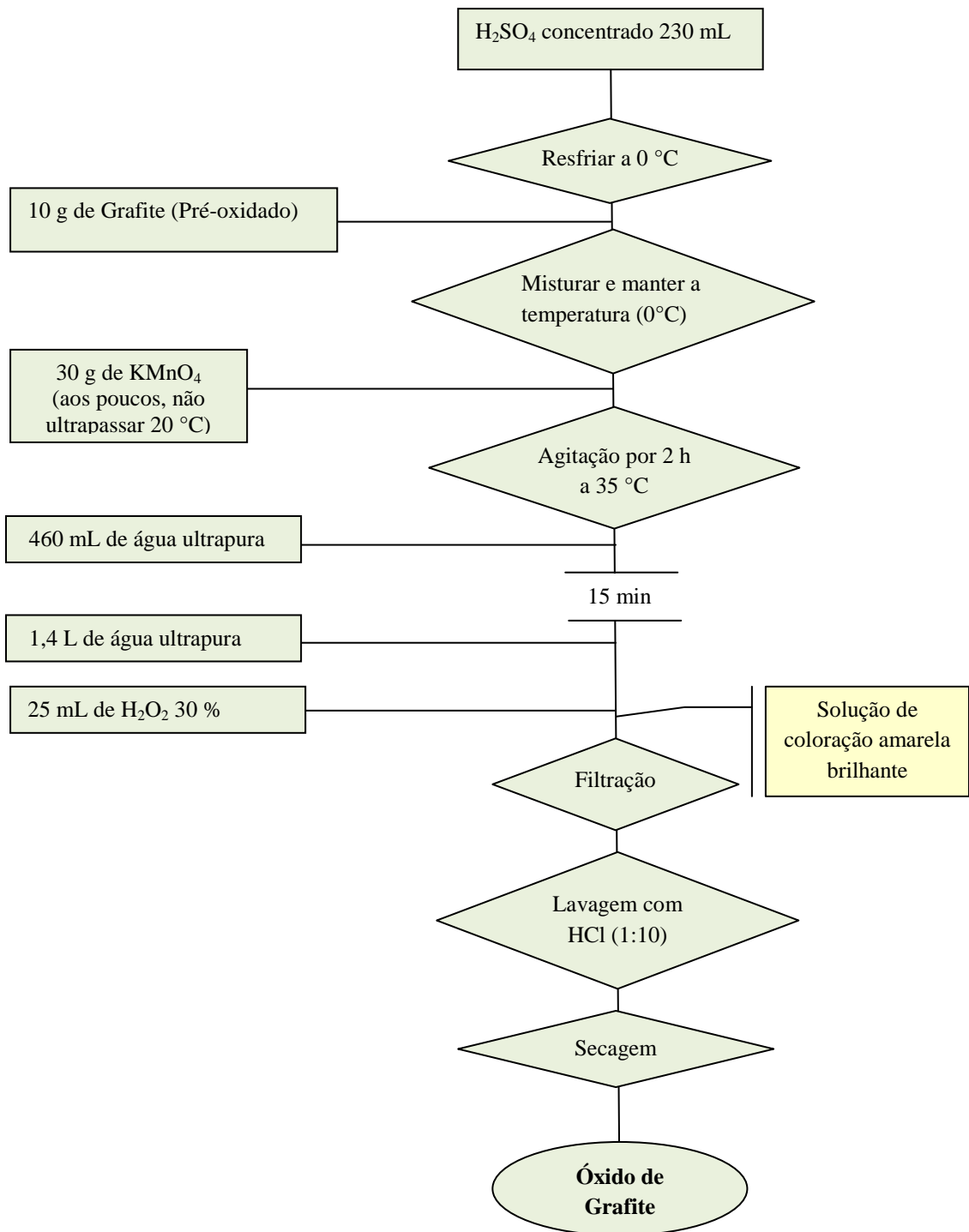
O GPDDA e o GPSS foram sintetizados quimicamente a partir do GO obtido pelo método de Hummers (HUMMERS JR; OFFEMAN, 1958a), posteriormente reduzido e funcionalizado com PDDA ou PSS, para formar dispersões aquosas necessárias para a fabricação dos filmes LbL. Já para os filmes LB, o GPDDA e o GPSS foram dispersos em metanol para viabilizar a formação de monocamadas estáveis. Detalhes da metodologia estão descritas a seguir.

Síntese de Óxido de Grafeno (GO)

10 g de grafite em pó com 98% de pureza foram pré-oxidados com 15 mL de H_2SO_4 , 5g de $K_2S_2O_3$ e 5g de P_2O_5 a 80 °C. A mistura obtida de cor azul escuro foi resfriada em temperatura ambiente por 6 horas, diluída com água ultrapura (cuidado, água adicionada no ácido deve ser feita com cautela, pois a reação é altamente exotérmica), filtrada e lavada até pH neutro.

10 g de grafite pré-oxidado foram adicionados a 230 mL de H_2SO_4 a 0°C. Após a estabilização da temperatura a 0 °C, 30 g de $KMnO_4$ foram adicionados lentamente, mantendo a temperatura em até 20 °C. A mistura final obtida apresentou cor marrom e foi mantida em agitação por 2 horas a 35 °C. Em seguida, 460 mL de água ultrapura foram adicionadas lentamente (a água foi adicionada ao ácido, portanto há reação altamente exotérmica, devendo ter o máximo de cuidado). Após 15 minutos de reação, foram adicionados mais 1,4 L de água ultrapura, então, 25 mL de H_2O_2 30 % foram adicionados e a mistura se tornou amarela brilhante. O óxido de grafite resultante foi filtrado e lavado com HCl (1:10) (HUMMERS JR; OFFEMAN, 1958a). O GO foi obtido após esfoliação das nanofolhas de grafite em banho de ultrassom por 2 h. A Figura 2.2.1 apresenta um fluxograma da síntese do óxido de grafite.

Figura 2.2.1: Fluxograma da síntese do óxido de grafite.

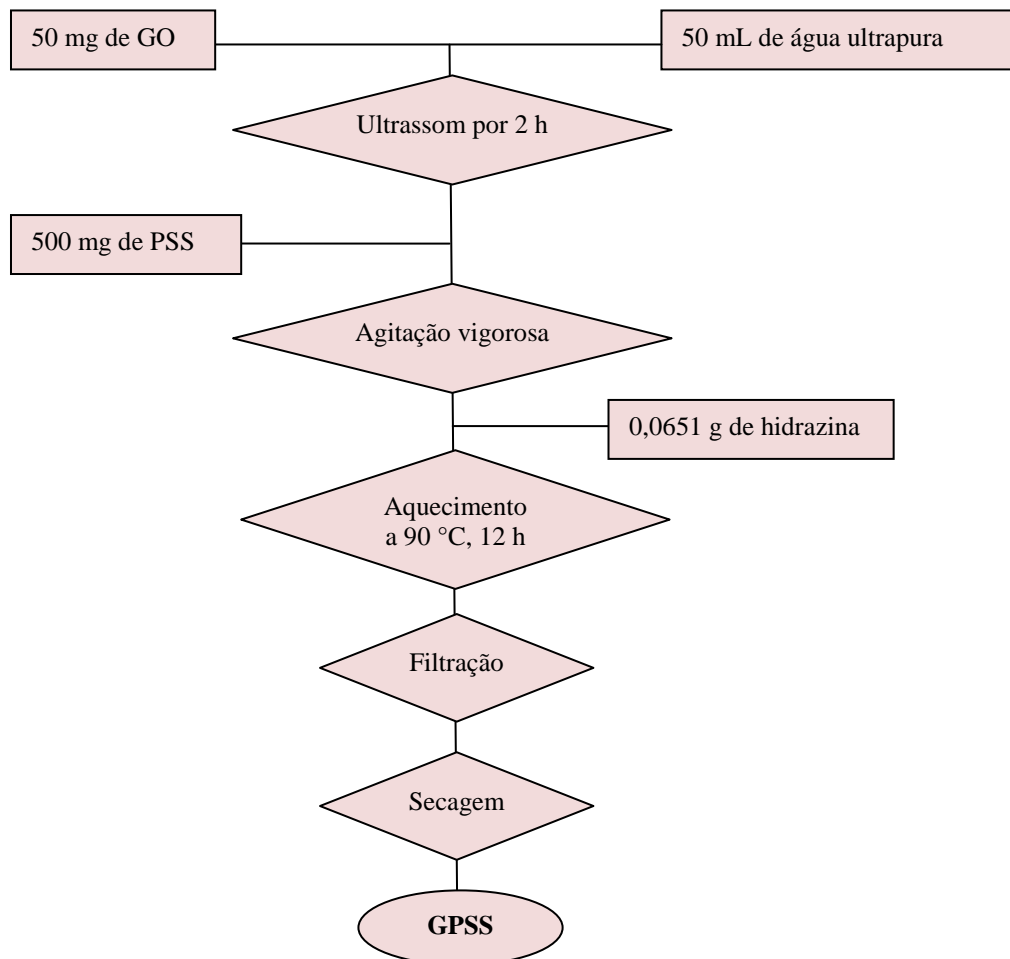


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Síntese de óxido de grafeno reduzido e estabilizado em PSS (GPSS)

Primeiramente, 50 mg de óxido de grafite foram adicionados em 50 mL de água ultrapura e mantidos em banho de ultrassom por 2 horas para a exfoliação das nanofolhas do óxido de grafite, e desta forma, obter o GO. Em seguida, foi adicionado à dispersão de GO 500 mg de poli(estireno sulfônico) (PSS; $M_w = 70000$) em agitação vigorosa. Com cautela, foi adicionado à mistura o agente redutor, 65,1 mg de hidrazina ($H_6N_2O_4S$) sob agitação. A mistura foi aquecida a 90 °C em refluxo por 12 horas. Por fim, o óxido de grafeno reduzido estabilizado em PSS (GPSS) obtido foi submetido ao processo de lavagem, a centrifugação em alta rotação (14000 rpm) e posterior secagem a 90 °C sob vácuo (STANKOVICH et al., 2006). A Figura 2.2.2 ilustra o fluxograma do processo de fabricação do GPSS.

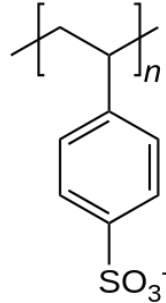
Figura 2.2.2: Fluxograma da síntese do GPSS.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O PSS é um polieletrólito aniônico e sua densidade de carga negativa está associada aos oxigênios presente no grupo sulfônico. A Figura 2.2.3 ilustra a estrutura química.

Figura 2.2.3: Ilustração da estrutura química do PSS.

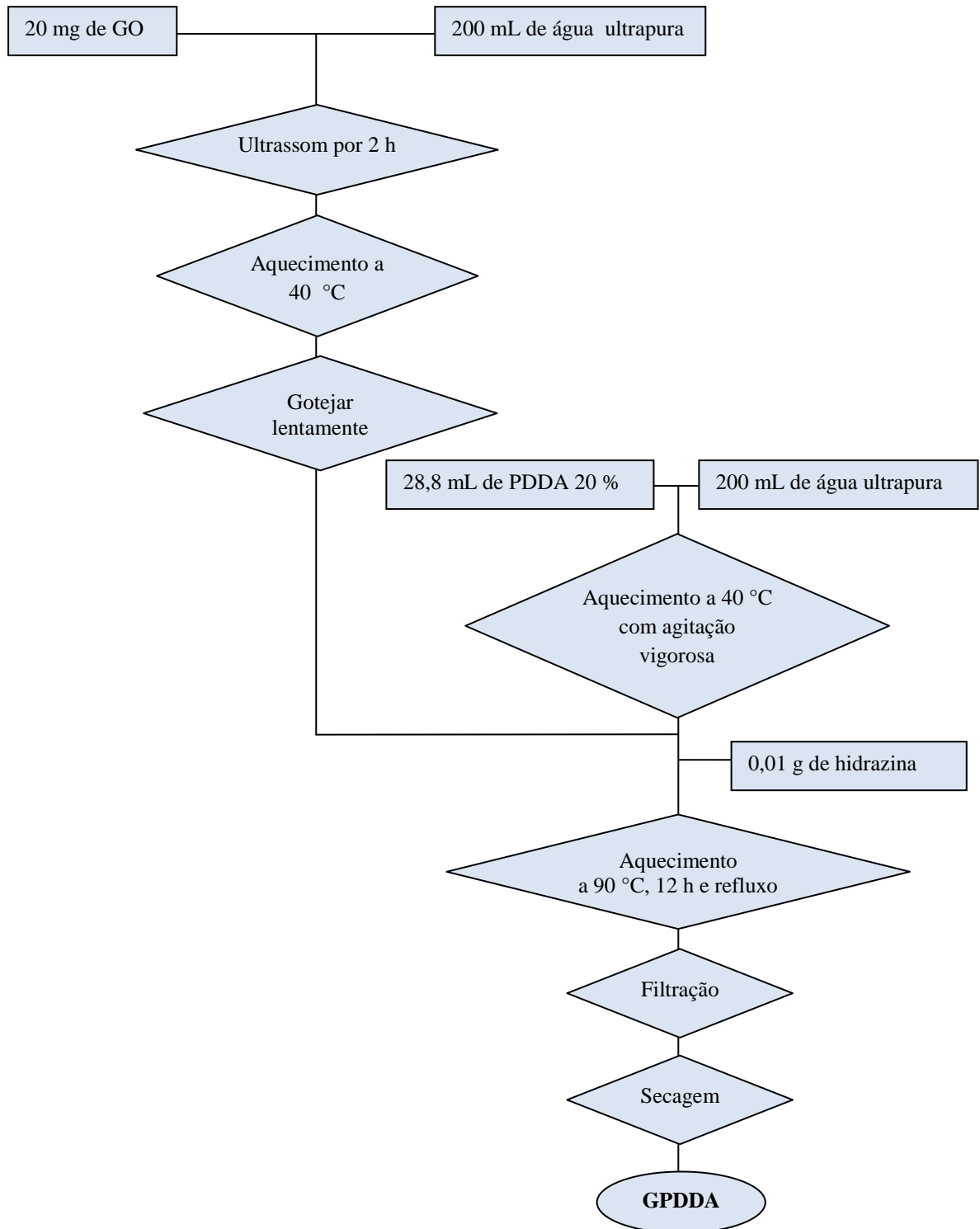


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Síntese de óxido de grafeno reduzido e estabilizado em PDDA (GPDDA)

Primeiramente, 20 mg de óxido de grafite foram adicionados em 200 mL de água ultrapura e mantidos em banho de ultrassom por 2 horas para a exfoliação das nanofolhas do óxido de grafite, e desta forma, obter o GO. Em seguida, a dispersão de GO foi aquecida a 40 °C e gotejada lentamente a 200 mL de solução de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA; 20 %p em H₂O, Sigma Aldrich) também aquecida a 40 °C e sob agitação. Após a completa homogeneização, a mistura foi mantida em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado à mistura, sob agitação, 0,01 g do agente redutor hidrazina (H₆N₂O₄S). A mistura foi mantida sob agitação e aquecida a 90 °C em refluxo por 12 horas. Finalmente, o GPDDA obtido foi submetido ao processo de lavagem, à centrifugação em alta rotação (14000 rpm) e posterior secagem em temperatura ambiente sob vácuo (LI; DENG; YANG, 2014). A Figura 2.2.4 ilustra o fluxograma do processo de obtenção do GPDDA.

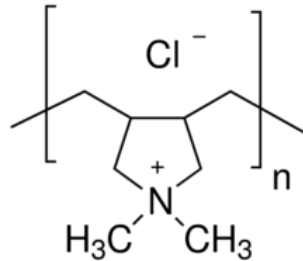
Figura 2.2.4: Fluxograma da síntese do GPDDA.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O PDDA é um polieletrólito catiônico e sua densidade de carga positiva é associada ao nitrogênio na forma de amina quaternária. A estrutura está ilustrada na Figura 2.2.5.

Figura 2.2.5: Ilustração da estrutura química do PDDA.

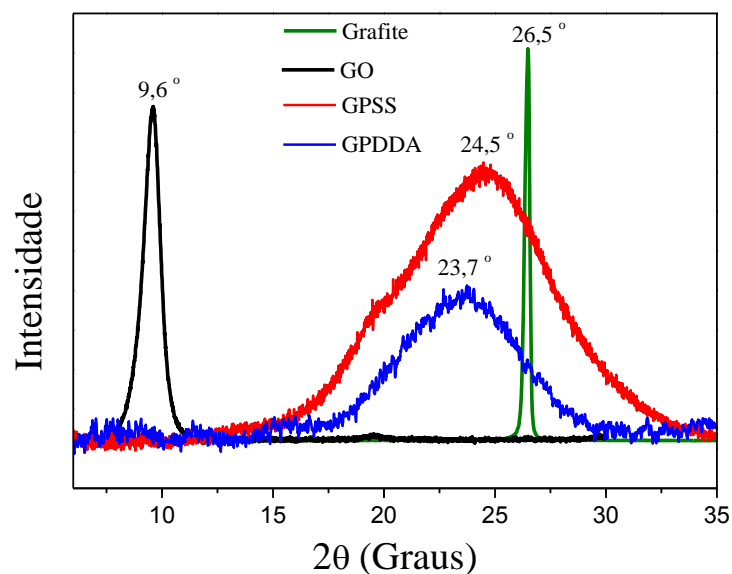


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

2.3 Caracterização das Sínteses Químicas

O pó do grafite, GO, GPSS e GPDDA foram analisados por difração de raio-X para caracterização das estruturas proveniente das sínteses químicas de GO, GPSS e GPDDA. A Figura 2.3.1 apresenta os difratogramas de raio-X para os diferentes compostos.

Figura 2.3.1: Difratogramas de raio-X do pó do grafite, GO, GPSS e GPDDA sintetizados quimicamente.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O espaçamento interplanar das nanofolhas pode ser obtido pela Lei de Bragg, segundo a equação:

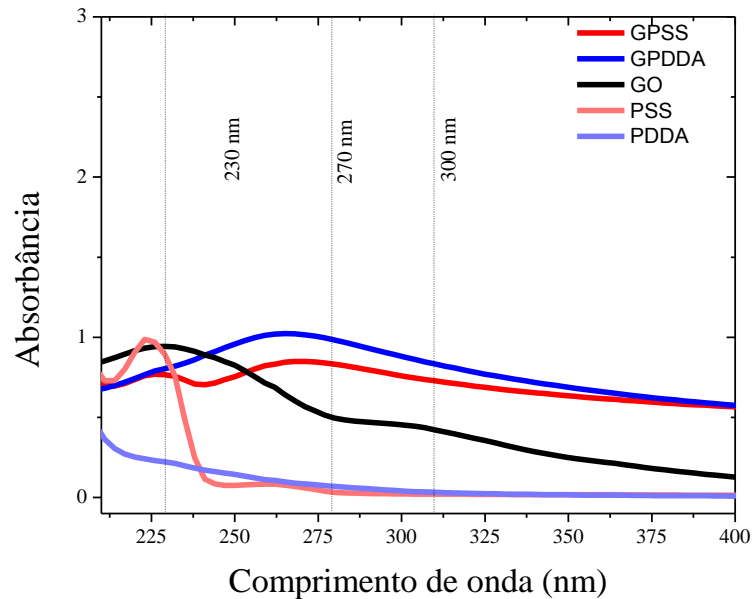
$$n\lambda = 2d.\sin\theta \quad (9)$$

sendo, n um número inteiro de comprimento de onda (λ), d a distância interplanar e θ o ângulo do raio X incidente. O grafite apresentou um pico em $2\theta = 26,5^\circ$, o qual corresponde a um espaçamento interplanar das nanofolhas de 0,335 nm do plano (002) (PAUL; MOHANTA, 2011). Após o processo de oxidação do grafite, o GO apresentou um pico em $2\theta = 9,6^\circ$ atribuído ao plano (002) e um espaçamento interplanar das nanofolhas de 0,922 nm, indicando um elevado grau de oxidação das nanofolhas de GO. O aumento no espaçamento interplanar das nanofolhas de GO pode ser atribuído à geração de grupos funcionais oxigenados, tais como epóxi e grupos hidroxilas presentes nas nanofolhas de GO (PARK et al., 2011). O difratograma do pó de GPSS apresentou um pico largo em $2\theta = 24,5^\circ$, com espaçamento interplanar igual a 0,363 nm. Resultados similares foram obtidos para o pó de GPDDA, o qual apresentou no difratograma um pico largo em $2\theta = 23,7^\circ$ ($d = 0,376$ nm). Para ambos, a diminuição do espaçamento interplanar associado ao alargamento do pico, quando comparado às nanofolhas de GO, evidencia a redução do GO e a intercalação do polímeros rGO (PARK et al., 2011; PENG et al., 2014).

A redução do GO nas sínteses do GPDDA e do GPSS também foi evidenciada quando suas dispersões foram analisadas por espectroscopia UV-Vis. A Figura 2.3.2 apresenta os espectros de absorção no UV-Vis da dispersão em tampão fosfato do GO, GPSS e GPDDA, bem como, das soluções dos polímeros PSS e PDDA.

O espectro de absorbância em UV-Vis da dispersão aquosa do GO apresentou bandas em cerca de 230 nm e 300 nm atribuídas às transições eletrônicas dos orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C aromáticas e às transições $n \rightarrow \pi^*$ das ligações C=O (YU et al., 2014), respectivamente. Após o processo de redução do GO na presença dos estabilizantes PDDA ou PSS, esses dois picos desaparecem e surge uma nova banda larga com o máximo em aproximadamente 270 nm atribuída à restauração das ligações π -conjugadas no GPDDA e GPSS. Particularmente, no espectro do GPSS (curva em vermelho), aparece uma banda em 230 nm atribuída à absorção do anel benzênico presente na estrutura do PSS (STANKOVICH et al., 2006).

Figura 2.3.2: Espectros UV-Vis das soluções de PDDA e PSS e das sínteses de GO, GPDDA e GPSS dispersas em tampão fosfato pH = 6,3.

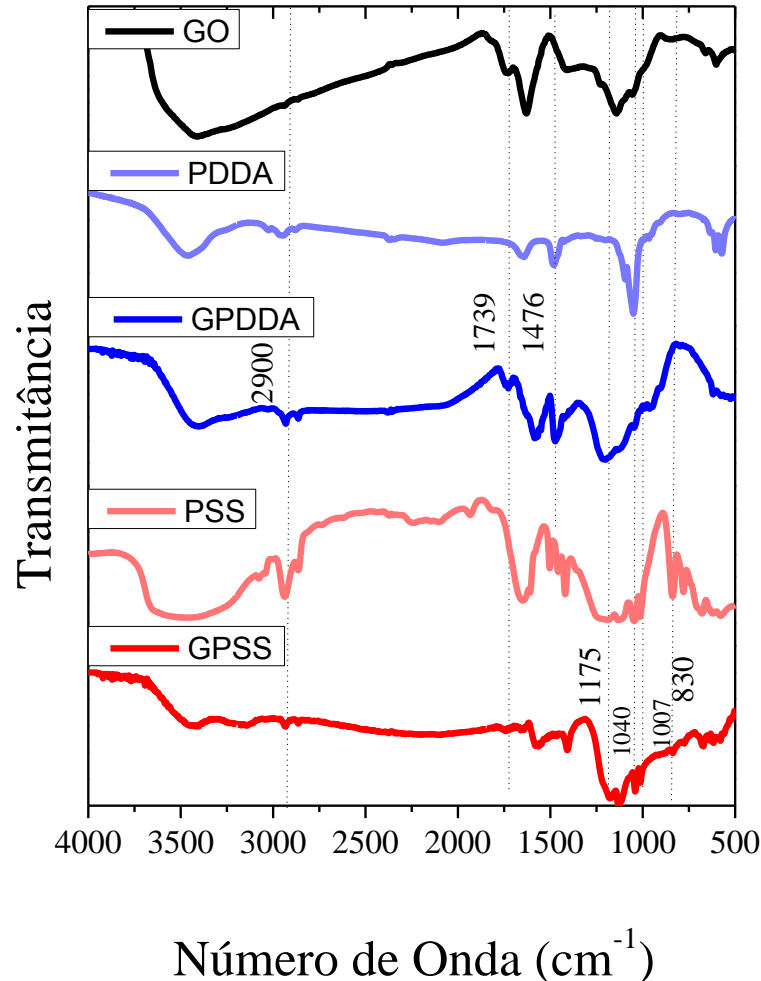


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A eficiência da redução do GO nas sínteses do GPDDA e GPSS também foi evidenciada quando os materiais obtidos nas sínteses foram analisados por espectroscopia FTIR. A Figura 2.3.3 ilustra os espectros de FTIR no modo de transmitância obtidos em pastilha de KBr do GO, PDDA, GPDDA, PSS e GPSS.

O espectro do GO revelou bandas principalmente atribuídas ao seu processo de oxidação na sua obtenção. As bandas presentes em 3400 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento vibracional e deformação da ligação O-H relacionadas com os grupos carboxílicos e hidroxilas presentes na estrutura do GO, bem como água residual entre as folhas do GO (CHEN et al., 2013). As bandas observadas em 1739 cm^{-1} e 1057 cm^{-1} correspondem, respectivamente, ao estiramento vibracional das ligações C=O e C-O presentes nos grupos COOH (TITELMAN et al., 2005), em 1362 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-OH (SI; SAMULSKI, 2008). 1280 cm^{-1} e em 1140 cm^{-1} associada ao estiramento do C-O-C em grupos epóxidos (DREYER; JIA; BIELAWSKI, 2010). Por fim, a banda observada em 1620 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações C=C estrutural (CHEN et al., 2013; DESHMUKH et al., 2017).

Figura 2.3.3: Espectros FTIR do PDDA e PSS puro e das sínteses de GO, GPDDA e GPSS obtidos em pastilhas de KBr.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Após o processo de redução do GO para obter GPDDA e GPSS, houve uma evidente diminuição na transmitância da banda em 1739 cm^{-1} tanto para no espectro do GPDDA, quanto para o espectro do GPSS, evidenciando a diminuição de grupos COOH presentes na estrutura destes materiais, comprovando a eficiência na redução do GO nas duas sínteses. A banda larga presente no espectro do GPDDA em aproximadamente 3440 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de $-\text{NR}_3^+$ (ZHANG et al., 2016) e também ao estiramento O-H da água residual devido a propriedade hidrofílica do PDDA (ZHANG et al., 2013b). A banda em 1570 cm^{-1} está relacionada com o estiramento da ligação C=C em grupos aromáticos (SEREDYCH; ROSSIN; BANDOSZ, 2011). Já as bandas em aproximadamente 2900 cm^{-1} e em 1470 cm^{-1}

são relacionadas ao estiramento vibracional das ligações C–H e N–C, as quais podem ser relacionadas com as bandas características do polímero PDDA (ZHU et al., 2013; FU; LAI; YU, 2015). A banda presente em 1205 cm^{-1} sugere ligação do nitrogênio presente na estrutura do PDDA com carbono próximo a oxigênio residual. A presença dessas bandas evidencia a funcionalização do rGO com PDDA, formando o GPDDA (PENG et al., 2014).

As bandas presentes no espectro do GPSS foram reveladas em 3470 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} correspondente ao estiramento e deformação das ligações O–H das moléculas de água presente no PSS (BALAMURUGAN; BERCHMANS, 2015). Já em 2900 cm^{-1} , 1175 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento vibracional das ligações C–H, S–O e *S-fenil*, respectivamente, confirmando a presença dos grupos sulfônicos característicos do polímero PSS. A banda em 1570 cm^{-1} está relacionada com o estiramento da ligação C=C em grupos aromáticos (SEREDYCH; ROSSIN; BANDOSZ, 2011). As bandas em 1007 cm^{-1} e 830 cm^{-1} são atribuídas às deformações angulares no plano das ligações C–H e as deformações angulares fora do plano das ligações C–H, característico de grupos fenil p-dissubstituído quando funcionalizado efetivamente por PSS. (SI; SAMULSKI, 2008). As principais absorções dos diferentes materiais estão apresentadas na Tabela 2.3.1.

Tabela 2.3.1: Atribuições das principais bandas FTIR do GO, GPDDA e GPSS obtidas em pastilhas de KBr.

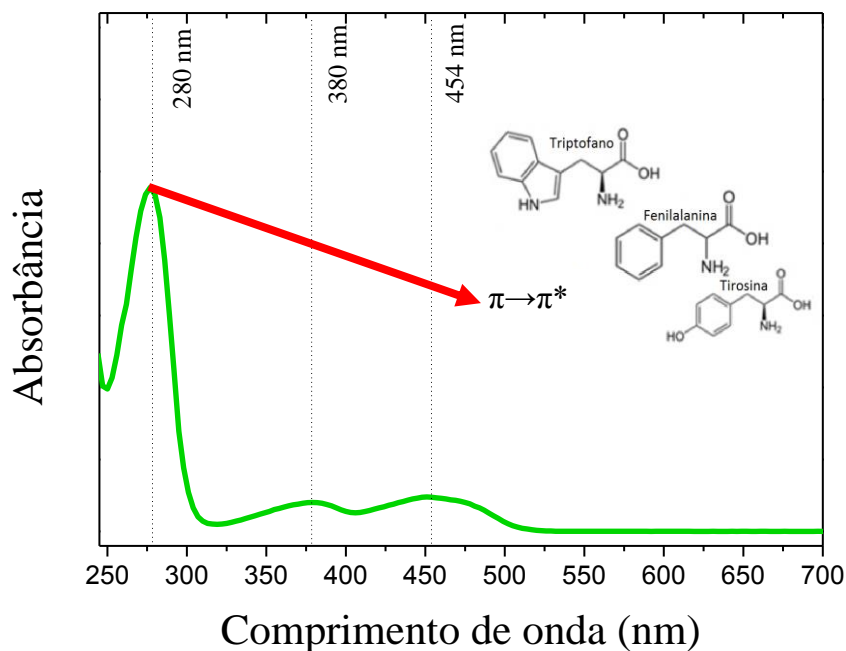
GO		PSS		PDDA		GPSS		GPDDA	
Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
3400	O-H estiramento	3470	O-H estiramento	3440	O-H estiramento	3470	O-H estiramento	3440	O-H estiramento
1739	C=O estiramento	2900	C-H estiramento	3440	-NR ₃ ⁺ estiramento	2900	C-H estiramento	3440	-NR ₃ ⁺ estiramento
1620	C=C estiramento	1620	C=C estiramento	2900	C-H estiramento	1650	O-H deformação	2900	C-H estiramento
1420	O-H deformação	1650	O-H deformação	1650	O-H deformação	1570	C=C estiramento	1650	O-H deformação
1362	C-OH	1175	S-O estiramento	1470	N-C estiramento	1175	S-O estiramento	1570	C=C estiramento
1140	C-O-C estiramento em grupos epóxis	1040	<i>S-fenil</i> estiramento			1040	<i>S-fenil</i> estiramento	1470	N-C estiramento
1057	C-O estiramento	1007	C-H deformação angular no plano			1007	C-H deformação angular no plano		
		830	C-H deformação angular fora do plano			830	C-H deformação angular fora do plano		

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

2.4 Caracterização da enzima Gox

A enzima Gox foi utilizada para compor os biossensores formados com filmes LbL e também com os filmes LB. Em um primeiro instante, para avaliar se a enzima foi imobilizada com sucesso nos filmes LbL, a Gox foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis. A Figura 2.3.1 apresenta o espectro de absorbância UV-Vis da Gox em solução tampão pH = 6,3.

Figura 2.4.1: Espectro de absorção UV-Vis da Gox em solução tampão pH = 6,3.

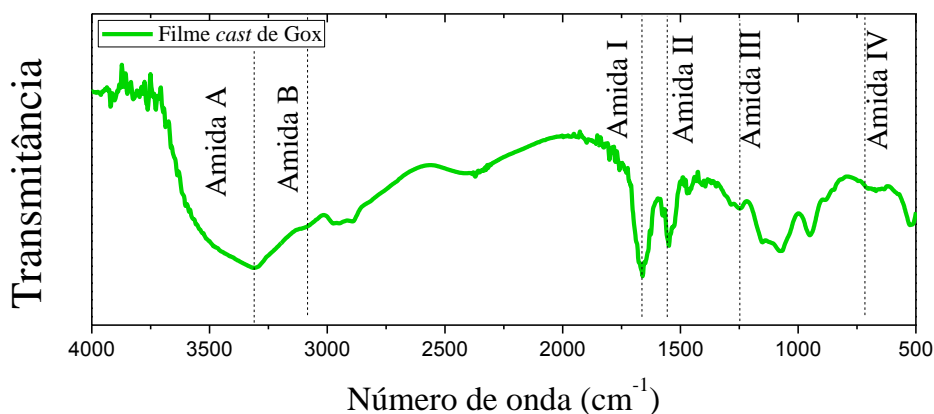


Fonte: elaborada pelo autor.

O espectro de absorbância da Gox revelou uma absorção característica em aproximadamente 280 nm atribuída às transições eletrônicas dos orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C dos aminoácidos cíclicos (triptofano, fenilalanina e tirosina) (MANSUR; MANSUR; GONZÁLEZ, 2011), duas absorções fracas em 380 e 454 nm atribuídas aos grupos flavinas na forma oxidada (FAD) presente na estrutura da proteína (ZHANG et al., 2015). Como a banda em 280 nm é mais intensa, a sua presença no filme LbL será observado monitorando este comprimento de onda.

A presença da Gox nos filmes LbL e LB foi investigada por espectroscopia FTIR e sua imobilização foi confirmada pelas principais bandas da Gox presentes nos espectros FTIR dos filmes. Para comparação, a Figura 2.4.2 apresenta o espectro de um filme *cast* da Gox com destaque das principais bandas características desta enzima.

Figura 2.4.2: Espectro FTIR de um filme *cast* da Gox.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A Gox apresenta diversas bandas características na espectroscopia FTIR, denominadas de bandas de Amidas A, B, I, II e III. A banda presente em aproximadamente 3300 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações N–H (amida A) e a banda em 3100 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações N–H e ao segundo harmônico da amida II (amida B). A banda de amida I ocorre entre 1700 a 1600 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=O das ligações peptídicas e uma pequena contribuição da deformação angular da ligação H-N-C (BLIN et al., 2005). Já a banda de amida II ocorre entre 1600 a 1500 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação C–N e também à deformação no plano das ligações N–H dos grupos peptídicos (LIANG; ZHUOBIN, 2003). A banda em aproximadamente em 1240 cm^{-1} , muito complexa, refere-se à banda de amida III (PORTACCIO et al., 2011). As principais bandas encontradas no espectro FTIR da Gox estão listadas na Tabela 2.4.1.

Tabela 2.4.1: Atribuições das principais bandas FTIR da Gox obtidas em filme *cast*.

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
3287	N-H estiramento (amida A)
3100	Amida B
1660	C=O estiramento (amida I)
1522	N-H deformação (amida II)
1476	N-C estiramento (amida II)
1397	C-H deformação em CH_3
1240	C-N-H deformação angular no plano e estiramento C-N (Amida III)

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

CAPÍTULO 3: Filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)_n

O Capítulo 3 consiste no desenvolvimento de biossensores de glicose a partir de filme LbL contendo GPDDA, GPSS e Gox. Este Capítulo está estruturado inicialmente por uma introdução com base na literatura sobre fabricação de biossensores de glicose formados por LbL de nanofolhas de grafeno, seguida dos objetivos específicos, metodologia, resultados e discussões e conclusões desta parte do trabalho.

3.1 Introdução: revisão da literatura

A aplicação de nanomateriais em biossensores tem recebido muito interesse nos últimos anos, principalmente por oferecer uma série de vantagens, como o aumento da área de superfície e a transferência de elétrons mais eficiente entre a biomolécula para o eletrodo (CASH; CLARK, 2010). Aliada às essas propriedades, a nanoestruturação também se mostra muito relevante no desempenho do biossensor (CHEN et al., 2017). Neste sentido, imobilizar a enzima em nanofolhas de grafeno pela técnica LbL se torna muito promissora no desempenho do biossensor.

Entretanto, uma folha simples de grafeno é fortemente hidrofóbica (STANKOVICH et al., 2006). Desta forma, para desenvolver um biossensor com um filme LbL de grafeno, torna-se necessário a funcionalização ou dopagem das nanofolhas para formar dispersões aquosas estáveis. Trabalhos recentes na literatura reportam o uso de nanofolhas de grafeno modificadas por diversas formas para a aplicação em biossensores de glicose fabricados com filmes LbL. Ren e colaboradores (REN et al., 2016) funcionalizaram as nanofolhas de grafeno com trietilenotetramina. Fabricaram um biossensor de glicose e avaliaram a faixa analítica em função do número de bicamadas. O biossensor com seis bicamadas se apresentou analítico até 8 mmol.L^{-1} , com sensibilidade de $19,9 \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$. Barsan e colaboradores (BARSAN et al., 2014) usaram nanofolhas de grafeno dopadas com nitrogênio e associaram a quitosana para fabricar um biossensor de glicose. Este biossensor apresentou limite de detecção de $64 \mu\text{mmol.L}^{-1}$ e sensibilidade de $10,5 \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$, com faixa analítica entre 0,2 e 1,8 mmol.L^{-1} . Gu e colaboradores (GU et al., 2012) funcionalizaram covalentemente as nanofolhas de grafeno com brometo de 1-(3-aminopropil)-3-metilimidazólio e com ácido sulfanílico para adicionar cargas positivas e negativas, respectivamente. O biossensor de

glicose apresentou limite de detecção de $3,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e faixa analítica entre 10 a $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$, em um sistema de microdiálise.

Neste trabalho, as nanofolhas de grafeno foram funcionalizadas com polieletrólitos de cargas positivas e negativas durante o processo de redução do GO, formando dispersões aquosas estáveis, portanto, aplicáveis à técnica LbL.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver um biossensor fabricado a partir de filme LbL contendo GPDDA, GPSS e Gox.
- ✓ Fabricação e caracterização dos filmes LbL por espectroscopia UV-Vis e FTIR, CD, SPR e Voltametria Cíclica.
- ✓ Análise do desempenho dos biossensores formados por filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)_n em função do número de bicamadas contendo a Gox na detecção de glicose por Voltametria Cíclica e Amperometria.
- ✓ Avaliar o desempenho do melhor biossensor fabricado com filme LbL na detecção de glicose na presença de interferentes e em amostras reais.

3.3 Materiais e Métodos

Preparação da dispersão de GPDDA

O GPDDA foi obtido a partir do GO sintetizado quimicamente, reduzido e funcionalizado com o polieletrólito PDDA, conforme descrito no Capítulo 3. Foi preparada uma dispersão aquosa de GPDDA $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em seguida, a mesma foi mantida em banho ultrassônico por 2 h.

Preparação da dispersão de GPSS

O GPSS também foi obtido a partir do GO sintetizado quimicamente, reduzido e funcionalizado com o polieletrólito PSS, conforme descrito no Capítulo 2. Foi preparada uma dispersão aquosa de GPSS $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em seguida, a mesma foi mantida em banho ultrassônico por 2 h.

Preparação da solução de Gox

A solução da Gox 1mg.mL^{-1} foi preparada em tampão fosfato 10mmol.L^{-1} , pH = 6,3.

Procedimento de limpeza dos substratos

Os substratos de ITO foram limpos cuidadosamente com clorofórmio, mantidos em banho ultrassônico em álcool isopropílico por 15 min e secos com ar comprimido.

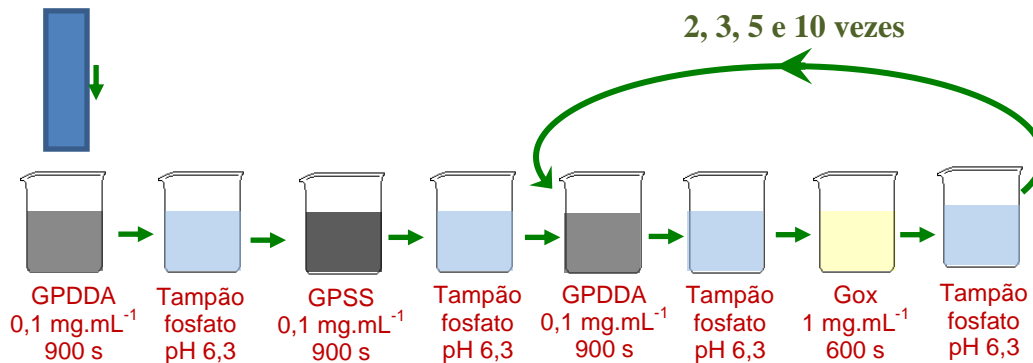
Os substratos de silício foram limpos com clorofórmio, mantidos em banho ultrassônico também em clorofórmio por 30 min e secos com ar comprimido.

Os substratos de quartzo foram hidrofiliados em uma mistura de HCl, H_2O_2 e H_2O , 1:1:6 e depois com NH_4OH , H_2O_2 e H_2O , 1:1:5, ambas por 10 minutos a 80°C , lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Procedimento para a formação dos filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)_n

Na formação da primeira bicamada o substrato previamente limpo foi imerso na dispersão de GPDDA $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ por 900 s (tempo estimado pela curva da cinética de crescimento da adsorção presente na Figura 3.4.2), lavado em tampão fosfato pH 6,3 para remoção de material não adsorvido e seco com ar comprimido, em seguida, o substrato foi imerso na dispersão de GPSS $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ por 900 s (tempo estimado pela curva cinética de crescimento da adsorção presente na Figura 3.4.1), novamente lavado em tampão fosfato pH 6,3 para remoção de material não adsorvido e seco com ar comprimido. Nas bicamadas subsequentes o substrato contendo a primeira bicamada foi imerso em GPDDA por 900 s, lavado em tampão fosfato pH 6,3 para remoção de material não adsorvido e seco com ar comprimido, e finalmente imerso na solução de 1mg.mL^{-1} de Gox por 600 s (tempo estimado pela cinética de crescimento da adsorção presente na Figura 3.4.3), lavado em tampão fosfato pH 6,3 para remoção de material não adsorvido e seco com ar comprimido. Este processo de formação das bicamadas de (GPDDA/Gox) foi repetido por 2, 3, 5 e 10 vezes, formando as arquiteturas (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂, (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₃, (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₅ e (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀. A Figura 3.3.1 ilustra o procedimento para a formação dos filmes LbL.

Figura 3.3.1: Ilustração do procedimento para a formação dos filmes LbL.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Procedimento para a caracterização dos filmes LbL por espectroscopia UV-Vis e FTIR

O filme LbL analisado por espectroscopia UV-Vis foi depositado em substrato de quartzo. A absorbância foi medida a cada bicamada até formar a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀.

Para a espectroscopia FTIR, os filmes LbL foram depositados sobre substrato de silício. A quantidade de bicamada de cada arquitetura analisada foi estabelecida de acordo com a necessidade da intensificação do sinal gerado na medida. Foram analisadas as arquiteturas (GPDDA/Gox)₁₀, (GPDDA/GPSS)₅/(GPDDA/Gox)₅ e (GPDDA/GPSS)₁₀.

Procedimento para as análises eletroquímicas – Voltametria Cíclica e Amperometria

Os filmes foram depositados sobre ITO e usados como eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos. Foi usado um eletrodo de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência.

A análise da área ativa e a análise do comportamento difusional dos filmes LbL por Voltametria Cíclica foi realizada usando o sistema cianeto-ferrocianeto. Para isso foi usada 7 mL de uma solução (1:1) de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 10 mmol.L⁻¹. A velocidade de varredura foi variada entre 0,025 e 0,300 V.s⁻¹.

As medidas de detecção de glicose por Voltametria Cíclica foram realizadas em 7 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL de glicose 20 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

As medidas de detecção de glicose por Amperometria foram realizadas em 7 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL de glicose 10 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

A análise da detecção de glicose em meio contendo interferente foi realizada em 7 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. Foi adicionada primeiramente uma alíquota de 100 µL de glicose 20 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, em seguida, foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, de ácido úrico (AU) 20 mmol.L⁻¹, ácido ascórbico (AA) 20 mmol.L⁻¹, lactose (L) 20 mmol.L⁻¹, sacarose (S) 20 mmol.L⁻¹ e frutose (F) 20 mmol.L⁻¹. Por fim, foi adicionada 100 µL de glicose 20 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

A análise da detecção de glicose em amostra real foi realizada em 7 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. Para a análise da solução hidroeletrólítica comercial foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL uma solução 1:10 de Pedyalite® diluído em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. O mesmo procedimento foi realizado para o leite sem lactose.

3.4 Resultados e Discussões

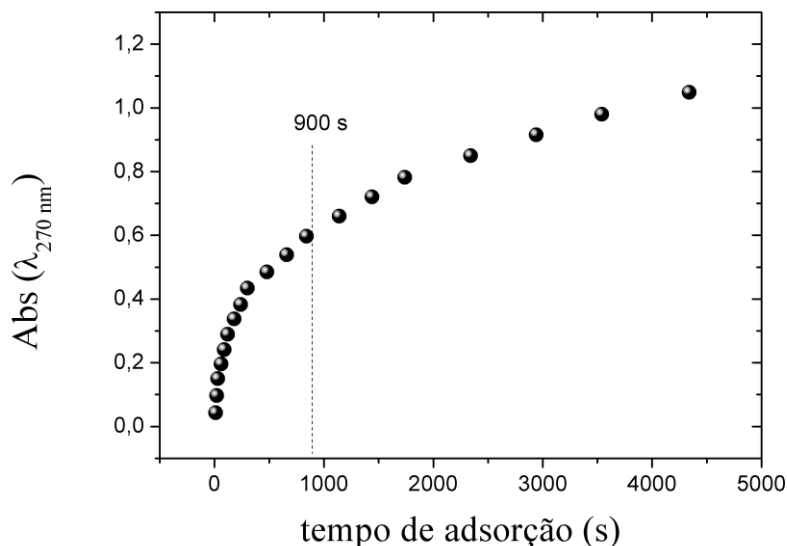
Cinéticas de crescimento da adsorção do GPSS, GPDDA e Gox em substratos de quartzo

O comportamento do crescimento da adsorção de um material em uma bicamada depositada por LbL pode ser analisado pela cinética de crescimento da adsorção deste material, monitorado pela absorvância da bicamada em UV-Vis em função do tempo de adsorção do material estudado. Pela cinética de crescimento da adsorção é obtido o tempo ideal para a deposição do material, ou seja, tempo necessário para a maior adsorção deste material na bicamada monitorada pela absorvância em UV-Vis. O tempo ideal de adsorção de um material é obtido quando sua absorvância na bicamada passa a ser constante em relação ao tempo. Sendo assim, o tempo ideal de adsorção é observado quando a curva de absorvância em UV-Vis sofre uma inflexão e permanece constante após este ponto. Para obter o tempo

ideal de deposição pela cinética de crescimento da adsorção de um material é utilizado um material com o tempo de adsorção conhecido, mantendo-o fixo, variando o tempo de adsorção do material estudado.

O tempo ideal da adsorção do GPSS ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em função de um polieletrólito de carga positiva foi analisado utilizando uma solução $1 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de PDDA (polieletrólito com o tempo de adsorção conhecido e fixo). É importante salientar que a carga apresentada pelo GPSS em meio aquoso é atribuída à carga negativa presente no polieletrólito PSS. Ambos os materiais, GPSS e PDDA foram preparados em tampão fosfato $\text{pH} = 6,3$. Na Figura 3.4.1 está apresentada o comportamento do crescimento da absorbância em UV-Vis de cada bicamada de (PDDA/GPSS) em diferentes tempos de adsorção do GPSS. O monitoramento do crescimento das bicamadas foi realizado em 270 nm por ser o comprimento de onda da principal banda de absorção do GPSS, conforme observado para a dispersão do GPSS (Figura 2.3.2).

Figura 3.4.1: Absorção em UV-Vis de cada bicamada de (PDDA/GPSS) depositada em diferentes tempos de adsorção do GPSS.



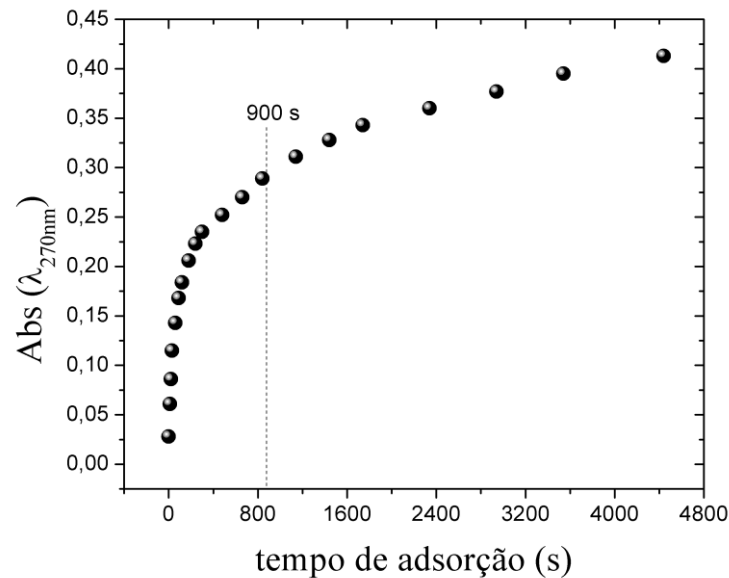
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O tempo de adsorção adotado para o PDDA foi fixado em 600 s (RANI et al., 2011) e o tempo de adsorção do GPSS foi variado de 10 a 4340 s . Para o GPSS o ponto de inflexão da curva de absorção em UV-Vis foi em aproximadamente 600 s , entretanto, após o ponto de

inflexão o material não apresentou absorção constante com o aumento do tempo de adsorção, sendo assim, sendo assim, o tempo ideal de adsorção adotado foi aumentado para 900 s.

Para avaliar o comportamento da adsorção do GPDDA foram preparadas dispersões de GPDDA ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e GPSS ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) em tampão fosfato de pH 6,3. Em meio aquoso, o GPDDA apresentou carga positiva e o GPSS carga negativa, ambas atribuídas aos polieletrólitos utilizados como estabilizantes nas respectivas sínteses. Na Figura 3.4.2 é apresentada o comportamento do crescimento da absorbância em UV-Vis da bicamada (GPDDA/GPSS) em diferentes tempos de adsorção do GPDDA. O monitoramento do crescimento das bicamadas foi realizado em 270 nm por ser o comprimento de onda da principal banda de absorção do GPDDA, conforme observado para a dispersão do GPDDA (Figura 2.3.2).

Figura 3.4.2: Absorção em UV-Vis de cada bicamada UV-Vis de cada bicamada de (GPDDA/GPSS) depositada em diferentes tempos de adsorção do GPDDA.

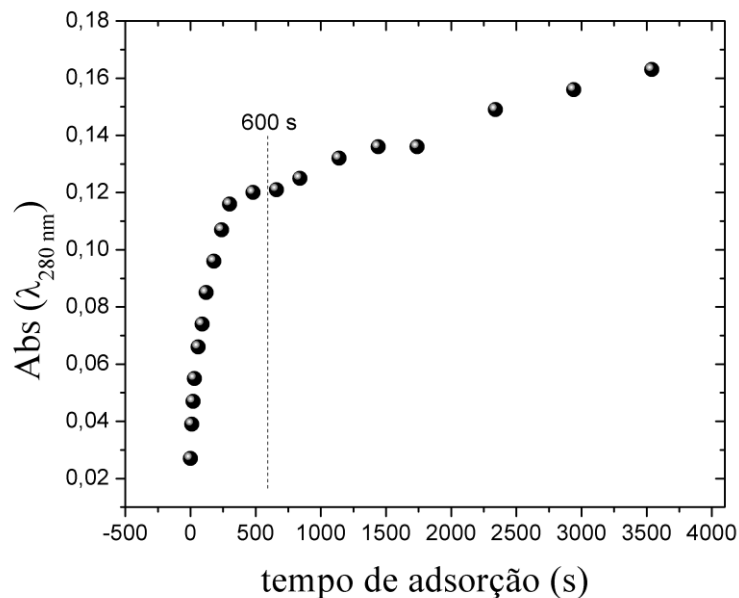


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Nesta cinética o tempo utilizado na adsorção GPSS foi o obtido a partir da cinética do GPSS (900 s) (Figura 3.4.1) e o tempo do GPDDA foi variado de 10 a 4440 s. Segundo o ponto de inflexão da curva, para o GPDDA o tempo estimado foi de aproximadamente 600 s, entretanto, a curva também apresentou aumento da absorbância após o ponto de inflexão, sendo assim, o tempo ideal de adsorção adotado foi aumentado para 900 s.

O tempo de adsorção ideal da Gox, do fungo *Aspergillus niger* (138800 unidades.g⁻¹, Sigma Aldrich) foi analisado utilizando o GPDDA para o crescimento da bicamada. Para isso, foi preparada uma solução de 1mg.mL⁻¹ de Gox em tampão fosfato de pH = 6,3. A Figura 3.4.3 apresenta o comportamento do crescimento da absorbância em UV-Vis da Gox dada pela absorção em UV-Vis de cada bicamada de (GPDDA/Gox) em diferentes tempos de adsorção da Gox. O monitoramento do crescimento da bicamada foi realizado em 280 nm por ser o comprimento de onda da principal banda de absorção da Gox (Figura 2.4.1).

Figura 3.4.3: Absorção em UV-Vis de cada bicamada UV-Vis de cada bicamada de (GPDDA/Gox) depositada em diferentes tempos de adsorção do Gox.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

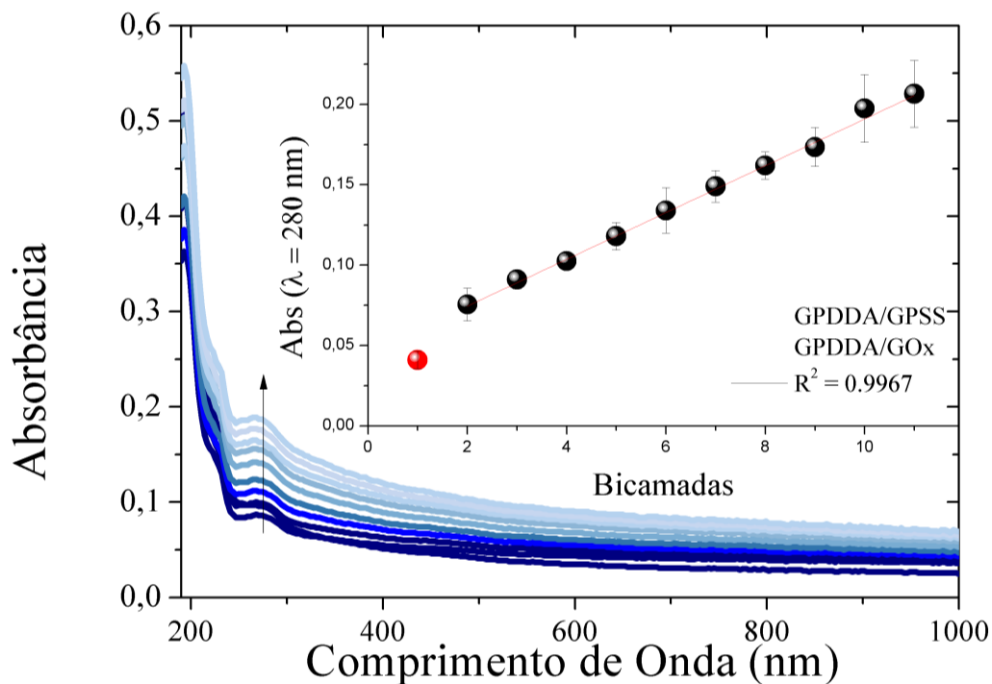
Nesta cinética o tempo de adsorção do GPDDA foi o estimado na cinética do GPDDA (900 s) (Figura 3.4.2) e o tempo de adsorção da Gox foi variado de 10 a 3540 s. O ponto de inflexão da curva ocorreu em torno de 400 s, mas semelhante ao GPSS e ao GPDDA, a curva após o ponto de inflexão a absorbância não permaneceu constante, sendo assim, o tempo ideal de adsorção adotado para a Gox foi de 600 s.

Caracterização do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)_n

O desempenho de um biossensor eletroquímico está diretamente relacionado com a capacidade da enzima em reconhecer o analito e catalisar as reações redox, de modo que essas reações sejam mensuráveis analiticamente. Para isso, confirmar a imobilização da enzima nos filmes com sua estrutura conformacional preservada é de extrema relevância, para garantir que sua atividade catalítica seja desempenhada no biossensoriamento.

Primeiramente, foi avaliado o comportamento do crescimento do filme LbL contendo GPDDA, GPSS e Gox. Para esta análise, foram utilizados os tempos determinados no estudo cinético de crescimento das bicamadas mencionadas anteriormente. Como o desempenho de um biossensor enzimático está associado à eficiência na imobilização da biomolécula, o comportamento do crescimento do filme LbL foi monitorado pela absorbância das bicamadas em UV-Vis no λ da principal banda da Gox (280 nm). Na Figura 3.4.4 está apresentada os espectros de absorbância UV-vis das bicamadas formando a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀. No gráfico inserido é apresentado o crescimento da absorbância das bicamadas no λ da principal banda da Gox (280 nm).

Figura 3.4.4: Espectros UV-Vis das bicamadas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀. Inserido: crescimento da absorção das bicamadas no λ da principal banda da Gox (280 nm).



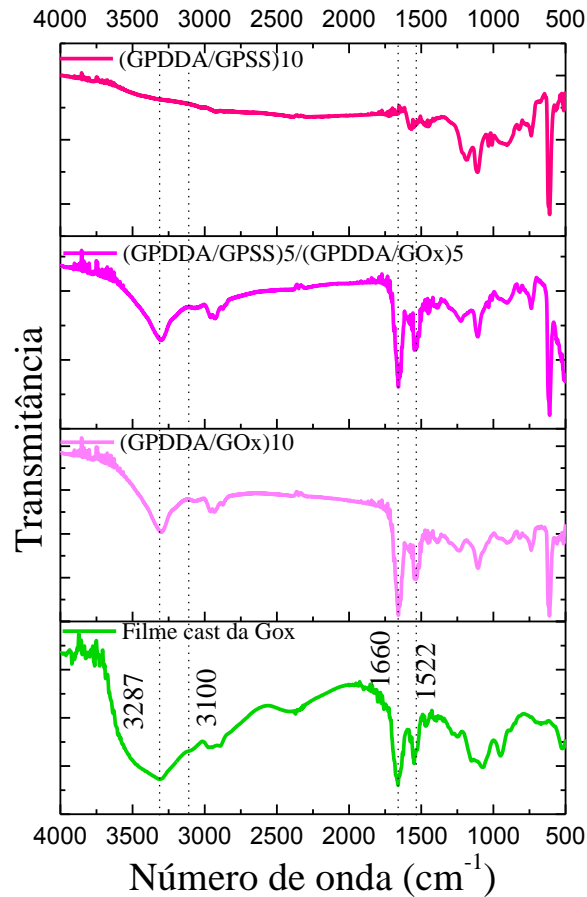
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A primeira bicamada representada em vermelho no espectro de absorvância do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀ apresenta absorção em 230 nm atribuída à absorção $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C do anel benzênico presente na estrutura do PSS (JIANG; BABA; ADVINCULA, 2007) presente no GPSS. Esta bicamada foi incluída na formação do filme após medidas eletroquímicas exploratórias confirmarem a melhora na detecção do analito, tanto no aumento de corrente, quanto na reprodutibilidade do biossensor. As demais bicamadas são formadas por (GPDDA/Gox) representadas pelos espectros de absorvância (linha azul), os quais apresentaram absorção em 280 nm atribuída às transições eletrônicas dos orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ das ligações C=C dos aminoácidos cíclicos evidenciando a Gox na estrutura do filme (MANSUR; MANSUR; GONZÁLEZ, 2011). Como a imobilização da enzima é muito relevante para o biossensoriamento, o crescimento do filme foi analisado monitorando da absorvância em 280 nm e apresentou um comportamento linear da absorvância em função das bicamadas, indicando que praticamente a mesma quantidade de material é depositada em cada bicamada. Entretanto, mesmo com as 10 bicamadas, a quantidade de material depositado no filme não foi suficiente para observar as outras bandas características da Gox (bandas menos intensas em 380 e 454 nm) observadas no espectro da solução (Figura 2.4.1).

A imobilização da Gox na estrutura dos filmes também foi avaliada pelos espectros FTIR dos filmes (GPDDA/Gox)₁₀ e (GPDDA/GPSS)₅/(GPDDA/Gox)₅. Na Figura 3.4.5 são apresentados os espectros de FTIR dos filmes depositados por LbL com arquiteturas (GPDDA/Gox)₁₀, (GPDDA/GPSS)₅/(GPDDA/Gox)₅, (GPDDA/GPSS)₁₀ e de um filme *cast* da Gox depositados em substratos de silício puro. Ressaltamos que as arquiteturas utilizadas para esta análise foram escolhidas para intensificação do sinal FTIR e diferem das arquiteturas utilizadas para a fabricação dos biossensores.

Para a enzima, a presença da banda em 3287 cm⁻¹ é atribuída ao estiramento das ligações N-H referente à amida A e a banda em 3100 cm⁻¹ é referente à amida B presentes na estrutura da Gox. Entretanto, a principal evidência da imobilização da Gox nos filmes (GPDDA/Gox)₁₀ e (GPDDA/GPSS)₅/(GPDDA/Gox)₅ foi verificada pela banda em 1660 cm⁻¹ atribuída ao estiramento das ligações C=O das ligações peptídicas na estrutura da proteína da amida I e a banda em 1522 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação C-N e também à deformação no plano das ligações N-H dos grupos peptídeos (LIANG; ZHUOBIN, 2003).

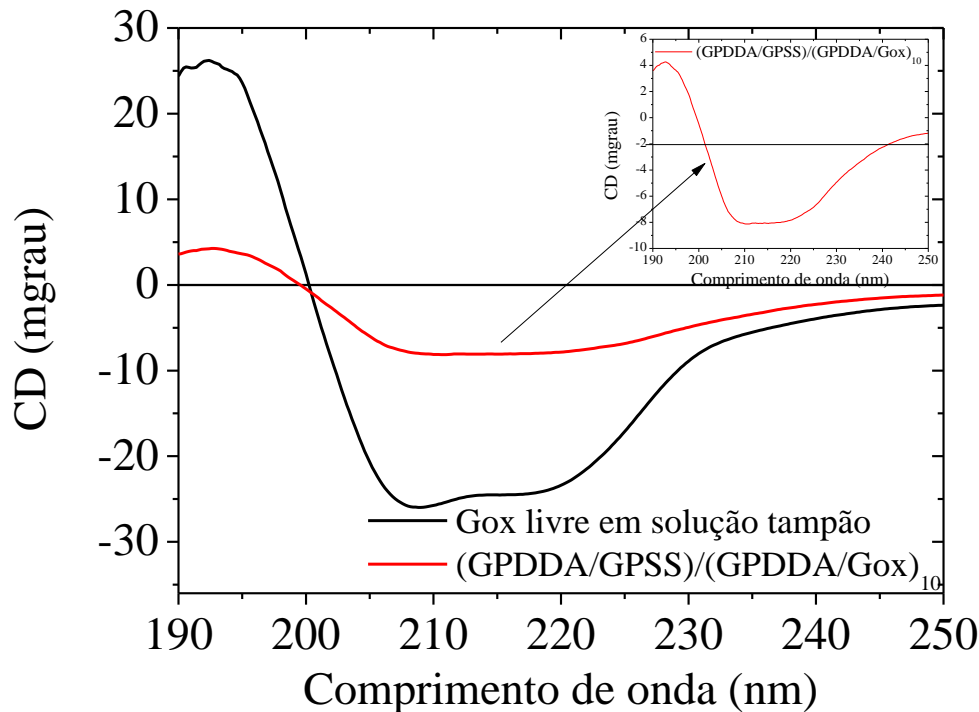
Figura 3.4.5: Espectros de FTIR dos filmes LbL com arquiteturas $(\text{GPDDA}/\text{Gox})_{10}$, $(\text{GPDDA}/\text{GPSS})_5/(\text{GPDDA}/\text{Gox})_5$, $(\text{GPDDA}/\text{GPSS})_{10}$ e de um filme cast da Gox depositados em substratos de silício puro.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A conservação da conformação da estrutura da Gox nos filmes LbL foi avaliada por CD. Para isso, foi obtido um espectro CD da Gox livre em solução tampão para comparação. Os espectros CD obtidos da Gox livre em solução tampão e imobilizada no filme LbL de arquitetura $(\text{GPDDA}/\text{GPSS})/(\text{GPDDA}/\text{Gox})_{10}$ estão apresentados na Figura 3.4.6. Ressaltamos que foram usadas para esta caracterização dez bicamadas de $(\text{GPDDA}/\text{Gox})$ para intensificar o sinal CD, esta arquitetura não corresponde às arquiteturas utilizadas para a fabricação dos biossensores.

Figura 3.4.6: Espectro CD da Gox livre em solução tampão pH = 6,3 (curva em preto) e do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀ (curva em vermelho). Inserido: espectro CD amplificado do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀.



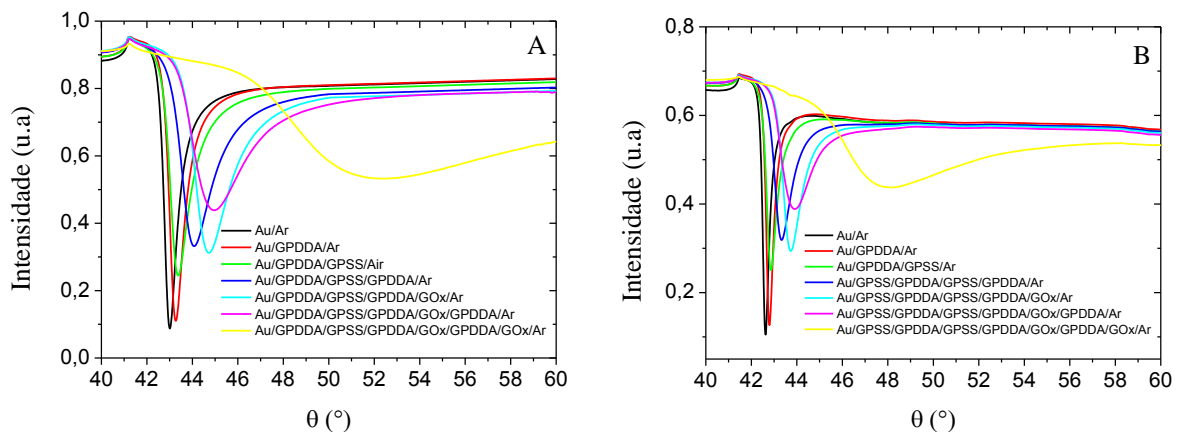
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O espectro da Gox livre em solução tampão revelou dois mínimos, em 208 e 218 nm e um máximo em 193 nm, sendo estes valores muito próximos do espectro da Gox nativa, o qual apresenta dois mínimos, em 222 e 208 nm e um máximo em 193 nm, característica da estrutura α -hélice predominante (TELLECHEA et al., 2012). Já a Gox imobilizada no filme apresentou no espectro duas bandas negativas em 220 e 210 nm e uma positiva em 193 nm, evidenciando que a estrutura predominantemente α -hélice da enzima foi preservada na imobilização nos filmes. Em um estudo realizado anteriormente pelo grupo a Gox precisou ser incorporada em lipossomo para preservar sua estrutura conformacional (GRAÇA et al., 2014). Neste trabalho, o espectro CD do filme LbL comprovou que as nanofolhas de grafeno sintetizadas foram excelentes para a imobilização da Gox por LbL, com grande potencial para aplicação em outras biomoléculas.

A espessura de cada camada depositada por LbL para formar a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ foi medida por SPR. Esta arquitetura foi escolhida por ser a arquitetura do biossensor com filme LbL com melhor desempenho (este resultado será discutido na Seção Análises eletroquímicas para o filme LbL

(GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Go_x)₂ – Voltametria Cíclica e Amperometria). A Figura 3.4.7 apresenta os espectros SPR para o sensor de ouro a cada camada depositada do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GO_x)₂ excitada pelo laser com (a) comprimento de onda (λ) = 670 nm e (b) λ = 785 nm, o meio escolhido para as medidas foi o ar.

Figura 3.4.7: Espectros SPR para o sensor de ouro a cada camada depositada do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GO_x)₂ excitada pelo laser com (a) comprimento de onda (λ) = 670 nm e (b) λ = 785 nm, ambas medidas realizadas no ar.

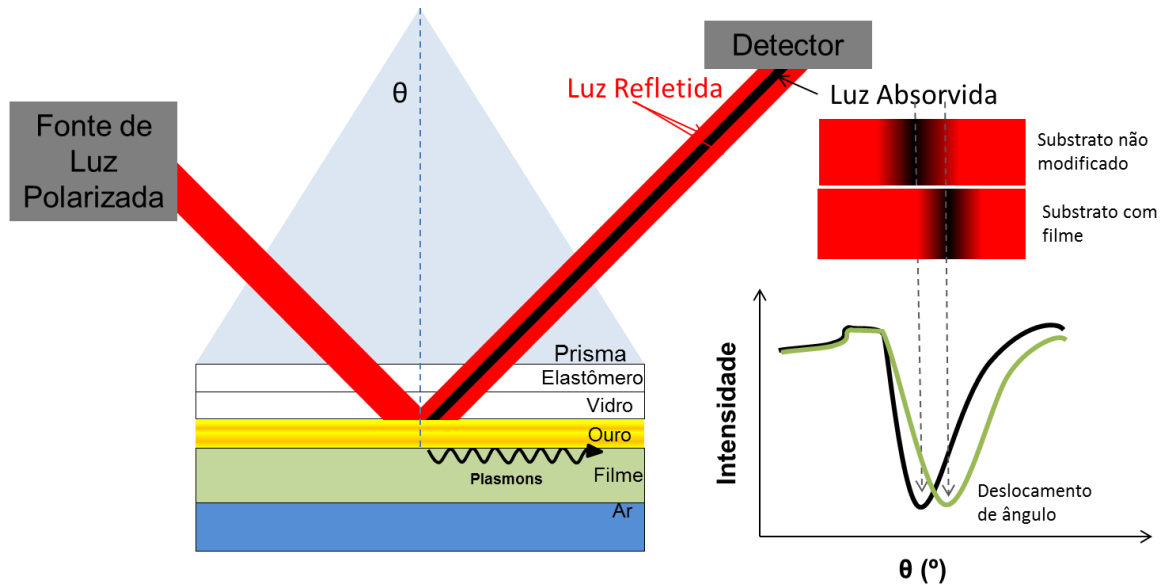


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Basicamente, a técnica SPR está baseada na reflexão total de uma luz polarizada. A luz polarizada é incidida em um meio denso e alcança uma interface entre este meio denso e um meio de baixa densidade óptica (por exemplo, o ar), com isso, a luz reflete de volta para o meio denso, para finalmente ser detectada. Entretanto quando uma fina camada de um metal é adicionado à interface, em um ângulo específico da luz incidente, uma componente desta luz (onda ou campo evanescente) causa excitações eletromagnéticas na forma de propagação dos elétrons livres do metal (plasmons) na interface entre o metal e um meio dielétrico. Este efeito é detectado quando a intensidade da luz refletida é diminuída (REBECCA J. GREEN et al., 2000). O ângulo de reflexão é deslocado quando a superfície do metal é modificada. A Figura 3.4.8 apresenta um esquema ilustrativo de um instrumento típico de SPR.

Na medida realizada, o meio denso é formado pelo prisma de quartzo, um elastômero, substrato formado por uma fina camada de ouro sobre vidro (ambos com espessura controlada) e o filme depositado sobre o ouro. O ar foi utilizado como meio de baixa densidade.

Figura 3.4.8: Representação esquemática de um instrumento típico de SPR.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A espessura das camadas foi analisada pelo deslocamento do ângulo de reflexão (θ) da luz quando a intensidade é mínima. O substrato de ouro (sem filme adsorvido) apresentou um ângulo mínimo de reflexão $\theta = 43,029^\circ$ ($\lambda = 670$ nm) e $42,645^\circ$ ($\lambda = 785$ nm). A Tabela 3.4.1 apresenta os ângulos mínimos para cada camada depositada e sua respectiva espessura. A espessura total do filme foi de $19,80 \pm 0,28$ nm, estimada utilizando o software Winspall 3.02. A espessura da primeira camada de Gox foi de aproximadamente 5 nm, consistente com a dimensão nativa da enzima ($6,0 \times 5,2 \times 7,7$ nm) (YOON; KIM, 2000).

Tabela 3.4.1: Ângulos de reflexão do espectro SPR a cada camada depositada e espessura de cada camada do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂.

Camada	Ângulo de reflexão θ (°)		Espessura média calculada (nm)
	$\lambda = 670$ nm	$\lambda = 785$ nm	
Ouro	43,029	42,645	-
GPDDA	43,300	42,800	0,9
GPSS	43,377	42,828	0,8
GPDDA	44,074	43,340	2,1
Gox	44,737	43,786	5,0
GPDDA	45,008	43,923	1,0
Gox	52,272	48,100	10,0

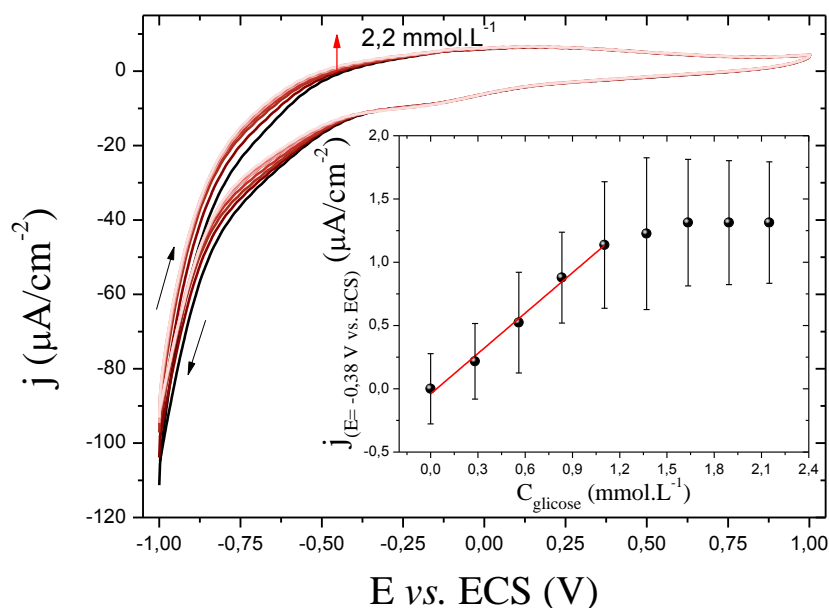
Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ – Voltametria Cíclica e Amperometria

A bicamada (GPDDA/GPSS) foi incluída na formação destes filmes após medidas eletroquímicas exploratórias confirmarem a melhora na detecção do analito, tanto no aumento de corrente, quanto na reprodutibilidade do biossensor. O aumento na corrente pode ser atribuído ao aumento da condutividade eletrônica quando o GPSS é adicionado à estrutura do filme, isto foi confirmado em medidas de resistência elétrica utilizando multímetro, na qual foi possível observar que o filme contendo GPSS apresenta maior condutividade.

Primeiramente, o biossensor desenvolvido com o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ foi avaliado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 3.4.9 apresenta os voltamogramas do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ em tampão fosfato (curvas em preto) e com sucessivas adições de glicose (curvas em marrom). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

Figura 3.4.9: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose (curvas em marrom). Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre 0,3 e 1,1 mmol.L⁻¹ e E = -0,38 V vs. ECS.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A varredura do potencial foi iniciada em um potencial negativo (-1,0 V *vs.* ECS) até o potencial máximo (1,0 V *vs.* ECS) (varredura reversa). Os voltamogramas do biossensor desenvolvidos com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ não apresentaram picos redox associados com a reação eletroquímica da oxidação da glicose catalisada pela Gox. Sendo assim, o desempenho do biossensor com a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ foi analisado considerando o pico de oxidação em -0,38V *vs.* ECS, por ser o pico encontrado para as demais arquiteturas dos filmes LbL discutidas a seguir (na arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂). O biossensor desenvolvido apresentou uma boa linearidade na faixa de trabalho entre 0,3 e 1,1 mmol.L⁻¹, limite de detecção de 0,1 mmol.L⁻¹ (3R/S) e sensibilidade de 1,1 $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}$. Entretanto, este biossensor apresentou uma baixa reprodutibilidade evidenciada pelo elevado desvio padrão das triplicatas.

Quando analisado por Amperometria, o biossensor não apresentou resposta de variação de corrente reprodutível e estável com as adições de glicose (resultados não apresentados). Desta forma, a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁ foi classificada como um biossensor de baixo desempenho.

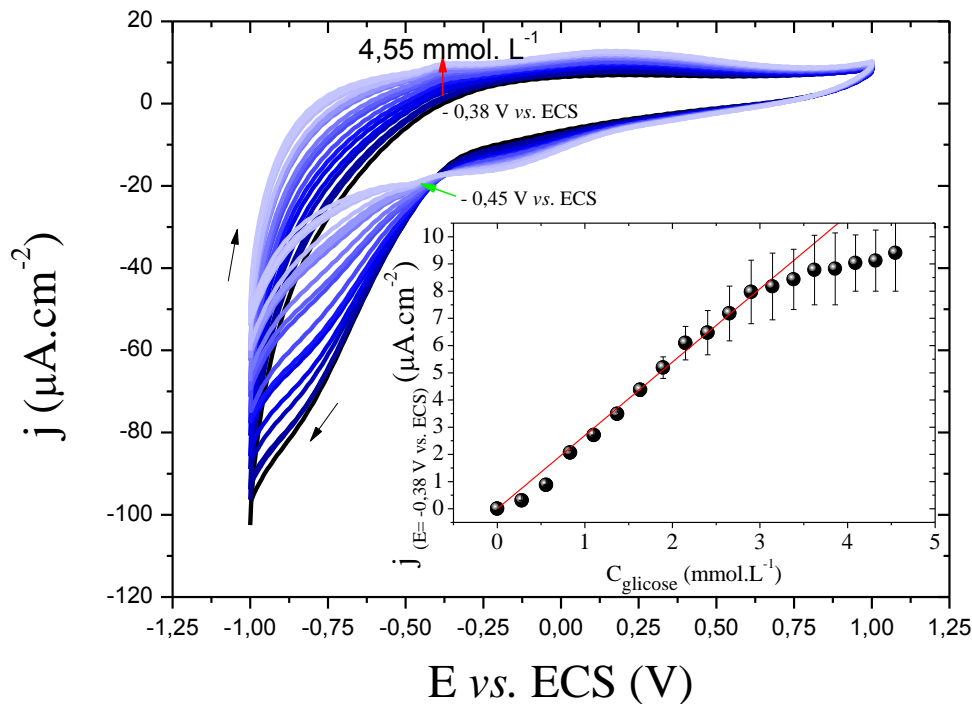
Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ – Voltametria Cíclica e Amperometria

O desempenho do biossensor desenvolvido com o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ foi avaliado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 3.4.10 apresenta os voltamogramas do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ em tampão fosfato (curva em preto) e com sucessivas adições de glicose (curvas em azul). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

A varredura do potencial foi iniciada em um potencial negativo (-1,0 V *vs.* ECS) até o potencial máximo (1,0 V *vs.* ECS) (varredura reversa), gerando um pico discreto de corrente anódica em -0,38 V *vs.* ECS atribuído à conversão de FADH₂ a FAD, enquanto que na varredura direta (de 1,0 a -1,0 V *vs.* ECS) gerou um pico de corrente catódica em -0,45 V *vs.* ECS atribuído à conversão do FAD a FADH₂. Resultados semelhantes foram reportados na literatura para os potenciais de oxidação e redução (HWA; SUBRAMANI, 2014) (BAI et al., 2014), visto que o pico de potencial redox da enzima é dependente do pH da solução

(LIANG; ZHUOBIN, 2003)(UNNIKRISHNAN; PALANISAMY; CHEN, 2013b). Esta arquitetura apresentou limite de detecção $46 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e sensibilidade de $7,6 \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$, com faixa linear de trabalho entre $0,2$ e $2,9 \text{mmol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$). O melhor desempenho desta unidade sensorial, quando comparada com a anterior, sugere que o desempenho do biossensor está relacionado com a quantidade de enzima imobilizada, como evidenciado nos resultados de crescimento do filme monitorado por UV-Vis (Figura 3.4.4).

Figura 3.4.10: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de glicose (curvas em azul). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,3 \text{mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre $0,2$ e $2,9 \text{mmol.L}^{-1}$ e $E = -0,38 \text{V vs. ECS}$.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Devido à maior estabilidade desta configuração do biossensor foi obter a área ativa do eletrodo a partir da equação de Randles–Sevcik (10) para as diferentes velocidades de varredura:

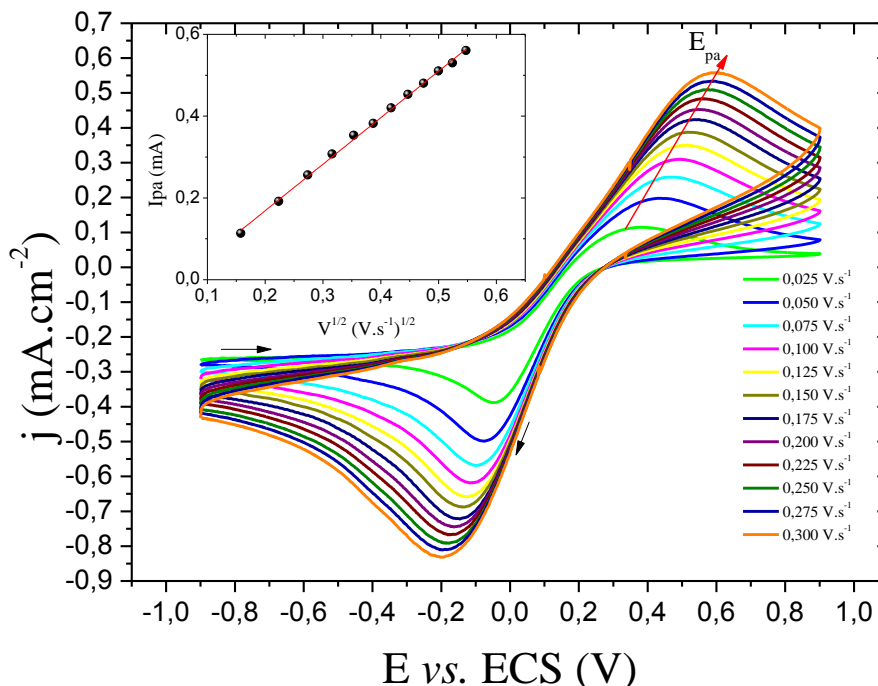
$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 \cdot A \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot n^{3/2} \cdot v^{1/2} \quad (10)$$

Na qual, I_p é corrente de pico (A), A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração da solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ (mol.cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão da solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), n é número de elétrons envolvidos e v é a velocidade de varredura (V.s^{-1}). A Figura 3.4.11 apresenta os voltamogramas em diferentes velocidades de varredura para o

filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂. No gráfico inserido é apresentado o comportamento da corrente de pico anódico em função da raiz da velocidade de varredura.

O comportamento apresentado pela corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura foi linear ($R^2 = 0,998$), desta forma, a equação de Randles–Sevcik foi utilizada para o cálculo da área ativa do eletrodo utilizando a inclinação da reta como $I_{pa}/v^{1/2} (A.V^{-1/2}.s^{1/2})$. A concentração de $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ utilizada foi de $5 \times 10^{-6} \text{ mol.cm}^{-3}$, o coeficiente de difusão foi de $6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.s^{-1}$ e o número de elétrons foi 1, com isso, a área ativa calculada para este eletrodo foi de $0,340 \text{ cm}^2$ e o ITO puro (sem filme) apresentou a área ativa de $0,124 \text{ cm}^2$. O filme depositado aumentou a área ativa do eletrodo em aproximadamente 2,7 vezes. Weng e colaboradoras (WENG et al., 2013) e Yu e colaboradores, reportaram resultados semelhantes, um aumento da área ativa de 1,4 vezes para o eletrodo com um filme LbL de nanofolhas de grafeno depositado. Desta forma, este resultado comprova que eletrodo modificado com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ é muito promissor para o aumento do desempenho no biossensoriamento.

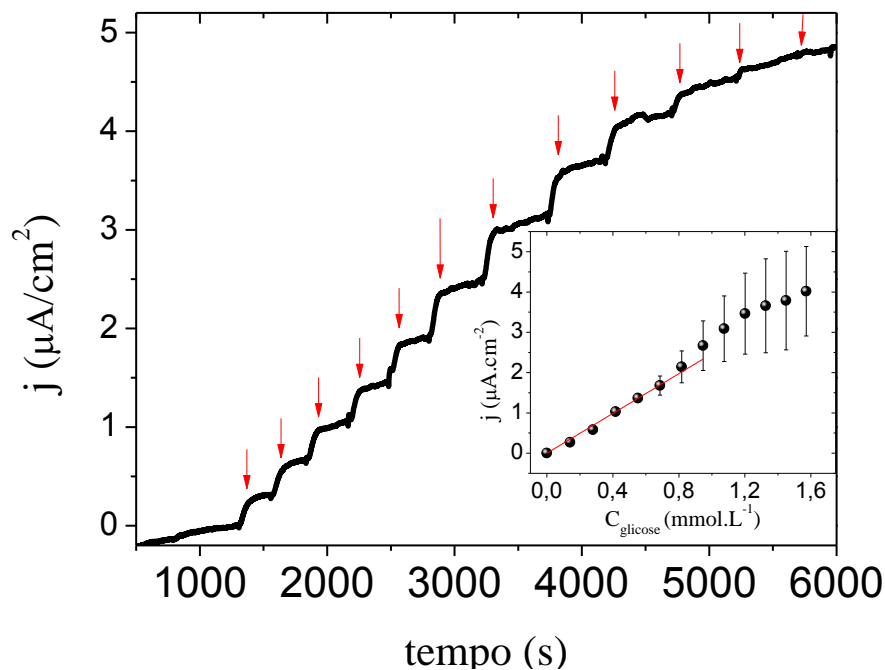
Figura 3.4.11: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ em diferentes velocidades de varredura (0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250, 0,275 e 0,300 V.s⁻¹) em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 contendo $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ 10 mmol.L⁻¹, solução (1:1). Inserido: corrente de pico anódico em função da raiz da velocidade de varredura.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O desempenho do biossensor fabricado com o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ também foi avaliado por Amperometria. Usualmente, o potencial utilizado para um biossensor na Amperometria é o potencial de pico anódico ou catódico encontrado por Voltametria Cíclica para a enzima. Entretanto, o uso de potenciais elevados implica em uma menor seletividade do biossensor. Como os nanomateriais permitem a redução do potencial de trabalho (CASH; CLARK, 2010), foram testados potenciais menores (resultados não apresentados). O menor potencial no qual houve uma resposta estável e reprodutível na detecção de glicose para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ foi -0,3 V vs. ECS. A Figura 3.4.12 apresenta a resposta amperométrica do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ em potencial de -0,3 V vs. ECS com sucessivas adições de glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentado a curva analítica das adições de glicose.

Figura 3.4.12: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ depositado sobre ITO, medida realizada em -0,3 V vs. ECS com sucessivas adições glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear entre 0,1 e 1,0 mmol.L⁻¹.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Após a estabilização da corrente medida no eletrodo com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ depositado foram adicionadas as alíquotas de glicose. Cada adição de glicose gerou um aumento rápido da corrente anódica proveniente do processo de oxidação da glicose e na direta conversão de FADH₂ a FAD, como evidência de transferência direta de elétrons (LUCKARIFTHEATHER; ATANASSOV; JOHNSON, 2014). O aumento da corrente anódica foi linear com a concentração de glicose entre 0,1 e 1,0 mmol.L⁻¹ (R²= 0,999). Este biossensor apresentou limite de detecção de 13,4 μmol.L⁻¹ (S/R = 3) e sensibilidade de 2,47 μA.cm⁻².mmol⁻¹.L. O desempenho deste biossensor foi comparado com o desempenho dos biossensores com filme LbL utilizando grafeno e Gox reportados na literatura. A Tabela 3.4.2 apresenta os valores encontrados na literatura de limite de detecção e sensibilidade para eletrodos com filmes LbL de nanofolhas de grafeno e Gox.

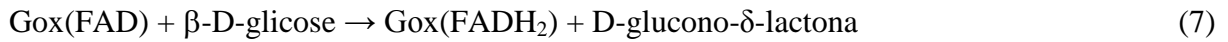
Tabela 3.4.2: Comparação do desempenho analítico do biossensor ITO/(GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ com outros similares da literatura.

Eletrodos Modificados	Potencial	Limite de detecção (μmol.L ⁻¹)	Sensibilidade (μA.cm ⁻² .mmol ⁻¹ .L)
AuQC/chit+(NG+Gox)/PSS-/chit+(NG+Gox) (BARSAN et al., 2014)	-0,2 V vs. Ag/AgCl	64	10,5
GCE-ATP-GNs-AuNPs-Gox (SHERVEDANI; AMINI, 2014)	--	9,3 e 4,1	47,6
GCE/(PEI/PAA-graphene)3(PEI/Gox)5(PEI/GA) ₄ (ZENG et al., 2010)	+0,9 V vs. Ag/AgCl	168	0,261
GCE/{ILRGO/S-RGO}5/Gox/Nafion (GU et al., 2012)	-0,2 V vs. Ag/AgCl	3,3	0,0000718
ITO/GPDDA/GPSS/(GPDDA/Gox) ₂ (este trabalho)	-0,3 V vs. SCE	13,4	2.47

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

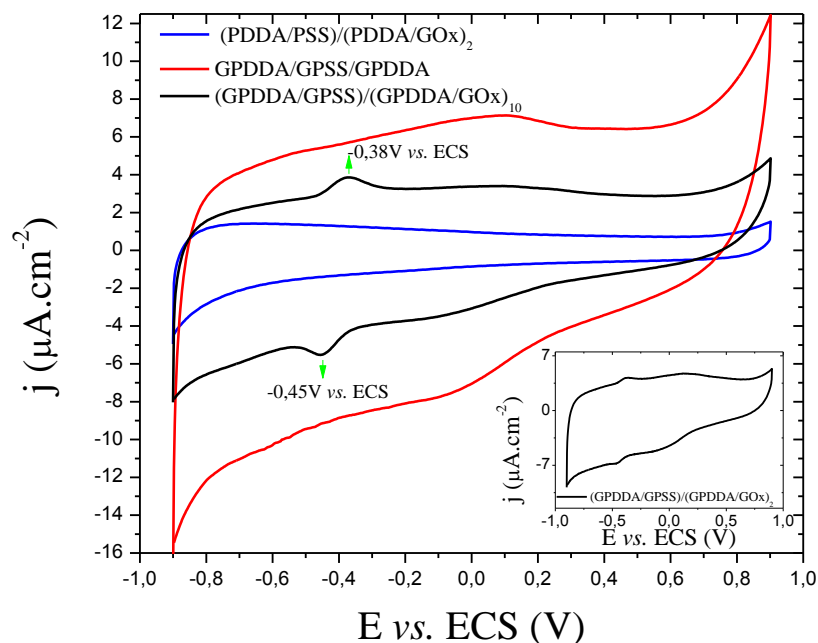
De acordo com os valores reportados na Tabela 3.4.2, o desempenho para o biossensor desenvolvido com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ é superior ou muito próximo aos apresentados na literatura. Deste modo, demonstramos que o biossensor fabricado com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ depositado sobre ITO é competitivo com os outros reportados recentemente na literatura, com a vantagem de utilizar um eletrodo relativamente mais barato e possível de ser aplicável para substratos flexíveis e descartáveis.

O desempenho do biossensor é fortemente influenciado pelo mecanismo de detecção do analito. Para a glicose, as reações envolvidas são (já apresentadas no Capítulo 1):



Os biossensores de glicose de primeira e segunda geração realiza a detecção da glicose através da detecção de O_2 ou H_2O_2 . Já os biossensores de terceira geração detectam a oxidação FADH_2 a FAD , a qual gera dois elétrons conduzidos diretamente para o eletrodo, este processo é denominado transferência direta de elétrons (DET). Este processo foi verificado para o filme LbL GPDDA/GPSS/(GPDDA/GOx)₂ por Voltametria Cíclica em tampão na ausência de oxigênio, pela presença dos picos anódicos e catódicos referente a oxidação e redução da enzima. Na Figura 3.4.13 estão apresentados os voltamogramas dos filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂, (GPDDA/GPSS/GPDDA), (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₁₀ medidos em tampão fosfato pH = 6,3 com saturação de N_2 .

Figura 3.4.13: Voltamogramas dos filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂, (GPDDA/GPSS/GPDDA), (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₁₀. Gráfico inserido: ampliação do voltamograma do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂. Todas as medidas foram realizadas em tampão fosfato pH = 6,3 com saturação de N_2 .

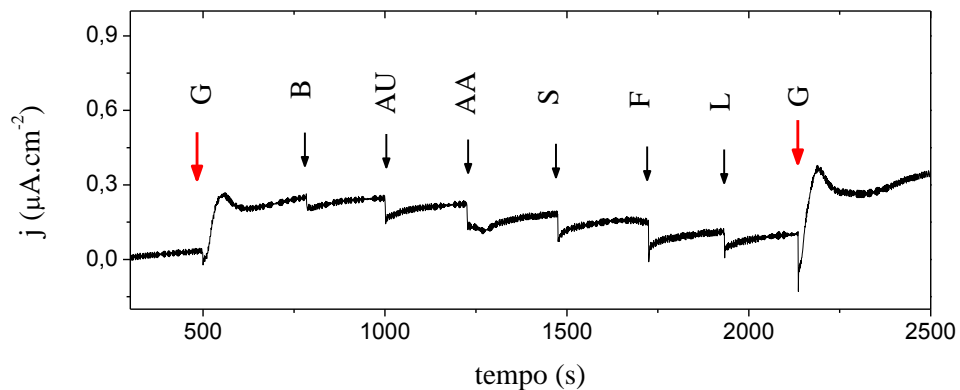


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O voltamograma do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ apresentou os picos de oxidação e redução da enzima, entretanto pouco intenso, atribuído à espessura (19,8 nm, medido por SPR) e portanto à quantidade de Gox neste filme. Sendo assim, foi aumentado o número de bicamadas contendo a Gox (GPDDA/Gox) para 10, formando o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₁₀. Este filme apresentou claramente os dois picos característicos de DET, um pico catódico em -0,45 V vs. ECS atribuído à conversão do FAD à FADH₂ e um pico anódico em -0,38 V vs. ECS referente à conversão FADH₂ à FAD (BAI et al., 2014; HWA; SUBRAMANI, 2014). Os picos bem definidos nestes valores de potenciais são característica de DET e classifica o biossensor como de terceira geração (GORTON et al., 1999). O tipo de interação das nanofolhas de grafeno com o surfactante utilizado para funcionalização das nanofolhas são determinantes para a DET. A funcionalização não pode gerar defeitos na estrutura do grafeno (PARVIZ et al., 2012). A funcionalização do GPSS ocorre pela interação π - π entre o grafeno e o PSS (DU et al., 2012). Já a funcionalização no GPDDA pode ocorrer tanto pela interação π - π entre o grafeno (YANG; ROCHETTE; SACHER, 2005), mas também pela interação eletrostática com residual -COO⁻ nas nanofolhas de grafeno (ROUSE; LILLEHEI, 2003).

O filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ também foi analisado na presença dos interferentes comumente encontrados em fluídos corpóreos, em alimentos e fármacos, como o AU, AA, L, S e F. A Figura 3.4.14 apresenta a resposta amperiométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ para os interferentes adicionados em tampão fosfato pH = 6,3.

Figura 3.4.14: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂, medida realizada em -0,3 V vs. ECS com adições de 100 μ L de glicose (G), ácido úrico (AU), ácido ascórbico (AA), lactose (L), sacarose (S) e frutose (F) 20 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato (pH 6.3).

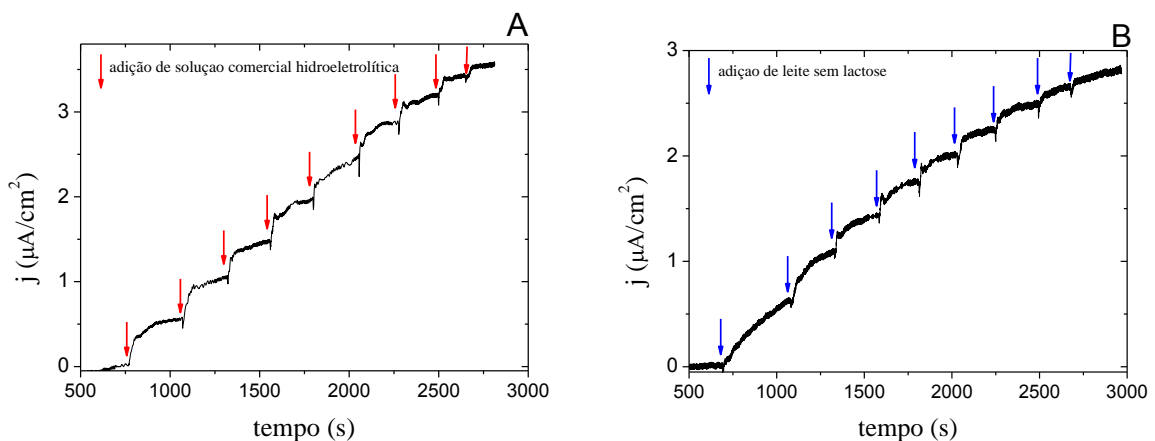


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Primeiramente, foi adicionado 100 μL de glicose 20 mmol.L^{-1} gerando um aumento na corrente (corrente anódica) típica da detecção da glicose por este biossensor, em seguida, foram adicionados 100 μL de tampão fosfato, AU, AA, L, S e F, todos gerando uma pequena diminuição na corrente (corrente catódica). Por fim, foi adicionado novamente 100 μL de glicose 20 mmol.L^{-1} , gerando um aumento na corrente. Sendo assim, foi confirmado que a glicose pode ser detectada mesmo na presença destes interferentes, sem efeito significativo destes na detecção da glicose.

Para avaliar a eficiência deste biossensor na detecção de glicose em amostra reais, o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ foi avaliado na detecção de glicose em amostra de leite sem lactose vendido comercialmente e uma solução hidroeletrólítica (Pedyalite®) utilizada para prevenção da desidratação em casos de diarreia e vômitos. A Figura 3.4.15 apresenta a resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ após sucessivas adições de 100 μL de (a) solução hidroeletrólítica comercial (diluída dez vezes) e (b) leite sem lactose (diluído 10 vezes), medida realizada em tampão fosfato pH = 6,3.

Figura 3.4.15: Resposta amperométrica do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ após sucessivas adições de 100 μL de (a) solução hidroeletrólítica comercial (diluída dez vezes) e (b) leite sem lactose (diluído 10 vezes), medida realizada em tampão fosfato pH = 6,3, em -0,3 V vs. ECS.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As adições do leite sem lactose e da solução hidroeletrólítica comercial geraram corrente anódica evidenciando a presença de glicose. Ressaltamos que as medidas foram realizadas com as amostras sem tratamento prévio, como requerido em outros métodos de quantificação de glicose (MELLO; KUBOTA, 2002). A quantificação da glicose foi feita pela média dos valores de correntes obtidos nas cinco primeiras adições das amostras. Para a solução comercial hidroeletrólítica, houve um rápido aumento da corrente devido ao rápido

processo de oxidação da glicose. Já para o leite sem lactose, houve um lento aumento de corrente, principalmente nas primeiras adições, provavelmente relacionado com a dificuldade de diluição rápida do leite no tampão, devido ao leite ser uma suspensão de partículas coloidais hidratadas, micelas de caseína e gordura (ALEXANDER et al., 2002), mesmo assim foi possível determinar a quantidade de glicose. Para a solução hidroeletrólítica comercial o biossensor apresentou uma recuperação de 100,8 % e para o leite sem lactose apresentou uma recuperação de 88,8 %. Desta forma, o biossensor formado pelo filme LbL GPDDA/GPSS/(GPDDA/GOx)₂ se apresentou eficiente na detecção de glicose presente em amostra real. A Tabela 3.4.3 apresenta o desempenho do biossensor, com os valores de glicose indicados na embalagem dos produtos.

Tabela 3.4.3: Quantidade de glicose nas amostras reais especificada pelo fabricante e o desempenho do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₂ na análise de amostras reais.

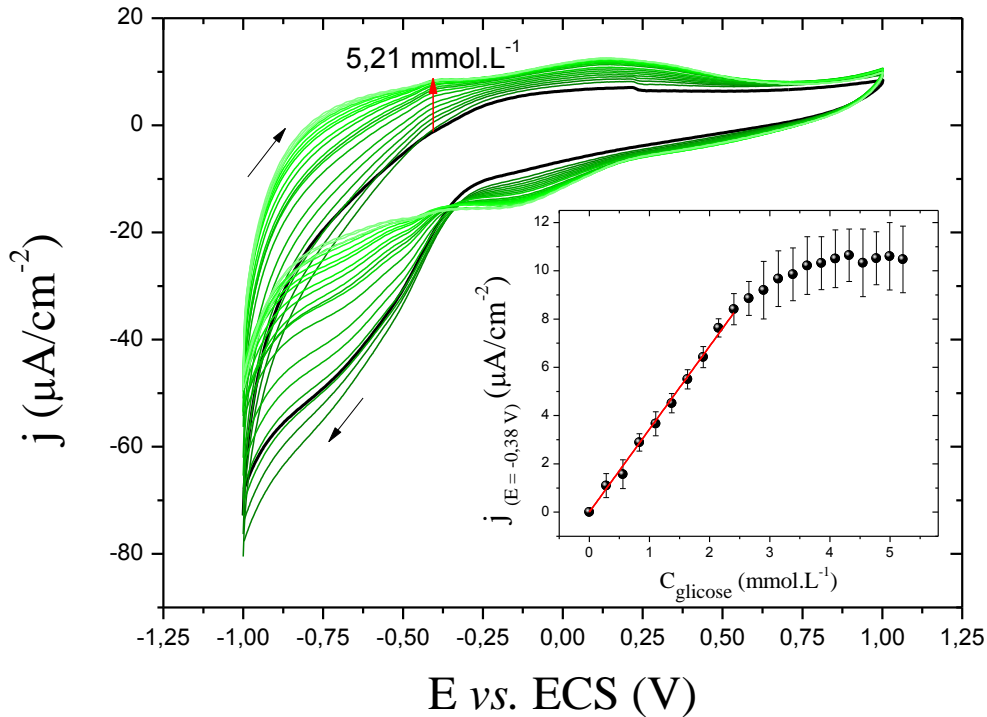
	Especificado pelo fabricante (g.L⁻¹)	Encontrado pelo biossensor (g.L⁻¹)	Recuperação do biossensor (%)
Solução hidroeletrólítica comercial	25	25,2 ± 0,8	100,8
Leite sem lactose	25	22,2 ± 3,4	88,8

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

Análises eletroquímicas para o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₅ – Voltametria Cíclica e Amperometria

Por fim, o desempenho do biossensor desenvolvido com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₅ foi avaliado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 3.4.16 apresenta os voltamogramas do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GOx)₅ em tampão fosfato (curva em preto) e com sucessivas adições de glicose (curvas em verde). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,3 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

Figura 3.4.16: Voltamogramas do filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₅ depositado sobre ITO em tampão (curva em preto) e sucessivas adições de 100 μL glicose 20 mmol.L^{-1} em tampão fosfato (pH 6,3) (curvas em verde). Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear entre 0,3 e 2,4 mmol.L^{-1} , $E = -0,30 \text{ V vs. ECS}$.



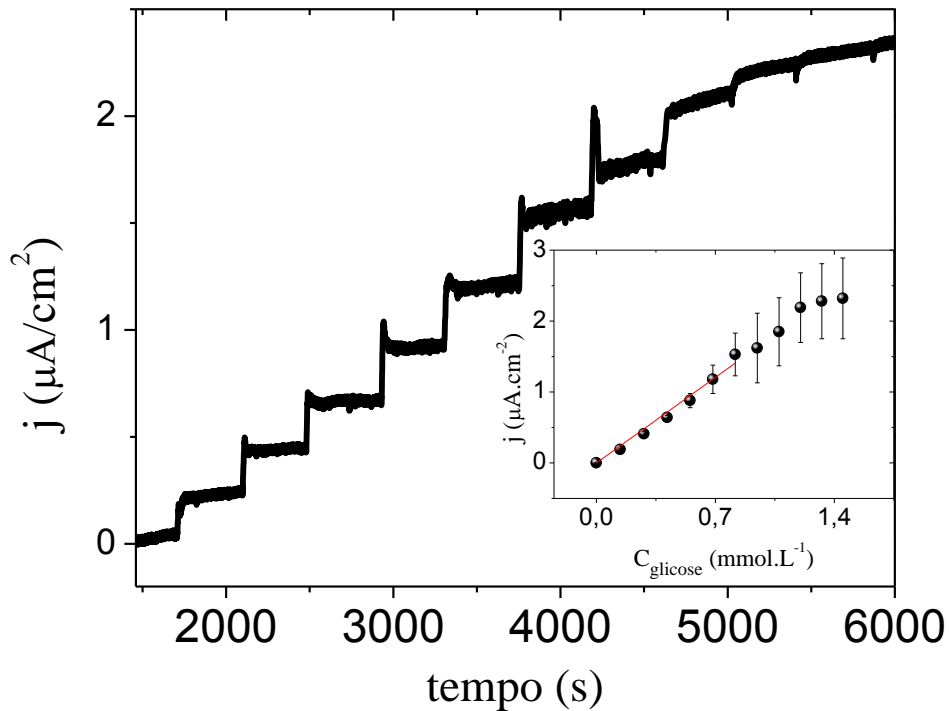
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O biossensor com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₅ foi analisado com os mesmos parâmetros dos biossensores com os filmes com 1 e 2 bicamadas de (GPDDA/Gox) e apresentou comportamento semelhante. Um pico de corrente anódica em $-0,38 \text{ V vs. ECS}$ atribuído à conversão de FADH_2 a FAD e um pico de corrente catódica em $-0,45 \text{ V vs. ECS}$ atribuído à conversão do FAD a FADH_2 . O biossensor desenvolvido apresentou uma boa linearidade na faixa linear de trabalho entre 0,3 e 2,4 mmol.L^{-1} , limite de detecção de 0,92 mmol.L^{-1} e sensibilidade de $3,5 \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ foram encontrados. Quando comparado com o filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂, seu desempenho foi inferior. Isto sugere que o aumento do número de bicamadas (GPDDA/Gox) pode dificultar o processo difusivo das espécies eletroativas e também pode impedir a reação do analito com a biomolécula das bicamadas mais internas, afetando o desempenho do biossensor.

O desempenho deste filme como biossensor amperiométrico também foi analisado. A Figura 3.4.17 apresenta a resposta amperométrica do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₅ em potencial de $-0,3 \text{ V vs. ECS}$ com sucessivas adições de

glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva analítica das adições de glicose.

Figura 3.4.17: Resposta amperométrica do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₅ depositado sobre ITO, medida realizada em $-0,3 \text{ V}$ vs ECS com sucessivas adições de $100 \mu\text{L}$ glicose 10 mmol.L^{-1} em tampão fosfato (pH 6.3). Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear entre $0,3$ e $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A corrente estabilizou em aproximadamente 1400 s , a cada adição de glicose, semelhante ao filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂, ocorreu um aumento rápido da corrente anódica proveniente do processo de oxidação da glicose e na direta conversão de FADH_2 . O aumento da corrente anódica é linear com a concentração de glicose entre $0,3$ e $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,991$), com limite de detecção de $0,110 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($S/R = 3$) e sensibilidade de $1,84 \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$. O desempenho deste biossensor quando comparado com o do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ foi inferior, isto sugere novamente que o aumento do número de bicamadas (GPDDA/Gox) pode dificultar no processo difusivo das espécies eletroativas, além disso, pode impedir a reação do analito com a biomolécula das bicamadas mais internas, afetando o desempenho do biossensor (BARSAN et al., 2014).

3.5 Conclusão Parcial dos Filmes LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)_n

O GPDDA e do GPSS depositados por LbL possibilitou imobilizar a Gox também por LbL, mantendo a estrutura conformacional e preservando a atividade biocatalítica da enzima, comprovada pelo espectro CD do filme (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₁₀. O melhor desempenho foi exibido pelo biossensor com a arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂. Por Amperometria, o limite de detecção foi de 13,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, mostrando-se uma técnica mais sensível. A partir desses resultados, o biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ se apresentou competitivo com os biossensores reportados na literatura. Este biossensor foi eficiente na detecção de glicose em meio contendo interferentes comumente encontrados em fluídos corpóreos, em alimentos e fármacos e na detecção de glicose em amostras reais, com recuperação de 100,8 % para a solução hidroeletrólítica comercial e 88,8 % para o leite sem lactose. A Tabela 3.5.1 apresenta o limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica para os biossensores com filmes LbL.

Tabela 3.5.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica dos biossensores amperométricos com filmes LbL.

Arquitetura LbL	Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Amperometria	
		Sensibilidade ($\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$)	Faixa analítica (mmol.L^{-1})
(GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₂	13,4	2,47	0,1-1,0
(GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox) ₅	110	1,84	0,3-0,8

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

CAPÍTULO 4: Filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox)_n

O Capítulo 4 consiste no desenvolvimento de biossensores de glicose a partir de filme LB contendo os mesmos materiais utilizados para fabricar os biossensores formados por filmes LbL (GPDDA, GPSS e Gox), com o objetivo de comparar dois métodos de fabricação de filmes no desempenho dos biossensores. Este Capítulo está estruturado inicialmente por uma introdução com base na literatura sobre fabricação de filmes LB utilizando nanofolhas de grafeno, seguida dos objetivos específicos, metodologia, resultados e discussões e conclusões desta parte do trabalho.

4.1 Introdução: revisão da literatura

O grafeno tem grande potencial para o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos e fotoeletrônicos devido às suas propriedades singulares de condução eletrônica (AVOURIS, 2010; SUN; CHANG, 2014; QIU et al., 2017). No entanto, esta excelente propriedade está relacionada a uma folha simples de grafeno, livre de defeitos, normalmente obtido por CVD, o qual requer equipamentos com custos relativamente elevados (ZAHARIE-BUTUCEL et al., 2017). Uma alternativa mais barata é a produção de nanofolhas de grafeno por rota química (HUMMERS JR; OFFEMAN, 1958b), por este método primeiramente é fabricado o GO a partir do grafite, um material de baixo custo, posteriormente o GO é reduzido, dando origem às nanofolhas de grafeno (KHAN et al., 2016). Contudo, estas nanofolhas possuem variação em tamanho, defeitos na estrutura e grupos funcionais oxigenados residuais, provenientes do método de obtenção do GO (MARCANO et al., 2010), diminuindo as propriedades de condução eletrônica. Além disso, quando estas nanofolhas são depositadas sobre substratos podem enruguar e dobrar, dificultando a comunicação eletrônica entre elas (YANG et al., 2014).

Neste sentido, utilizar a técnica LB para fabricar filmes para recobrir eletrodos se torna muito atraente. Esta técnica permite a fabricação de filmes ultrafinos altamente ordenados, com espessura controlada pelo número de monocamadas depositadas (ACIKBAS et al., 2017). Trabalhos na literatura reportam que o uso de GO depositados por LB no desenvolvimento de sensores pode ser muito eficiente (WEN et al., 2014), por permitir depositar filmes minimizando as sobreposição e enrugamento das nanofolhas. Kim e colaboradores (KIM et al., 2013) relacionaram regiões da isoterma de pressão de superfície

com imagens de microscopia eletrônica de varredura. Observaram que quando íons de tetrabutylamônio foi adicionado ao GO, há uma pressão máxima (fim da fase líquido-expandida) na qual os filmes devem ser depositados para evitar a sobreposição das nanofolhas. Segundo López-Díaz e colaboradores (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2013), transferir para os substratos as monocamadas de GO na fase de ordenação líquido-expandida forma um filme com nanofolhas interconectadas, sem sobreposição, viabilizando o uso em dispositivos eletrônicos. Outro trabalho reporta a fabricação de filmes LB ordenados e transparentes de GO com excelentes propriedades elétricas após redução térmica, com potencial uso na substituição do ITO (ZHENG; SHI; YANG, 2012).

Até o presente momento, não foi encontrado na literatura filmes de GO ou rGO fabricados por LB para a fabricação de um biossensor.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Desenvolver um biossensor fabricado a partir de filme LB contendo GPDDA, GPSS e Gox, mesmos materiais utilizados na fabricação do biossensor com filme LbL (apresentado no Capítulo 3) e comparar a influência do método de deposição no desempenho dos biossensores fabricados por estas duas técnicas de deposição de filmes.
- ✓ Caracterização das monocamadas de Langmuir compostas por GPDDA, GPSS e Gox (subfase).
- ✓ Fabricação e caracterização espectroscópica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox).
- ✓ Análise do desempenho dos biossensores formados por filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) em função do número de monocamadas na detecção de glicose por Voltametria Cíclica e Amperometria.
- ✓ Avaliar o desempenho do melhor biossensor fabricado com filme LbL na detecção de glicose na presença de interferentes e em amostras reais.

4.3 Materiais e Métodos

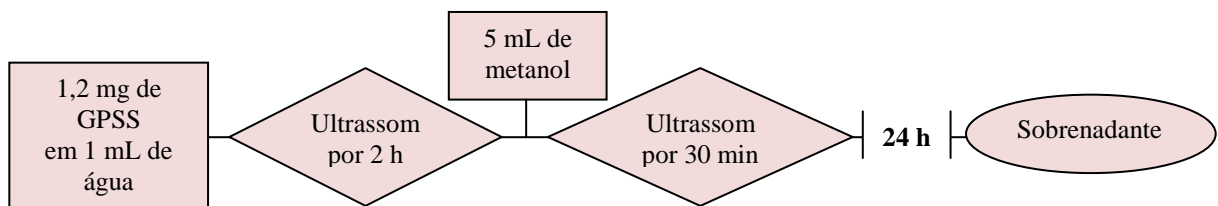
Preparação da dispersão de GPDDA

O GPDDA foi obtido a partir do GO sintetizado quimicamente, reduzido e funcionalizado com o polieletrólito PDDA, conforme descrito no Capítulo 2. Foi preparada uma dispersão metanólica de GPDDA $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, em seguida, a mesma foi mantida em banho ultrassônico por 2 h.

Preparação da dispersão de GPSS

O GPSS também foi obtido a partir do GO sintetizado quimicamente, reduzido e funcionalizado com o polieletrólito PSS, conforme descrito no Capítulo 2. Para a dispersão do GPSS foi preparada primeiramente uma dispersão de GPSS $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ em água mantida em banho ultrassônico por 1,5 h. Em seguida, nesta dispersão aquosa foi adicionado metanol para formar uma mistura metanol:água (5:1) e mantida em banho ultrassônico por 30 minutos. A dispersão final foi mantida em repouso por 24 h e finalmente o sobrenadante foi retirado e utilizado para a fabricação dos filmes LB. A Figura 4.3.1 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo da dispersão do GPDDA.

Figura 4.3.1: Fluxograma do procedimento de preparo da dispersão do GPDDA.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Preparação da solução de Gox

A solução da Gox $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ foi preparada em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , pH = 6,3. É importante salientar que concentrações menores de Gox foram testadas, mas os biossensores formados não apresentaram respostas amperométricas estáveis com a adição de glicose.

Procedimento de limpeza dos substratos

Os substratos de ITO foram limpos cuidadosamente com clorofórmio e mantidos em banho ultrassônico em álcool isopropílico por 15 min. Já os substratos de silício foram limpos com clorofórmio e mantidos em banho ultrassônico também em clorofórmio por 30 min.

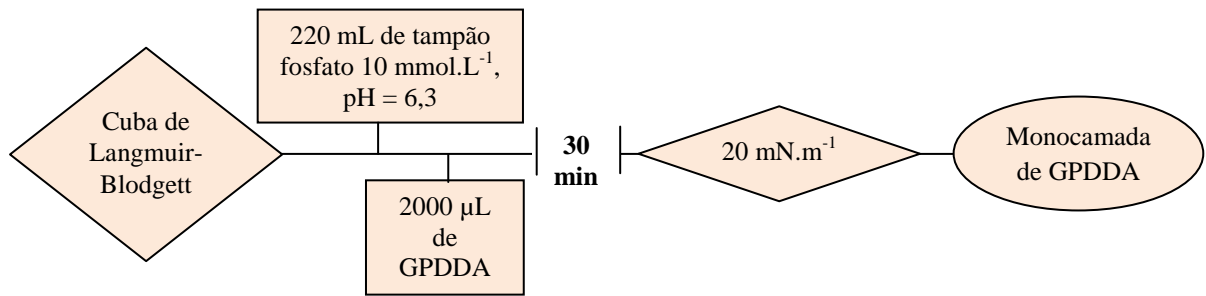
Procedimento para a formação dos filmes de Langmuir e deposição dos filmes LB

A cuba de Langmuir-Blodgett (KSV Nima 2000) utilizada possui área de compressão entre as barreiras de 243 cm^2 . Foi utilizado em todos os procedimentos o sensor de Wilhelmy acoplado à eletrobalança e uma velocidade de compressão das barreiras de $10,0 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Primeiramente a cuba foi limpa com detergente Extran 0,5%, enxaguada com água ultrapura e finalmente limpa com etanol 96%. Em seguida, foram colocados 220 mL de água ultrapura e as barreiras foram comprimidas ao máximo, posteriormente, a água foi sugada com bomba de vácuo e a cuba foi limpa novamente com etanol, sendo este procedimento realizado duas vezes.

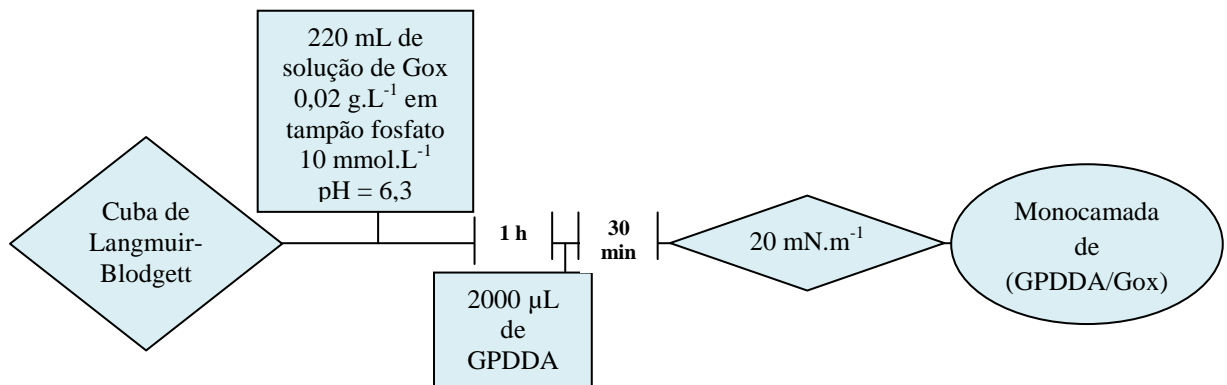
Para a formação da monocamada de GPDDA, foram colocados 220 mL de tampão fosfato $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,3$ como subfase e espalhados $2000 \mu\text{L}$ de GPDDA sobre a superfície do tampão. Após 30 minutos para a evaporação do metanol contido no GPDDA as barreiras foram comprimidas até a pressão de superfície alcançar $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. A Figura 4.3.2 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPDDA. Já para a formação das monocamada de (GPDDA/Gox), foram colocados na subfase 220 mL de solução de Gox $0,02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Após 1 h de estabilização, foram espalhados $2000 \mu\text{L}$ de GPDDA e as barreiras foram comprimidas até alcançar $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ depois de 30 min, para a evaporação do metanol. A Figura 4.3.3 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPDDA/Gox). Os procedimentos para a formação da monocamada de GPSS e de (GPSS/Gox) foram semelhantes ao do GPDDA e do (GPDDA/Gox), respectivamente, entretanto foram espalhados $1750 \mu\text{L}$ de GPSS para a formação da monocamada. A Figura 4.3.4 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPSS e a Figura 4.3.5 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPSS/Gox).

Figura 4.3.2: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPDDA.



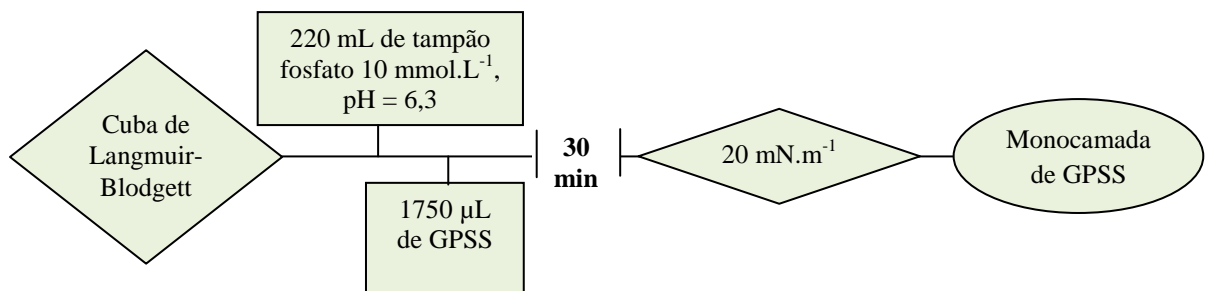
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 4.3.3: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPDDA/Gox).



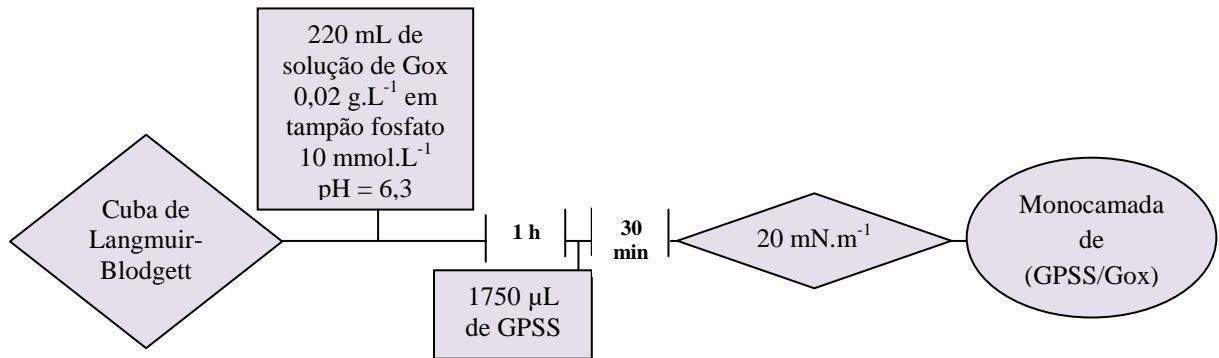
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 4.3.4: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de GPSS.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 4.3.5: Fluxograma do procedimento de preparo da monocamada de (GPDDA/Gox).

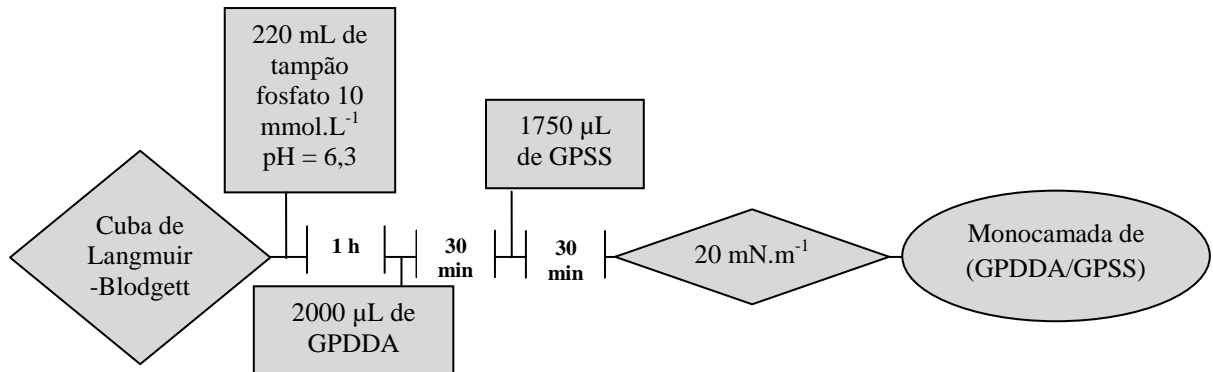


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A monocamada de (GPDDA/GPSS) foi obtida espalhando 2000 μL de GPDDA sobre a superfície de 220 mL de tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} , $\text{pH} = 6,3$, após 30 min para evaporação do metanol foram espalhados 1750 μL de GPSS. Depois de 30 min para a evaporação do metanol, as barreiras foram comprimidas até a pressão de superfície alcançar 20 mN.m^{-1} . A Figura 4.3.6 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS). Para a formação da monocamada (GPDDA/GPSS/Gox) foi utilizado como subfase uma solução de Gox 0,02 g.L^{-1} em tampão fosfato. Após 1 h de estabilização foram espalhados sobre a superfície da solução de Gox 2000 μL de GPDDA. Depois de 30 min para a evaporação do metanol contido no GPDDA, foram espalhados 1750 μL de GPSS sobre a superfície, também foi aguardado 30 min para a evaporação do metanol contido no GPSS. As barreiras foram comprimidas até alcançar a pressão de superfície de 20 mN.m^{-1} . A Figura 4.3.7 apresenta o fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS/Gox).

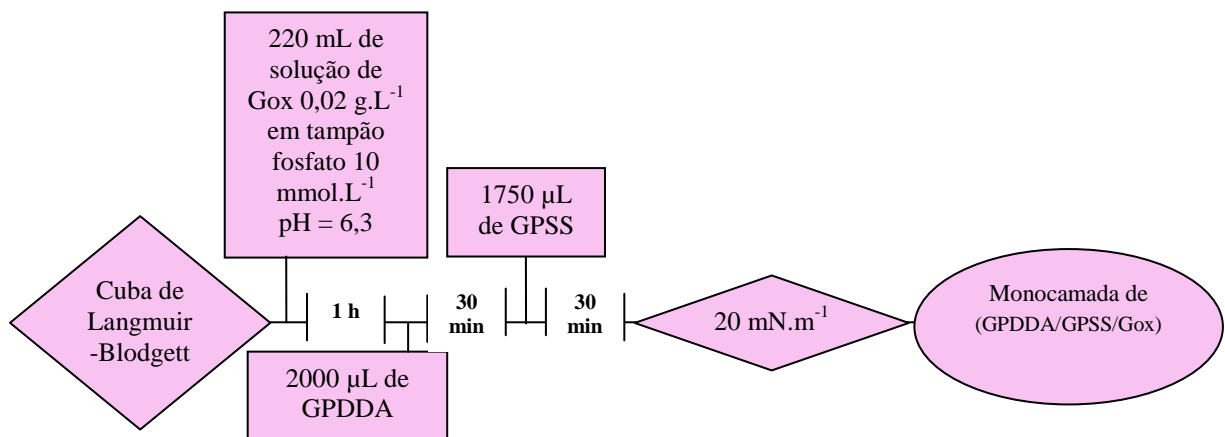
Para a deposição do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) os substratos foram imersos à uma velocidade de 10 mm.s^{-1} , emergidos na mesma velocidade, para os filmes com 3 e 5 monocamadas, foram aguardados 300 s antes da transferência da próxima monocamada.

Figura 4.3.6: Fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS).



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Figura 4.3.7: Fluxograma do procedimento de preparo das monocamadas de (GPDDA/GPSS/Gox).



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Caracterização dos filmes LB por espectroscopia FTIR e Raman

Os filmes LB analisados por espectroscopia FTIR e Raman foram depositados sobre substrato de silício puro. As medidas de espectroscopia FTIR e Raman foram realizadas em um mesmo filme. Sendo assim, a quantidade de monocamada adotada para as medidas dos filmes LB por espectroscopia FTIR e Raman foi estipulada de acordo com a necessidade de intensificação do sinal gerado na medida por espectroscopia FTIR. Para a arquitetura (GPDDA/GPSS) foram necessárias 120 monocamadas e para a arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox) foram necessárias 10 monocamadas.

Procedimento para as análises eletroquímicas – Voltametria Cíclica e Amperometria

Os filmes foram depositados sobre ITO e usados como eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica contendo três eletrodos. Foi usado um eletrodo de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência.

A análise da área ativa e a análise do comportamento difusional dos filmes LbL por Voltametria Cíclica foi realizada usando o sistema ferricianeto-ferrocianeto. Para isso foi usada 8 mL de uma solução (1:1) de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 contendo de Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 10 mmol.L⁻¹. A velocidade de varredura foi variada entre 0,025 e 0,300 V.s⁻¹.

As medidas de detecção de glicose por Voltametria Cíclica e Amperometria foram realizadas em 8 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL de glicose 10 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

A análise da detecção de glicose em meio contendo interferente foi realizada em 8 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. Foi adicionada primeiramente uma alíquota de 100 µL de glicose 10 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. Em seguida, foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3, de ácido úrico (AU) 10 mmol.L⁻¹, ácido ascórbico (AA) 10 mmol.L⁻¹, lactose (L) 10 mmol.L⁻¹, sacarose (S) 10 mmol.L⁻¹ e frutose (F) 10 mmol.L⁻¹. Por fim, foi adicionada 100 µL de glicose 10 mmol.L⁻¹ preparada em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

A análise da detecção de glicose em amostra real foi realizada em 8 mL de tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3. Foram adicionadas sequencialmente alíquotas de 100 µL uma dispersão 1:10 de leite sem lactose diluído em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹, pH = 6,3.

4.4 Resultados e Discussões

Caracterização das monocamadas de Langmuir

Primeiramente, para se fabricar um filme de LB é necessário verificar se os materiais escolhidos formam monocamadas estáveis e organizadas sobre uma superfície líquida (subfase), ou seja, se estes materiais formam um filme de Langmuir. De uma forma geral, a

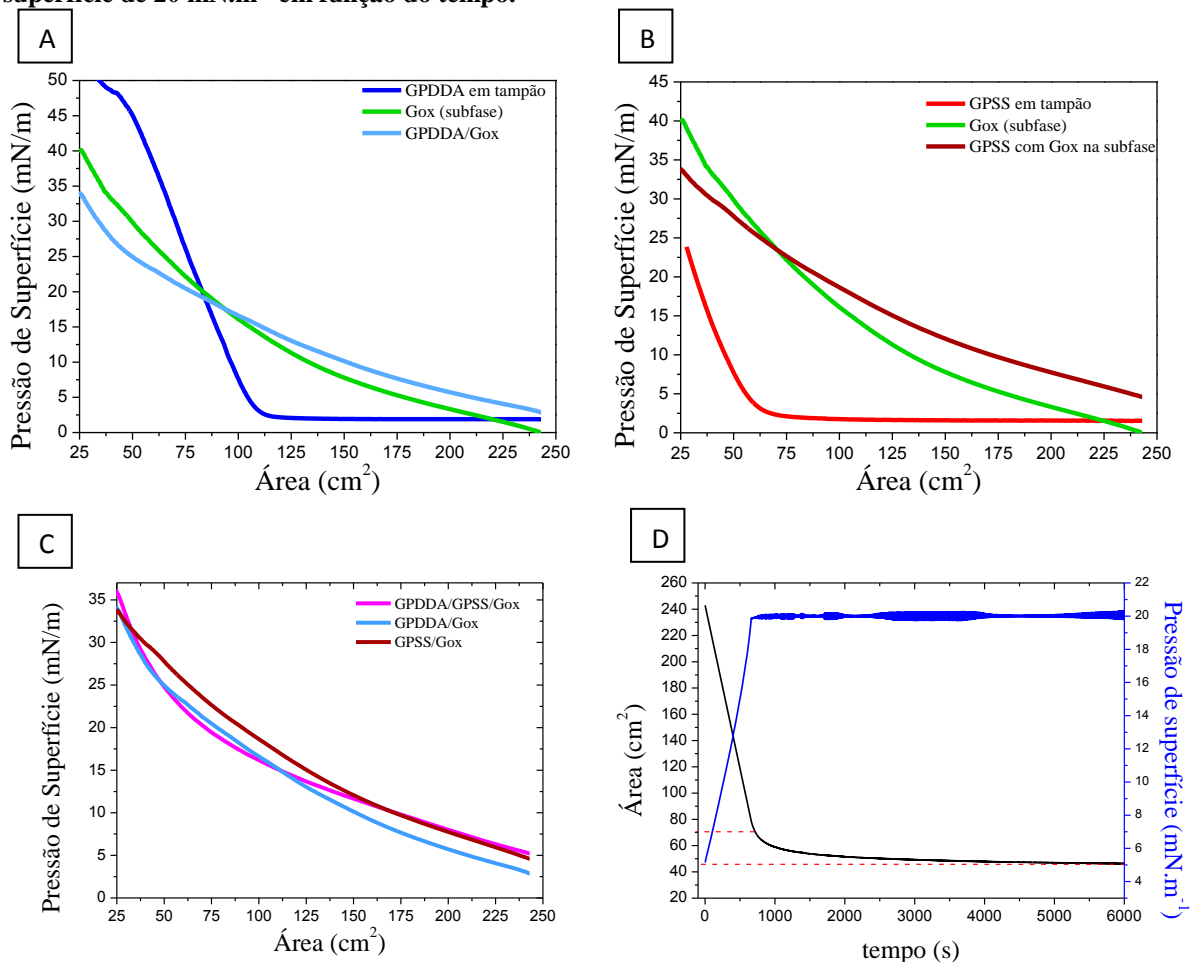
organização destas monocamadas é monitorada por isotermas de pressão da superfície (em mN.m^{-1}) em função da área molecular média (em \AA^2). Para este tipo de isoterma, os materiais estudados devem possuir estruturas conhecidas, e assim, permitir que a área molecular média seja calculada em função da sua massa molar. Como o GPDDA e o GPSS foram obtidos a partir do GO sintetizado quimicamente, este tipo de síntese gera diferentes nanofolhas, tanto em tamanho como em estrutura, nas quais podem variar a quantidade de defeitos, grupos oxigenados e quantidades de nanofolhas isoladas (MARCANO et al., 2010). Desta forma, a massa molar pode variar a cada nanofolha, dificultando a obtenção da área molecular média. Sendo assim, as isotermas apresentadas neste trabalho serão construídas a partir da pressão de superfície (em mN.m^{-1}) em função da área de compressão das barreiras (em cm^2), de acordo com trabalhos com GO reportados na literatura (GAO et al., 2010; KULKARNI et al., 2010; WANG; BAI; SHI, 2011; KIM et al., 2013; WEN et al., 2014; YANG et al., 2014).

As monocamadas de Langmuir para o GPDDA e para o GPSS foram obtidas espalhando estes materiais dispersos em metanol sobre a interface ar/líquido. O comportamento das monocamadas foi estudado primeiramente espalhando separadamente estes materiais sobre tampão e sobre solução $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de Gox em tampão fosfato. Em seguida, o GPDDA e o GPSS foram espalhados sequencialmente sobre uma solução $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ de Gox para formar os filmes (GPDDA/GPSS/Gox)_n utilizados para compor os biossensores. A Figura 4.4.1 apresenta as isotermas (a) do GPDDA sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPDDA/Gox), (b) do GPSS sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPSS/Gox), (c) do GPDDA e do GPSS sobre a solução de Gox (GPDDA/GPSS/Gox) e (d) curva de estabilidade da monocamada de (GPDDA/GPSS/Gox) em uma pressão de superfície de 20 mN.m^{-1} em função do tempo.

As isotermas do GPDDA (Figura 4.4.1a) sobre tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} e $\text{pH} = 6,3$ (curva em azul) e em solução de Gox $0,02 \text{ g. L}^{-1}$ foram obtidas espalhando $2000 \mu\text{L}$ de GPDDA diluído em metanol (conforme descrito na Seção 4.3 deste Capítulo). Na sua isoterma em tampão fosfato (subfase), a pressão de superfície da monocamada de GPDDA começou elevar rapidamente quando a área de compressão da barreira alcançou aproximadamente 110 cm^2 , indicando a aproximação das suas nanofolhas, e continuou a aumentar acentuadamente até a área final de compressão das barreiras. O GPDDA não apresentou as fases de organização bem definidas de líquido-expandido e líquido-condensado. Este tipo de comportamento na isoterma é característico para materiais não anfífilos. Quando o GPDDA foi espalhado sobre a solução de Gox em tampão fosfato (subfase) (curva em azul claro da Figura 4.4.1a), foi observado que a pressão de superfície elevou desde o

início de compressão da barreira, de uma forma menos acentuada quando comparada com o GPDDA em tampão, sugerindo uma interação com a subfase. Sendo assim, foi realizada uma isoterma apenas da solução de Gox para comparação (curva em amarelo da Figura 4.4.1a), na qual a solução de Gox muda a pressão de superfície com o deslocamento das barreiras. Com isso, pode ser observado claramente que a isoterma do filme de Langmuir (GPDDA/Gox) (curva azul da Figura 4.4.1a) sofre influência da subfase.

Figura 4.4.1: Isotermas de pressão de superfície em função da área de compressão das barreiras para as monocamadas de (a) GPDDA sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPDDA/Gox), (b) do GPSS sobre tampão fosfato e sobre solução de Gox (GPSS/Gox) e (c) do GPDDA e do GPSS sobre a solução de Gox (GPDDA/GPSS/Gox). (d) Estabilidade da monocamada de (GPDDA/GPSS/Gox) em uma pressão de superfície de 20 mN.m⁻¹ em função do tempo.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

As isotermas do GPSS (Figura 4.4.1b) foram obtidas espalhando 1750 μL de GPSS diluído em água:metanol (1:5) (conforme descrito na Seção 4.3 deste Capítulo) sobre tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH = 6,3 e sobre solução de Gox 0,02 g.L⁻¹ em tampão fosfato. O

GPSS apresentou um comportamento na isoterma semelhante ao GPDDA. O GPSS espalhado sobre tampão fosfato (subfase) (curva em vermelho da Figura 4.4.1b) apresentou variação significativa na pressão de superfície quando a área de compressão das barreiras foi diminuída para aproximadamente 60 cm^2 . Quando espalhado sobre a solução de Gox em tampão fosfato (subfase), apresentou variação na pressão de superfície desde o início da compressão das barreiras, evidenciando que a isoterma do filme de Langmuir (GPSS/Gox) (curva marrom da Figura 4.4.1b) também sofre influência da subfase.

A isoterma do (GPDDA/GPSS/Gox) (curva em rosa da Figura 4.4.1c) foi obtida espalhando $2000 \mu\text{L}$ de GPDDA, seguidos de $1750 \mu\text{L}$ de GPSS sobre uma solução de Gox $0,02 \text{ g.L}^{-1}$. Esta isoterma apresentou uma tendência de formação das fases de organização, com a fase líquido-condensada iniciando em aproximadamente 20 mN.m^{-1} . Quando comparada com as isotermas do (GPDDA/Gox) e do (GPSS/Gox), a isoterma do (GPDDA/GPSS/Gox) apresenta uma menor pressão de superfície quando as barreiras são comprimidas mais de 110 cm^2 , sugerindo uma interação dos materiais com a subfase, entretanto, essa diminuição também pode significar a formação de aglomerados ou perda de material para a subfase. Desta forma, a pressão de superfície escolhida para a deposição das monocamadas foi a encontrada para final da fase líquido-expandida, para evitar a sobreposição das nanofolhas (aglomerados) (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2013).

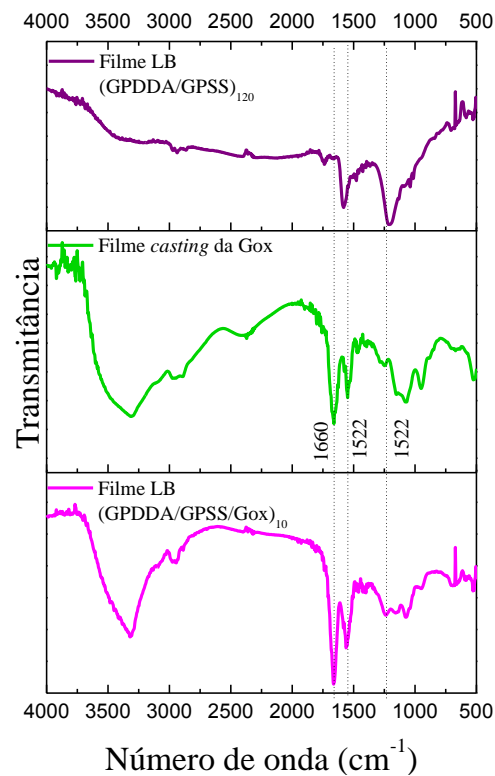
A estabilidade do filme de Langmuir (GPDDA/GPSS/Gox) foi avaliada monitorando a variação da área de compressão das barreiras com a pressão de superfície de 20 mN.m^{-1} por 6000 s. Ao final de 6000 s a área de compressão das barreiras sofreu uma variação de 23 cm^2 , esta variação representa um valor de permanência da monocamada na interface ar/líquido de 90,5 % e indica que os parâmetros utilizados são eficientes para formar monocamadas estáveis.

Caracterização por espectroscopia FTIR

O filme LB na arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox) foi analisado por espectroscopia FTIR para confirmar a presença do GPDDA, GPSS e a imobilização da Gox. O filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) foi depositado sobre substrato de silício com 10 monocamadas a partir de uma solução de Gox $0,02 \text{ g.L}^{-1}$ em tampão presente na subfase e $2 \mu\text{L}$ de GPDDA + $1750 \mu\text{L}$ de GPSS espalhado na superfície. A pressão de superfície utilizada para a deposição deste filme LB foi de 20 mN.m^{-1} , este valor foi obtido pela análise da isoterma da monocamada (GPDDA/GPSS/Gox). Esta pressão de superfície para a deposição do filme LB promove uma

maior aproximação das nanofolhas de grafeno. Para a confirmação da presença dos materiais no filme LB (GPDDA/GPSS/Gox), também foram analisados por FTIR um filme LB contendo apenas GPDDAA e GPSS e um filme *cast* de Gox. A Figura 4.4.2 apresenta os espectros FTIR obtidos dos filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) com 10 monocamadas, (GPDDA/GPSS) com 120 monocamadas e de um filme *cast* da Gox. É importante ressaltar que a quantidade de monocamadas depositadas para a análise de espectroscopia FTIR foi escolhida para intensificação do sinal FTIR e diferem das utilizadas para fabricar os biossensores.

Figura 4.4.2: Espectros FTIR dos filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) com 10 monocamadas, (GPDDA/GPSS) com 120 monocamadas e de um filme *cast* da Gox.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O espectro do filme LB (GPDDA/GPSS)₁₂₀ revelou uma banda pouco intensa em aproximadamente 3400 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações O-H associada à presença de água residual. Na região de 2900 cm^{-1} revelou duas bandas pouco intensas atribuídas ao estiramento das ligações C-H presentes na estrutura do GPDDA e do GPSS. O espectro também revelou duas bandas intensas, em 1570 cm^{-1} associada ao estiramento das ligações

C=C e em 1205 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações N-C-O relacionada com a estrutura do GPDDA.

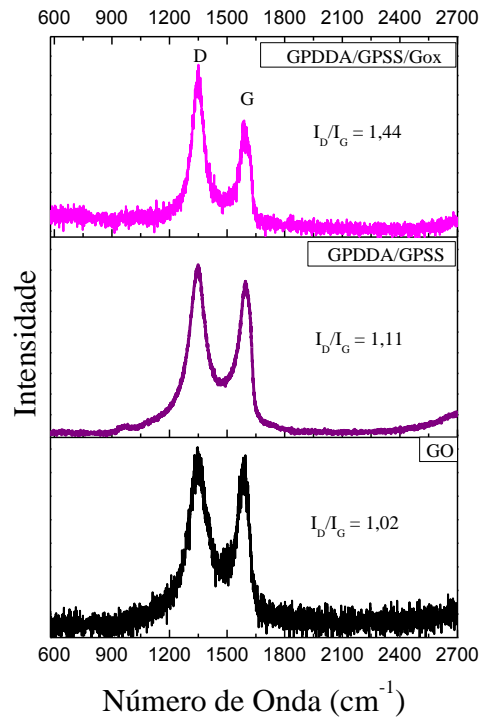
A imobilização da Gox no filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) foi observada claramente pela presença da banda em 3287 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações N-H presente na amida A e a banda em 3100 cm^{-1} é referente à amida B. Ambas as ligações estão presentes na estrutura da enzima (curva em verde da Figura 4.4.2). A principal evidência da imobilização da Gox no filme (GPDDA/GPSS/Gox)₁₀ foi verificada pela banda em 1660 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações C=O das ligações peptídicas na estrutura da proteína da amida I e a banda em 1522 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C-N e também à deformação no plano das ligações N-H dos grupos peptídeos (LIANG; ZHUOBIN, 2003). Como a intensidade das bandas do GPSS e do GPDDA é muito pequena quando comparado com as da Gox, visto que para obter um espectro com as bandas do filme LB (GPDDA/GPSS) foram necessárias 120 monocamadas, a presença destes materiais no filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₁₀ foi apenas observada pela mudança da intensidade e formato (banda 1205 cm^{-1} atribuída ao estiramento N-C-O do GPDDA) da banda em aproximadamente em 1240 cm^{-1} , referente à amida III da enzima.

Caracterização por espectroscopia Raman

A imobilização da Gox no filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) também foi avaliada por espectroscopia Raman. A Figura 4.4.3 apresenta os espectros Raman obtidos dos filmes (LB GPDDA/GPSS/Gox)₁₀, (GPDDA/GPSS)₁₂₀ e de um filme *cast* do GO. É importante ressaltar que a quantidade de monocamadas depositadas para a análise de espectroscopia Raman foi escolhida para intensificação do sinal e diferem das utilizadas para fabricar os biossensores.

Todos os materiais de carbono exibem a banda D em aproximadamente 1350 cm^{-1} atribuída ao espalhamento de fônons em sítios de defeitos e impurezas. A banda G em 1590 cm^{-1} está relacionada com a vibração de fônons em carbono sp^2 (LUO et al., 2012; ANEESH et al., 2014). Desta forma, o aumento da intensidade da banda D em relação à banda G no GO, quando comparado ao grafite, está relacionado com o aumento de defeitos nas folhas após o processo de oxidação. Entretanto, o aumento da intensidade da banda D em relação à banda G no rGO (como o GPDDA e o GPSS) está relacionado com o aumento dos domínios sp^2 atribuído ao processo de redução do GO, mas não deve ser atribuído à reparação de defeitos na estrutura do GO provenientes do processo de oxidação da síntese (PEI; CHENG, 2012).

Figura 4.4.3: Espectros Raman dos filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox) com 10 monocamadas, (GPDDA/GPSS) com 120 monocamadas e de um filme *cast* de GO.



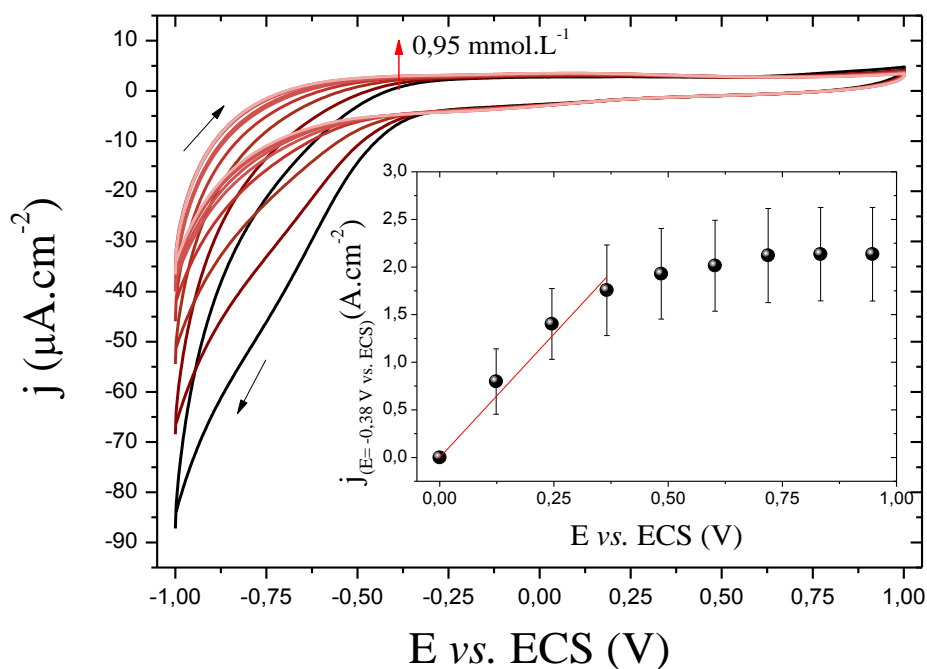
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O espectro Raman do filme *cast* da GO revelou a banda D em 1340 cm^{-1} e a banda G em 1592 cm^{-1} , após a redução e funcionalização do GO para produzir as estruturas do tipo GPDDA e o GPSS o filme LB na arquitetura (GPDDA/GPSS)₁₂₀ apresentou banda D em 1347 cm^{-1} e a banda G em 1599 cm^{-1} e o filme LB na arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox)₁₀ apresentou banda D em 1345 cm^{-1} e a banda G em 1592 cm^{-1} . O deslocamento da banda D e G do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₁₀ em relação ao filme LB (GPDDA/GPSS)₁₂₀ sugere a interação da Gox com (GPDDA/GPSS) (LIU et al., 2010). O GO apresentou a proporção da banda D em relação à banda G (I_D/I_G) igual a 1,02, enquanto o filme GPSS/GPDDA apresentou I_D/I_G igual a 1,11. Este aumento comprova a eficiência da redução do GO e o aumento dos domínios sp^2 nas folhas, deste modo, a condutividade elétrica é aumentada (SI; SAMULSKI, 2008), fator esse muito interessante para a aplicação em biossensores eletroquímicos. O filme LB GPDDA/GPSS/Gox apresentou I_D/I_G igual a 1,44. Este aumento está relacionado à sobreposição da banda característica da Gox em 1342 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação C–C=N, C=C e deformação CH_3 (QI et al., 2016).

Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) – Voltametria Cíclica e Amperometria

Primeiramente, o biossensor desenvolvido com o filme LB na arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox) foi avaliado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 4.4.4 apresenta os voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) medidos em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH = 6,3. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

Figura 4.4.4: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em marrom). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,3 e 1,1 mmol.L⁻¹ no E = -0,38 V vs. ECS.



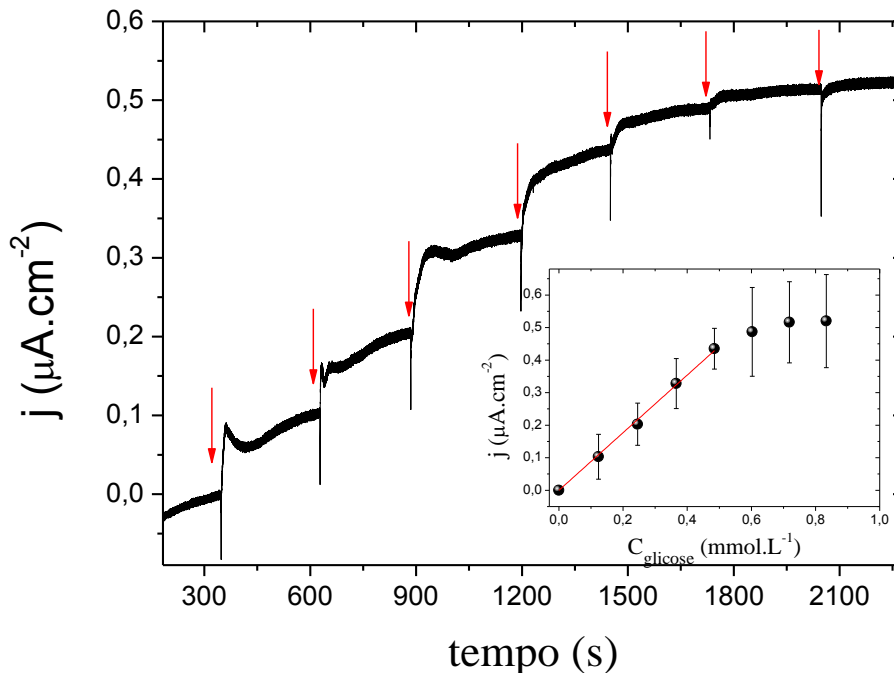
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A varredura do potencial foi iniciada em um potencial negativo (-1,0 V vs. ECS) até o potencial máximo (1,0 V vs. ECS) (varredura reversa). Com a adição da glicose, houve claramente um aumento na corrente entre a faixa de -0,3 e -1,0 V vs. ECS. Entretanto, não foi possível evidenciar o pico de oxidação da glicose catalisada pela Gox. Sendo assim, o

desempenho do biossensor com a arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox) foi analisado considerando o pico de oxidação em $-0,38\text{V vs. ECS}$, por ser o pico encontrado para as demais arquiteturas de filmes LB discutidas a seguir (na arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox)₃). O biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) apresentou um limite de detecção de $40,2\ \mu\text{mol.L}^{-1}$ e sensibilidade de $5,184\ \mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$, com faixa linear de $0,134$ a $0,366\ \text{mmol.L}^{-1}$. Embora seu limite de detecção seja superior ao biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ (Capítulo 3), ambos por Voltametria Cíclica, sua faixa linear foi muito reduzida.

O desempenho do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) também foi analisado por Amperometria. A Figura 4.4.5 apresenta a resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) medida em potencial de $-0,3\ \text{V vs. ECS}$, em tampão fosfato $10\ \text{mmol.L}^{-1}$ e $\text{pH} = 6,3$ com sucessivas adições de glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,1\ \text{mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva analítica referente às adições de glicose.

Figura 4.4.5: Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox) depositado sobre ITO, medida em potencial de $-0,3\ \text{V vs. ECS}$, em tampão fosfato $10\ \text{mmol.L}^{-1}$ e $\text{pH} 6,3$. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,1\ \text{mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva analítica com faixa linear de trabalho entre $0,13$ e $0,48\ \text{mmol.L}^{-1}$.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A corrente estabilizou após 300 s do início da medida. Após a adição da glicose houve um rápido aumento da corrente anódica proveniente do processo de oxidação da glicose, na conversão direta de FADH₂ a FAD catalisada pela Gox presente no filme, uma das características de DET (LUCKARIFTHEATHER; ATANASSOV; JOHNSON, 2014), de acordo com a reação (8):



Este filme apresentou faixa linear de trabalho entre 0,13 e 0,48 mmol.L⁻¹, com limite de detecção de 39,18 μmol.L⁻¹ (S/R = 3) e sensibilidade de 0,89 μA.cm⁻².mmol⁻¹.L. Visto que com o filme LbL com uma bicamada contendo Gox não respondeu às adições de glicose, o filme LB contendo apenas uma monocamada contendo Gox apresentou um melhor desempenho, entretanto, apresentou uma faixa analítica muito reduzida.

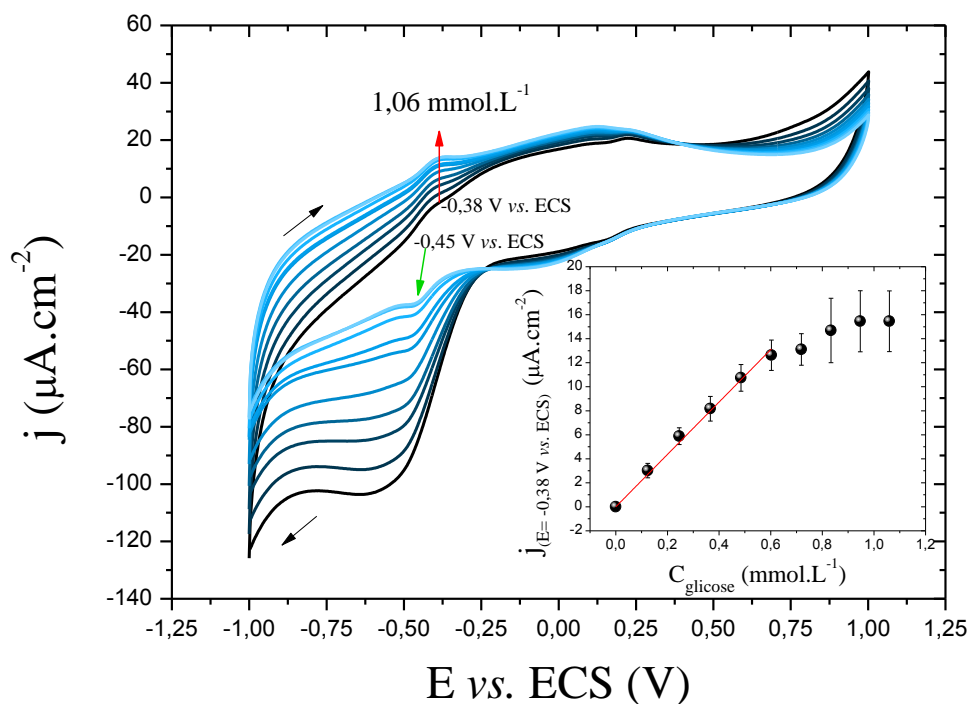
Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ – Voltametria Cíclica e Amperometria

O biossensor desenvolvido com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ foi avaliado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 4.4.6 apresenta os voltamogramas do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ medidos em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH = 6,3. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

A medida foi iniciada em -1,0 V vs. ECS até 1,0 V vs. ECS (varredura reversa) e gerou um pico de corrente anódica em -0,38 V vs. ECS atribuído à conversão de FADH₂ a FAD, enquanto que na varredura direta gerou um pico de corrente catódica em -0,45 V vs. ECS atribuído à conversão do FAD a FADH₂. Além destes picos, foi observada a redução de um pico largo em -0,6 V vs. ECS. A redução deste pico evidencia a redução de grupos oxigenados residuais (GUO et al., 2009; MANI; DEVADAS; CHEN, 2013) nas nanofolhas do GPDDA e do GPSS. Esta arquitetura apresentou limite de detecção 35,86 μmol.L⁻¹ e sensibilidade de 21,83 μA.cm⁻².mmol⁻¹.L, com uma boa linearidade na faixa analítica entre 0,12 e 0,61 mmol.L⁻¹ (R² = 0,99). Em relação ao filme LB (GPDDA/GPSS/Gox), o aumento da quantidade da monocamada (GPDDA/GPSS/Gox) na arquitetura LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ apresentou uma diminuição no limite de detecção, aumento na sensibilidade e aumento da faixa linear de trabalho. Quando comparado a detecção por Voltametria Cíclica com filme LbL de melhor desempenho ((GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂

discutido no Capítulo 3), o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ apresentou menor limite de detecção e maior sensibilidade, entretanto, sua faixa de trabalho foi inferior.

Figura 4.4.6: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em azul). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,12 e 0,61 mmol.L⁻¹, E = -0,38 V vs. ECS.



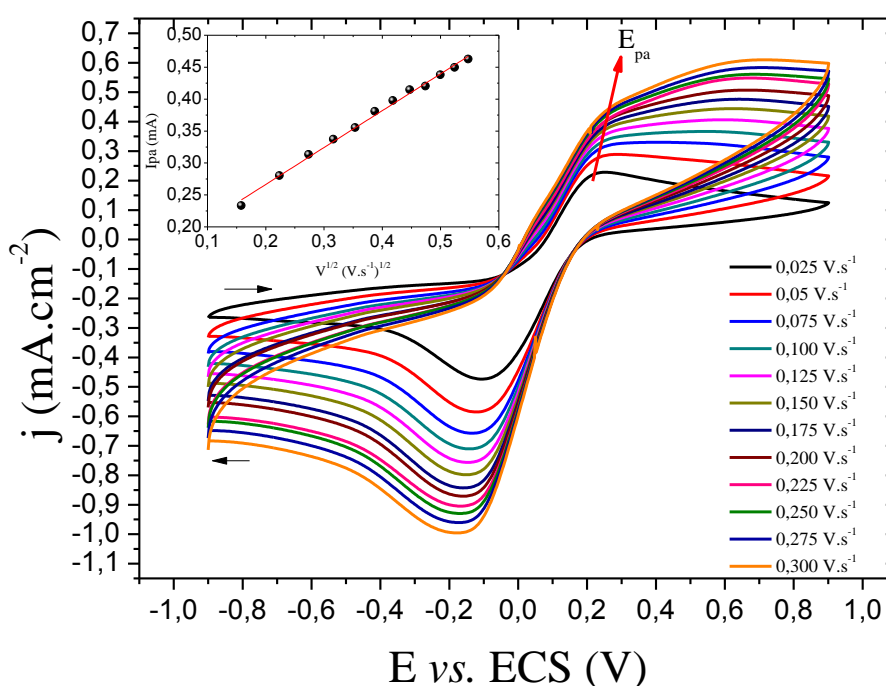
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O comportamento difusional desta arquitetura foi avaliado para obter a área ativa do eletrodo a partir da equação de Randles-Sevcik (10) (apresentada no Capítulo 3) para as diferentes velocidades de varredura. A Figura 4.4.7 apresenta os voltamogramas do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ em diferentes velocidades de varredura em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 contendo Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ 10 mmol.L⁻¹, solução (1:1). No gráfico inserido é apresentado o comportamento da corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura

Os voltamogramas em diferentes velocidades de varredura apresentaram pico anódico variando entre 0,22 e 0,26 V vs. ECS. A linearidade da curva obtida pela corrente em função da raiz quadrada da velocidade caracteriza o sistema como quasireversível na difusão do Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻. A separação entre picos anódico e catódico na velocidade de

varredura de 50 mV.s^{-1} foi de $0,34 \text{ V}$, enquanto que no filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ foi de $0,46 \text{ V}$. Isto sugere que o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ possui maior difusividade das espécies, provavelmente responsável pelo melhor desempenho deste biossensor por Amperometria.

Figura 4.4.7: Voltamogramas do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ em diferentes velocidades de varredura ($0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225, 0,250, 0,275$ e $0,300 \text{ V.s}^{-1}$) em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} e pH $6,3$ contendo $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ 10 mmol.L^{-1} , solução (1:1). Gráfico inserido: corrente de pico anódico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.



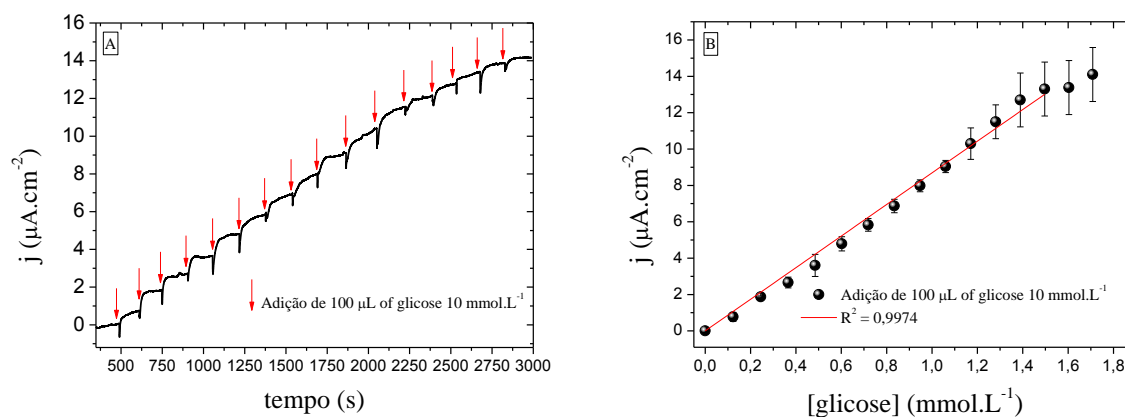
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A área ativa calculada pela equação de Randles–Sevcik (10) para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ foi de $0,172 \text{ cm}^2$, já para o ITO puro (sem filme) a área ativa foi de $0,124 \text{ cm}^2$, sendo assim, o filme LB depositado aumentou a área ativa do eletrodo modificado em aproximadamente 1,4 vezes. Entretanto, o filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ proporcionou um aumento na área ativa de 2,7 vezes, provavelmente, responsável pela maior faixa analítica do filme LbL por Voltametria Cíclica.

O biossensor desenvolvido com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ também foi avaliado na detecção de glicose pela técnica de Amperometria. A Figura 4.4.8a apresenta a resposta amperométrica do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ nas condições

de potencial de $-0,3 \text{ V vs. ECS}$, em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} e $\text{pH} = 6,3$. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. Na Figura 4.4.8b é apresentada a curva analítica referente às adições de glicose.

Figura 4.4.8: (a) Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ depositado sobre ITO, medida realizada em potencial de $-0,3 \text{ V vs. ECS}$, em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} e $\text{pH} 6,3$ e sucessivas adições glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ na concentração de glicose. (b) Curva analítica com faixa linear de trabalho entre $0,0018$ e $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A corrente da resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ estabilizou após 500 s do início da medida. Com a adição de alíquotas de glicose houve um rápido aumento da corrente anódica proveniente do processo de oxidação da glicose, na conversão direta de FADH_2 a FAD , uma das características de transferência direta de elétrons (LUCKARIFTHEATHER; ATANASSOV; JOHNSON, 2014). Este filme apresentou limite de detecção $0,54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{S/R} = 3$) e sensibilidade de $8,69 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{L}$ e faixa analítica entre $0,0018$ e $1,4976 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Quando comparado ao filme LbL de melhor desempenho ((GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ discutido no Capítulo 3), o filme LB apresentou menor limite de detecção, maior sensibilidade e maior faixa linear de trabalho, sugerindo que a nanoestruturação proporcionada pela técnica LB promove uma maior sinergia dos materiais. A Tabela 4.4.1 apresenta os valores de limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica para o biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ e para o biossensor com filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃.

Tabela 4.4.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica do biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ e para o biossensor com filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃.

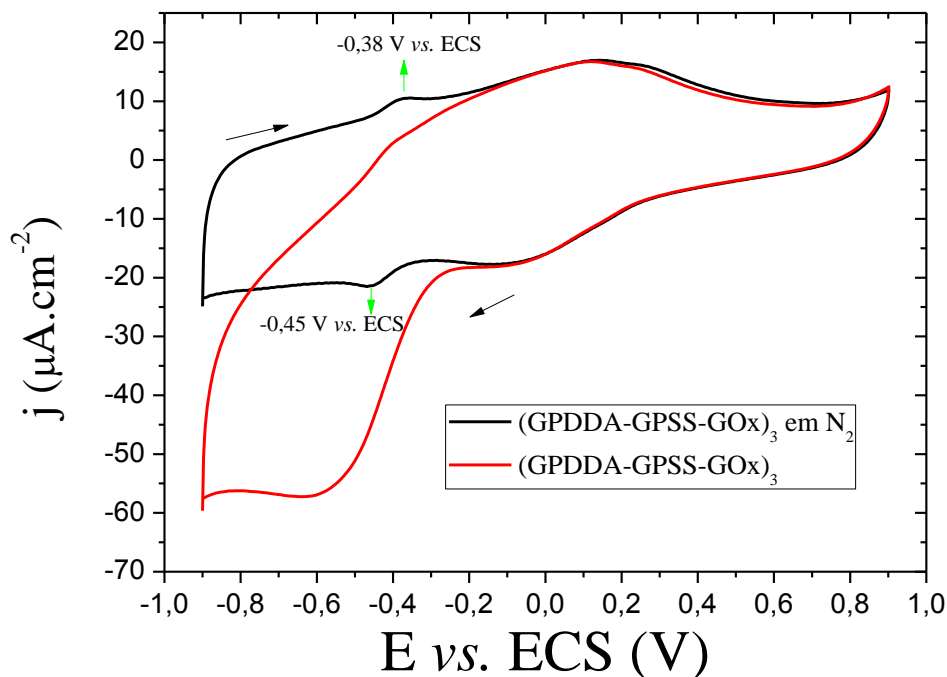
Amperometria			
Arquitetura	Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$)	Faixa analítica (mmol.L^{-1})
Filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂	13,4	2,47	0,1-1,0
Filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃	0,54	8,69	0,0018-1,4976

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

O processo de detecção da glicose para biossensores de terceira geração está relacionado com a detecção dos elétrons gerados na oxidação FADH_2 a FAD conduzidos diretamente para o eletrodo, este processo é denominado DET (LUCKARIFTHEATHER; ATANASSOV; JOHNSON, 2014). Este processo foi verificado para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ por Voltametria Cíclica em tampão na ausência de oxigênio. A Figura 4.4.9 apresenta os voltamogramas do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ medidos em tampão fosfato pH = 6,3 sob influência do oxigênio presente na água e com saturação de N_2 .

Na presença de oxigênio dissolvido, o voltamograma do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ apresentou o característico pico largo em -0,6 V vs. ECS. Já com a saturação de N_2 , o mesmo filme apresentou dois picos bem definidos, um pico anódico em -0,38 V vs. ECS e um pico catódico em -0,45 V vs. ECS, ambos relacionados com o processo redox da enzima. Este sistema apresentou um potencial formal de -0,42 V, com separação entre pico anódico e catódico de 35 mV. Segundo Palanisamy e colaboradores (PALANISAMY; KARUPPIAH; CHEN, 2014) a pequena diferença de potencial entre o pico anódico e catódico comprova a rápida transferência de elétrons da Gox para o eletrodo modificado com o filme. Sendo assim, este biossensor pode ser classificado como de terceira geração.

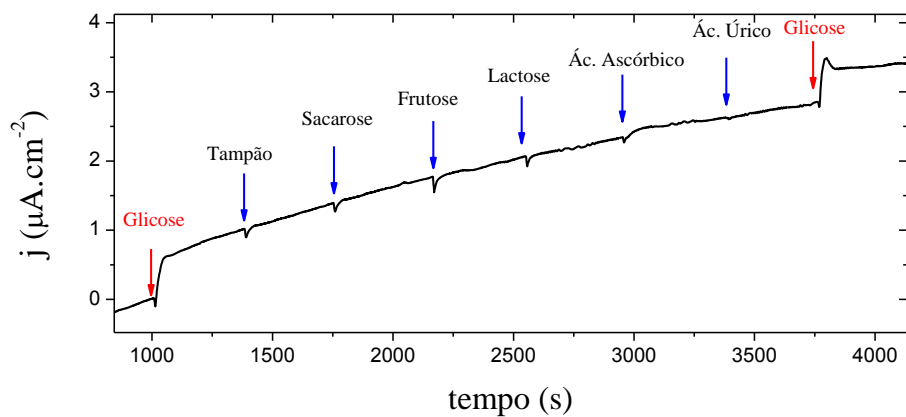
Figura 4.4.9: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3, na presença de oxigênio e com saturação de N₂.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Devido ao seu desempenho, esse biossensor foi analisado na detecção de glicose na presença dos interferentes: sacarose, frutose, lactose, ácido ascórbico e ácido úrico. A Figura 4.4.10 apresenta a resposta amperométrica do biossensor com o filme LB na detecção de glicose na presença de interferentes.

Figura 4.4.10: Resposta amperométrica do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃, medida realizada em -0,3 V vs. ECS com adições 100 μL de glicose, sacarose, frutose, lactose, ácido ascórbico e ácido úrico 10 mmol.L⁻¹ em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3.

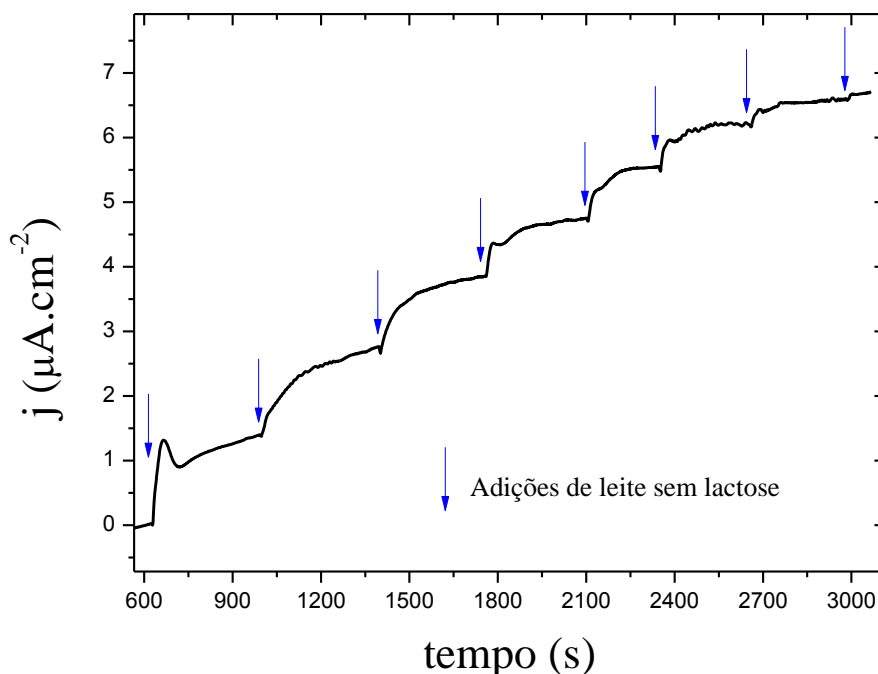


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A adição da glicose gerou instantaneamente um aumento da corrente anódica, característica desse biossensor. Após a estabilização da corrente foi adicionado os interferentes. Todos os interferentes testados geraram apenas uma leve perturbação na corrente, entretanto, o ácido ascórbico apresentou um leve aumento de corrente anódica, mas esta corrente diminuiu com o tempo para muito próximo da corrente anterior à sua adição. A glicose adicionada na sequência dos interferentes apresentou seu comportamento típico de aumento de corrente anódica, a leve diminuição no aumento de corrente anódica está relacionada com o aumento do volume da solução após a adição dos interferentes. Sendo assim, o biossensor contendo o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ se mostrou eficiente na detecção de glicose num meio contendo interferentes.

A eficiência desse biossensor também foi testada em uma amostra real de leite sem lactose. A Figura 4.4.11 apresenta a resposta amperométrica do biossensor com a adição de 100 μL de leite sem lactose diluído em tampão fosfato (1:10).

Figura 4.4.11: Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃, após sucessivas adições de 100 μL de leite sem lactose diluído em tampão (1:10), medida realizada em tampão fosfato pH = 6,3, em -0,3 V vs. ECS.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

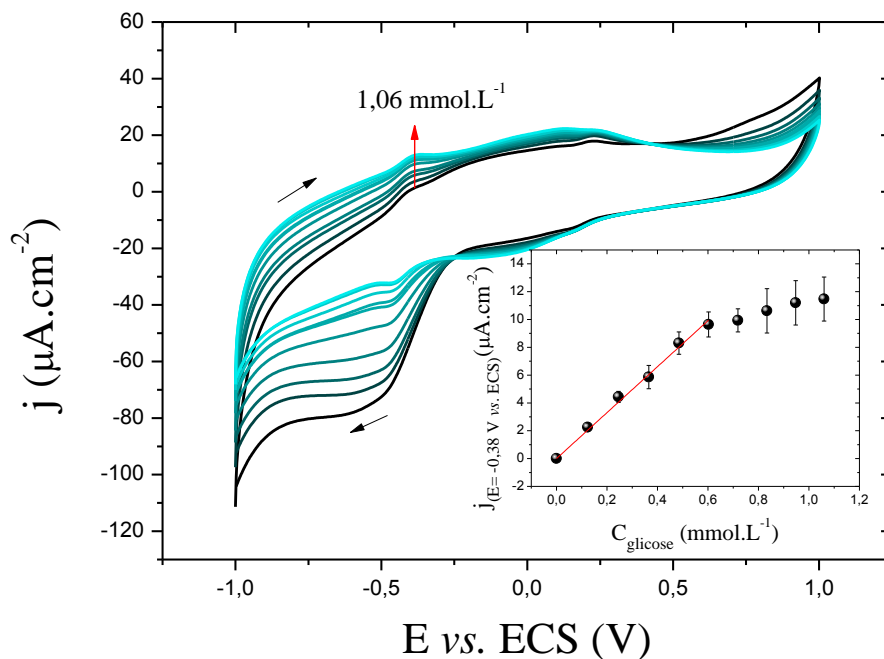
As adições de alíquotas de leite gerou um aumento da corrente anódica, evidenciando a presença de glicose. A quantificação da glicose foi feita pela média dos valores de correntes

obtidos nas duas primeiras adições, realizada em triplicata. A concentração de glicose encontrada no leite sem lactose pelo biossensor foi de $25,29 \pm 0,31 \text{ g.L}^{-1}$, o qual representa uma recuperação do biossensor de 101,2 %. Desta forma, o biossensor contendo o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ foi eficiente na detecção de glicose em uma amostra real.

Análises eletroquímicas para o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ – Voltametria Cíclica e Amperometria

O biossensor desenvolvido com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ foi analisado na detecção de glicose por Voltametria Cíclica. A Figura 4.4.12 apresenta os voltamogramas do biossensor com filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH = 6,3 (curva em preto) com sucessivas adições de glicose (curvas em verde). Cada adição de glicose corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No gráfico inserido é apresentada a curva de calibração referente às adições de glicose.

Figura 4.4.12: Voltamogramas do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ depositado sobre ITO em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 (curva em preto) e sucessivas adições glicose (curvas em verde). Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. Gráfico inserido: curva de calibração com faixa linear de trabalho entre 0,13 e 0,60 mmol.L⁻¹, E = -0,38 V vs. ECS.

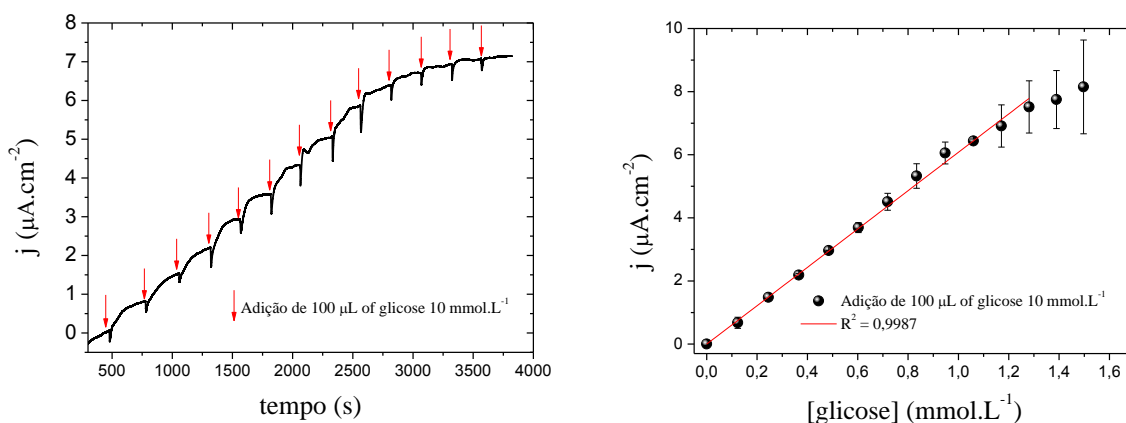


Fonte: Figura elaborada pelo autor.

O biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ foi analisado com os mesmos parâmetros dos biossensores com os filmes contendo 1 e 3 monocamadas de (GPDDA/GPSS/Gox) e apresentou comportamento semelhante ao filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃. Um pico de corrente anódica em -0,38 V *vs.* ECS atribuído à conversão de FADH₂ a FAD e um pico de corrente catódica em -0,45 V *vs.* ECS atribuído à conversão do FAD a FADH₂. O biossensor desenvolvido apresentou uma boa linearidade na faixa analítica entre 0,13 e 0,60 mmol.L⁻¹, limite de detecção 38,12 μmol.L⁻¹ e sensibilidade de 16,52 μA.cm⁻².mmol⁻¹.L. Quando comparado com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃, seu desempenho foi inferior, isto sugere que o aumento do número de monocamadas dificulta o processo difusivo das espécies e também pode impedir a reação do analito com a biomolécula das monocamadas mais internas, afetando o desempenho do biossensor.

O biossensor desenvolvido com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ também foi avaliado na detecção de glicose por Amperometria. A Figura 4.4.13a apresenta a resposta amperométrica do biossensor com o filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ medida em potencial de -0,3 V *vs.* ECS, em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH = 6,3. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. No Figura 4.4.13b é apresentada a curva analítica referente às adições de glicose.

Figura 4.4.13: (a) Resposta amperométrica do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₅ depositado sobre ITO, medida realizada em potencial de -0,3 V *vs.* ECS, em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ e pH 6,3 e sucessivas adições glicose. Cada adição corresponde a um aumento de aproximadamente 0,1 mmol.L⁻¹ na concentração de glicose. (b) Curva analítica com faixa linear de trabalho entre 0,0078 e 1,28 mmol.L⁻¹.



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A corrente estabilizou em aproximadamente 500 s, a cada adição de glicose, semelhante ao filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃, ocorreu um rápido aumento da corrente

anódica proveniente do processo de oxidação da glicose, na conversão direta de FADH_2 a FAD. O aumento da corrente anódica é linear com a concentração de glicose entre 0,0078 e 1,2753 mmol.L^{-1} ($R^2 = 0,9987$), com limite de detecção de 2,34 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($S/R = 3$) e sensibilidade de 6,08 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$. O desempenho deste biossensor quando comparado com o do filme LB (GPDDA/GPSS/Gox)₃ foi inferior, evidenciando que o aumento de monocamadas diminui o desempenho do biossensor na detecção de glicose.

4.5 Conclusão Parcial dos Filmes LB (GPDDA/GPSS/Gox)_n

Biossensores utilizando filmes LB contendo GPDDA, GPSS e Gox foram fabricados com sucesso. O melhor desempenho na detecção de glicose foi apresentado pelo biossensor formado pela arquitetura (GPDDA/GPSS/Gox)₃, apresentou limite de detecção 0,54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($S/R = 3$) e sensibilidade de 8,69 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ e faixa linear de trabalho foi entre 0,0018 e 1,5 mmol.L^{-1} . Apesar da área ativa reduzida, em comparação com o filme com os mesmo materiais depositados por LbL, seu processo difusivo de $\text{Fe(CN)}_6^{3-}/\text{Fe(CN)}_6^{4-}$ evidenciado pela separação de picos anódicos e catódicos se mostrou mais eficiente. Sugerindo que a nanoestruturação proporcionada pela técnica LB promove uma maior sinergia dos materiais, quando comparado com a técnica LbL. Este biossensor também se mostrou eficiente na detecção de glicose em meio contendo interferentes e em amostra real de leite sem lactose, com recuperação do biossensor de 101,2 %. A Tabela 4.5.1 apresenta o limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica para os biossensores com filmes LB.

Tabela 4.5.1: Limite de detecção, sensibilidade e faixa analítica dos biossensores amperométricos com filmes LB.

Arquitetura LB	Amperometria		
	Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Sensibilidade ($\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$)	Faixa analítica (mmol.L^{-1})
(GPDDA/GPSS/Gox)	39,18	0,89	0,13-0,48
(GPDDA/GPSS/Gox) ₃	0,54	8,69	0,0018-1,4976
(GPDDA/GPSS/Gox) ₅	2,34	6,08	0,0078-1,2753

CONCLUSÃO GERAL

As sínteses dos nanomateriais foram realizadas com sucesso, pois permitiram formar dispersões aquosas e metanólicas estáveis das nanofolhas de grafeno para a aplicação em filmes LbL e LB. A redução do GO e funcionalização do rGO foram confirmadas pelas caracterizações dos nanomateriais por espectroscopia UV-Vis e FTIR e por difração de raio-X.

Os espectros UV-Vis e FTIR confirmaram a imobilização da Gox nos filmes LbL contendo GPDDA, GPSS e Gox, pela presença das principais bandas desta enzima nestes espectros. A análise CD permitiu evidenciar a eficiência do GPDDA e o GPSS em preservar a estrutura conformacional desta enzima imobilizada nos filmes LbL. Estes nanomateriais também foram eficientes na transferência dos elétrons da enzima para o eletrodo, classificando o filme LbL de arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GPSS)₂ como biossensor de terceira geração. Esta mesma arquitetura do filme LbL obteve o melhor desempenho na detecção de glicose, apresentando um limite de detecção de 13,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, sensibilidade de 2,47 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ e faixa analítica entre 0,1 e 1,0 mmol.L^{-1} . A partir desses resultados, o biossensor com filme LbL (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/Gox)₂ se apresentou competitivo com os biossensores reportados na literatura. Na análise em amostra real, este biossensor apresentou recuperação de 100,8 % para a solução hidroeletrólítica comercial e 88,8 % para o leite sem lactose. Também foi eficiente em detectar glicose e meio contendo os interferentes comumente encontrados em fluídos corpóreos, em alimentos e fármacos.

Os espectros FTIR e Raman do filme LB contendo GPDDA, GPSS e Gox confirmaram a presença da Gox imobilizada na estrutura deste filme. O número de monocamadas dos filmes LB influencia no desempenho do biossensor. O biossensor formado pela arquitetura (GPDDA/GPDD/Gox)₂ apresentou o melhor desempenho na detecção de glicose, com limite de detecção de 0,54 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (S/R = 3) e sensibilidade de 8,69 $\mu\text{A.cm}^{-2}.\text{mmol}^{-1}.\text{L}$ e faixa linear de trabalho foi entre 0,0018 e 1,5 mmol.L^{-1} . Este biossensor foi eficiente na detecção de glicose em meio contendo interferentes e em amostra real de leite sem lactose, com recuperação do biossensor de 101,2 %. Quando comparado com o biossensor com filme LbL de melhor desempenho (arquitetura (GPDDA/GPSS)/(GPDDA/GPSS)₂) seu desempenho foi superior, evidenciando que a técnica LB promove uma maior sinergia dos materiais, atribuída ao maior ordenamento dos nanomateriais proporcionado por essa técnica.

TRABALHOS PRODUZIDOS

Artigos completos publicados em periódicos

1. MASCAGNI, D. B. T.; MIYAZAKI, C. M. ; CRUZ, NILSON CRISTINO DA ; RIUL JR, A. ; FERREIRA, M. . Layer-by-layer assembly of functionalized reduced graphene oxide for direct electrochemistry and glucose detection. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems** (Print), v. 68, p. 739-745, 2016.

2. MIYAZAKI, CELINA MASSUMI ; PEREIRA, TAMYRIS PASCHOAL ; MASCAGNI, DANIELA BRANCO TAVARES ; DE MORAES, MARLI LEITE ; FERREIRA, MARYSTELA . Monoamine oxidase B layer-by-layer film fabrication and characterization toward dopamine detection. **Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems** (Print), v. 58, p. 310-315, 2016.

3. MASCAGNI, DANIELA BRANCO TAVARES; SOUZA, MARIA ELIZIANE PIRES DE; FREIRE, CELIA MARINA DE ALVARENGA ; SILVA, SELMA LUIZA ; RANGEL, RITA DE CÁSSIA CIPRIANO ; CRUZ, NILSON CRISTINO DA ; RANGEL, ELIDIANE CIPRIANO . Corrosion resistance of 2024 aluminum alloy coated with plasma deposited a-C:H:Si:O films. **Materials Research** (São Carlos. Impresso), v. 17, p. 1449-1465, 2014.

Capítulo de livros publicado

1. MIYAZAKI, C. M. ; BARROS, A. ; Daniela Branco Tavares Mascagni ; Juliana Santos Graça ; Paula Pereira Campos ; FERREIRA, M. . Self-assembly Thin Films for Sensing. In: Cesar da Paixão, Thiago Regis Longo, Reddy, Subrayal M. (Org.). **Materials for Chemical Sensing**. 1ed.: Springer International Publishing, 2016, v. 6, p. 141-164.

Trabalhos apresentados em eventos

1. Daniela Branco Tavares Mascagni; Marystela Ferreira. Amperometric biosensor based on layer-by-layer film of functionalized reduced graphene oxide for the glucose detection in real samples. In: XV Brazilian MRS Meeting, 2016, Campinas. XV Brazilian MRS Meeting, 2016.

2. Thais Mota de Souza; Daniela Branco Tavares Mascagni; Marystela Ferreira. Biossensor eletroquímico fabricado a partir de nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro para a detecção de glicose. In: IV Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2016, Sorocaba. IV Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2016.
3. Gustavo Rodrigues; Daniela Branco Tavares Mascagni; Marystela Ferreira. Sensor eletroquímico baseado em nanofolhas de grafeno e nanopartículas para a detecção de Parationa Metálica. In: IV Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2016, Sorocaba. IV Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2016.
4. Daniela Branco Tavares Mascagni; Marystela Ferreira. LbL films of graphene nanosheets for electrochemical glucose biosensor. In: 2nd Workshop: Electrochemistry, from Sensing and Energy Conversion and Storage, São Paulo, USP, 2015.
5. Daniela Branco Tavares Mascagni, Antonio Riul Junior, Nilson C. da Cruz e Marystela Ferreira. Layer-by-Layer (LbL) Films of Functionalized Reduced Graphene Oxide Nanosheets for Glucose Detection. In: III Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, Sorocaba. UFSCar, 2015.
6. Daniela Branco Tavares Mascagni, Antonio Riul Junior, Nilson C. da Cruz e Marystela Ferreira. Layer-by-Layer (LbL) Films of Functionalized Reduced Graphene Oxide Nanosheets for Glucose Detection. In: 2015 MRS SPRING MEETING & EXHIBIT, SAN FRANCISCO. 2015 MRS SPRING MEETING & EXHIBIT, 2015.
7. Daniela Branco Tavares Mascagni, Antonio Riul Junior, Nilson C. da Cruz e Marystela Ferreira “Biossensor eletroquímico de glicose fabricado a partir de filme automontado por adsorção física” In: II Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, Sorocaba, UFSCar, 2014.
8. Daniela Branco Tavares Mascagni; José Roberto Bortoleto; Celina M. Miyazaki, C. M. ; Antonio Riul Junior. Filmes automontados de nanofolhas de grafeno depositados pelo método dinâmico utilizando microcanais.. In: I Workshop de Pesquisa e Tecnologia em Ciência dos Materiais, 2013, Sorocaba. UFSCar, 2013.

9. Daniela Branco Tavares Mascagni; Celina M. Miyazaki; Cristiane M. Daikuzono. M.; Antonio Riul Junior, A.. Graphene nanosheets films deposited by the dynamic layer-by-layer technique. In: XII Brazilian MRS Meeting, Campos do Jordão. XII Brazilian MRS Meeting, 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIKBAS, Y.; CAPAN, R.; ERDOGAN, M.; BULUT, L.; SOYKAN, C. Optical Characterization and Swelling Behaviour of Langmuir–Blodgett Thin Films of a Novel Poly[(Styrene (ST)- Co -Glycidyl Methacrylate (GMA)]. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 241, p. 1111–1120, mar. 2017.

ADAM, H.; STANISLAW, G.; FOLKE, I. Chemical sensors definitions and classification. **Pure Appl. Chem**, v. 63, p. 1274–1250, 1991.

ALEXANDER, M.; ROJAS-OCHOA, L. F.; LESER, M.; SCHURTENBERGER, P. Structure, Dynamics, and Optical Properties of Concentrated Milk Suspensions: An Analogy to Hard-Sphere Liquids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 253, n. 1, p. 35–46, set. 2002.

AMOUZADEH TABRIZI, M.; VARKANI, J. N. Green Synthesis of Reduced Graphene Oxide Decorated with Gold Nanoparticles and Its Glucose Sensing Application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 475–482, out. 2014.

ANEESH, P. K.; NAMBIAR, S. R.; RAO, T. P.; AJAYAGHOSH, A. Electrochemically Synthesized Partially Reduced Graphene Oxide Modified Glassy Carbon Electrode for Individual and Simultaneous Voltammetric Determination of Ascorbic Acid, Dopamine and Uric Acid. **Analytical Methods**, v. 6, n. 14, p. 5322, 2014.

AOKI, P. H. B.; ALESSIO, P.; FURINI, L. N.; CONSTANTINO, C. J. L.; NEVES, T. T. A. T.; PAULOVICH, F. V.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; OLIVEIRA, O. N. Molecularly Designed Layer-by-Layer (LbL) Films to Detect Catechol Using Information Visualization Methods. **Langmuir**, v. 29, n. 24, p. 7542–7550, 18 jun. 2013.

ARONOFF-SPENCER, E.; VENKATESH, A. G.; SUN, A.; BRICKNER, H.; LOONEY, D.; HALL, D. A. Detection of Hepatitis C Core Antibody by Dual-Affinity Yeast Chimera and Smartphone-Based Electrochemical Sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 690–696, dez. 2016.

AVOURIS, P. Graphene: Electronic and Photonic Properties and Devices. **Nano Letters**, v. 10, n. 11, p. 4285–4294, 10 nov. 2010.

AVOURIS, P.; DIMITRAKOPOULOS, C. Graphene: synthesis and applications. **Materials Today**, v. 15, n. 3, p. 86–97, 2012.

BAI, Y.-F.; XU, T.-B.; LUONG, J. H. T.; CUI, H.-F. Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase-Boron Doped Diamond Interface: A New Solution for a Classical Problem. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 10, p. 4910–4918, 20 maio 2014.

BALAMURUGAN, T.; BERCHMANS, S. Non-Enzymatic Detection of Bilirubin Based on a Graphene–polystyrene Sulfonate Composite. **RSC Adv.**, v. 5, n. 62, p. 50470–50477, 2015.

BANKAR, S. B.; BULE, M. V.; SINGHAL, R. S.; ANANTHANARAYAN, L. Glucose oxidase — An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 489–501, jul. 2009.

BARBOSA, C. G.; CASELI, L.; PÉRES, L. O. Conjugated Polymers Nanostructured as Smart Interfaces for Controlling the Catalytic Properties of Enzymes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 476, p. 206–213, ago. 2016.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. [s.l.] Wiley, 2000.

BARROS, A. de. **Filmes de nanocompósitos de polímero condutor, nanopartículas de argila e nanopartículas de ouro para aplicação em sensores ambientais**. 2015. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Sorocaba, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/132757>>. Acesso em: 26 mar. 2017.

BARSAN, M. M.; DAVID, M.; FLORESCU, M.; ȚUGULEA, L.; BRETT, C. M. A. A New Self-Assembled Layer-by-Layer Glucose Biosensor Based on Chitosan Biopolymer Entrapped Enzyme with Nitrogen Doped Graphene. **Bioelectrochemistry**, v. 99, p. 46–52, out. 2014.

BASU, S.; BHATTACHARYYA, P. Recent developments on graphene and graphene oxide based solid state gas sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 1–21, out. 2012.

BATZILL, M. The surface science of graphene: Metal interfaces, CVD synthesis, nanoribbons, chemical modifications, and defects. **Surface Science Reports**, v. 67, n. 3–4, p. 83–115, mar. 2012.

BHAT, S. A.; RATHER, M. A.; PANDIT, S. A.; INGOLE, P. P.; BHAT, M. A. Sensitive Electrochemical Sensing of Acetaminophen and Hydroquinone over Single-Pot Synthesized Stabilizer Free Ag/Ag-Oxide-Graphene Nanocomposites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 783, p. 280–287, dez. 2016.

BLAKE, P.; BRIMICOMBE, P. D.; NAIR, R. R.; JIANG, D.; SCHEDIN, F.; PONOMARENKO, L. A.; MOROZOV, S. V.; GLEESON, H. F.; HILL, E. W.; GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. Graphene-Based Liquid Crystal Device. **Nano Letters**, v. 8, n. 6, p. 1704–1708, 2008.

BLIN, J. L.; GÉRARDIN, C.; CARTERET, C.; RODEHÜSER, L.; SELVE, C.; STÉBÉ, M. J. Direct One-Step Immobilization of Glucose Oxidase in Well-Ordered Mesostructured Silica Using a Nonionic Fluorinated Surfactant. **Chemistry of Materials**, v. 17, n. 6, p. 1479–1486, mar. 2005.

BONACCORSO, F.; SUN, Z.; HASAN, T.; FERRARI, A. C. Graphene photonics and optoelectronics. **Nature Photonics**, v. 4, n. 9, p. 611–622, set. 2010.

BUENO, L.; PAIXÃO, T. R. L. C. A copper interdigitated electrode and chemometrical tools used for the discrimination of the adulteration of ethanol fuel with water. **Talanta**, v. 87, p. 210–215, dez. 2011.

CAI, X.; GAO, X.; WANG, L.; WU, Q.; LIN, X. A layer-by-layer assembled and carbon nanotubes/gold nanoparticles-based bienzyme biosensor for cholesterol detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 181, p. 575–583, maio 2013.

CASH, K. J.; CLARK, H. A. Nanosensors and Nanomaterials for Monitoring Glucose in Diabetes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 12, p. 584–593, dez. 2010.

CHAUHAN, N.; CHAWLA, S.; PUNDIR, C. S.; JAIN, U. An Electrochemical Sensor for Detection of Neurotransmitter-Acetylcholine Using Metal Nanoparticles, 2D Material and Conducting Polymer Modified Electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 377–383, mar. 2017.

CHEN, J.; YAO, B.; LI, C.; SHI, G. An Improved Hummers Method for Eco-Friendly Synthesis of Graphene Oxide. **Carbon**, v. 64, p. 225–229, nov. 2013.

CHEN, L.; TSE, W. H.; CHEN, Y.; MCDONALD, M. W.; MELLING, J.; ZHANG, J. Nanostructured Biosensor for Detecting Glucose in Tear by Applying Fluorescence Resonance Energy Transfer Quenching Mechanism. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 91, p. 393–399, maio 2017.

CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29–45, 1962.

DALMASSO, P. R.; PEDANO, M. L.; RIVAS, G. A. Supramolecular architecture based on the self-assembling of multiwall carbon nanotubes dispersed in polyhistidine and glucose oxidase: Characterization and analytical applications for glucose biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 76–81, jan. 2013.

DANTAS, C. A. R. **Fabricação de microcanais para integração de uma “língua eletrônica” em um sistema lab-on-a-chip**. 2009. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Sorocaba, 2009.

DASH, G. N.; PATTANAIK, S. R.; BEHERA, S. Graphene for Electron Devices: The Panorama of a Decade. **IEEE Journal of the Electron Devices Society**, v. 2, n. 5, p. 77–104, set. 2014.

DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. **Science**, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 29 ago. 1997.

DECHER, G.; SCHLENOFF, J. B. **Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2012.

DESHMUKH, K.; AHAMED, M. B.; SADASIVUNI, K. K.; PONNAMMA, D.; ALMAADEED, M. A.-A.; KHADHEER PASHA, S. K.; DESHMUKH, R. R.; CHIDAMBARAM, K. Graphene Oxide Reinforced Poly (4-Styrenesulfonic Acid)/Polyvinyl Alcohol Blend Composites with Enhanced Dielectric Properties for Portable and Flexible Electronics. **Materials Chemistry and Physics**, v. 186, p. 188–201, jan. 2017.

DREYER, D. R.; JIA, H.-P.; BIELAWSKI, C. W. Graphene Oxide: A Convenient Carbocatalyst for Facilitating Oxidation and Hydration Reactions. **Angewandte Chemie**, v. 122, n. 38, p. 6965–6968, 10 set. 2010.

DU, F.-P.; WANG, J.-J.; TANG, C.-Y.; TSUI, C.-P.; ZHOU, X.-P.; XIE, X.-L.; LIAO, Y.-G. Water-soluble graphene grafted by poly(sodium 4-styrenesulfonate) for enhancement of electric capacitance. **Nanotechnology**, v. 23, n. 47, p. 475704, 30 nov. 2012.

FERANCOVÁ, A.; HATTUNIEMI, M. K.; SESAY, A. M.; RÄTY, J. P.; VIRTANEN, V. T. Electrochemical Monitoring of Nickel(II) in Mine Water. **Mine Water and the Environment**, v. 35, n. 4, p. 547–552, dez. 2016.

FERREIRA, M.; FIORITO, P. A.; OLIVEIRA, O. N.; CÓRDOBA DE TORRESI, S. I. Enzyme-mediated amperometric biosensors prepared with the Layer-by-Layer (LbL) adsorption technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1611–1615, jul. 2004.

FU, L.; LAI, G.; YU, A. Preparation of β -Cyclodextrin Functionalized Reduced Graphene Oxide: Application for Electrochemical Determination of Paracetamol. **RSC Adv.**, v. 5, n. 94, p. 76973–76978, 2015.

GAN, X.; ZHAO, H. A Review: Nanomaterials Applied in Graphene-Based Electrochemical Biosensors. **Sensor and Materials**, v. 27, n. 2, p. 191–215, 2015.

GAO, Y.; CHEN, X.; XU, H.; ZOU, Y.; GU, R.; XU, M.; JEN, A. K.-Y.; CHEN, H. Highly-Efficient Fabrication of Nanoscrolls from Functionalized Graphene Oxide by Langmuir–Blodgett Method. **Carbon**, v. 48, n. 15, p. 4475–4482, dez. 2010.

GAUTAM, M.; JAYATISSA, A. H. Ammonia gas sensing behavior of graphene surface decorated with gold nanoparticles. **Solid-State Electronics**, v. 78, p. 159–165, dez. 2012.

GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Development of a Carbon Film Electrode Ferrocene-Mediated Glucose Biosensor. **Analytical Letters**, v. 38, n. 6, p. 907–920, abr. 2005.

GORTON, L.; LINDGREN, A.; LARSSON, T.; MUNTEANU, F. D.; RUZGAS, T.; GAZARYAN, I. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, n. 1, p. 91–108, 1999.

GRAÇA, J. S.; DE OLIVEIRA, R. F.; DE MORAES, M. L.; FERREIRA, M. Amperometric Glucose Biosensor Based on Layer-by-Layer Films of Microperoxidase-11 and Liposome-Encapsulated Glucose Oxidase. **Bioelectrochemistry**, v. 96, p. 37–42, abr. 2014.

GU, H.; YU, Y.; LIU, X.; NI, B.; ZHOU, T.; SHI, G. Layer-by-layer self-assembly of functionalized graphene nanoplates for glucose sensing in vivo integrated with on-line microdialysis system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 118–126, fev. 2012.

GUO, H.-L.; WANG, X.-F.; QIAN, Q.-Y.; WANG, F.-B.; XIA, X.-H. A Green Approach to the Synthesis of Graphene Nanosheets. **ACS Nano**, v. 3, n. 9, p. 2653–2659, 22 set. 2009.

GÜR, B.; IŞIK, M.; KIRANŞAN, K. D.; ALANYALIOĞLU, M.; BEYDEMİR, Ş.; MERAL, K. High Enzymatic Activity Preservation of Malate Dehydrogenase Immobilized in a Langmuir–Blodgett Film and Its Electrochemical Biosensor Application for Malic Acid Detection. **RSC Adv.**, v. 6, n. 83, p. 79792–79797, 2016.

HAOUZ, A.; TWIST, C.; ZENTZ, C.; TAUC, P.; ALPERT, B. Dynamic and structural properties of glucose oxidase enzyme. **European biophysics journal**, v. 27, n. 1, p. 19–25, 1998.

HEINZE, J. Cyclic Voltammetry—“Electrochemical Spectroscopy”. *New Analytical Methods (25)*. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 23, n. 11, p. 831–847, 1 nov. 1984.

HIGSON, S. **Química Analítica**. [s.l.] Grupo A Educação, 2009.

HORNYAK, G. L.; TIBBALS, H. F.; DUTTA, J. **Introduction to nanoscience and nanotechnology**. [s.l.] CRC Press, 2009.

HSU, C.-L.; LIN, J.-H.; HSU, D.-X.; WANG, S.-H.; LIN, S.-Y.; HSUEH, T.-J. Enhanced Non-Enzymatic Glucose Biosensor of ZnO Nanowires via Decorated Pt Nanoparticles and Illuminated with UV/Green Light Emitting Diodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 150–159, jan. 2017.

HUMMERS JR, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, 1958a.

HUMMERS JR, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339–1339, 1958b.

HWA, K.-Y.; SUBRAMANI, B. Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles on Graphene–carbon Nanotube Hybrid for Glucose Biosensor Applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 127–133, dez. 2014.

JAIN, U.; CHAUHAN, N. Glycated Hemoglobin Detection with Electrochemical Sensing Amplified by Gold Nanoparticles Embedded N-Doped Graphene Nanosheet. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 578–584, mar. 2017.

JIANG, G.; BABA, A.; ADVINCULA, R. Nanopatterning and Fabrication of Memory Devices from Layer-by-Layer Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene)–Poly(Styrene Sulfonate) Ultrathin Films. **Langmuir**, v. 23, n. 2, p. 817–825, jan. 2007.

KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; AKSAY, I. A.; LIU, J.; LIN, Y. Glucose Oxidase–graphene–chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 4, p. 901–905, dez. 2009.

KHADEM, M.; FARIDBOD, F.; NOROUZI, P.; FOROUSHANI, A. R.; GANJALI, M. R.; SHAHTAHERI, S. J. Biomimetic Electrochemical Sensor Based on Molecularly Imprinted Polymer for Dicloran Pesticide Determination in Biological and Environmental Samples. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 13, n. 11, p. 2077–2084, nov. 2016.

KHAN, Z. U.; KAUSAR, A.; ULLAH, H.; BADSHAH, A.; KHAN, W. U. A Review of Graphene Oxide, Graphene Buckypaper, and Polymer/Graphene Composites: Properties and Fabrication Techniques. **Journal of Plastic Film and Sheeting**, v. 32, n. 4, p. 336–379, 1 out. 2016.

KIM, F.; COTE, L. J.; HUANG, J. Graphene Oxide: Surface Activity and Two-Dimensional Assembly. **Advanced Materials**, v. 22, n. 17, p. 1954–1958, 4 maio 2010.

KIM, H.-U.; KIM, H. Y.; KULKARNI, A.; AHN, C.; JIN, Y.; KIM, Y.; LEE, K.-N.; LEE, M.-H.; KIM, T. A Sensitive Electrochemical Sensor for in Vitro Detection of Parathyroid Hormone Based on a MoS₂-Graphene Composite. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep34587>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

KIM, J. W.; KANG, D.; KIM, T. H.; LEE, S. G.; BYUN, N.; LEE, D. W.; SEO, B. H.; RUOFF, R. S.; SHIN, H. S. Mosaic-like Monolayer of Graphene Oxide Sheets Decorated with Tetrabutylammonium Ions. **ACS Nano**, v. 7, n. 9, p. 8082–8088, 24 set. 2013.

KULKARNI, D. D.; CHOI, I.; SINGAMANENI, S. S.; TSUKRUK, V. V. Graphene Oxide Polyelectrolyte - Nanomembranes. **ACS Nano**, v. 4, n. 8, p. 4667–4676, 2010.

LAYEK, R. K.; NANDI, A. K. A review on synthesis and properties of polymer functionalized graphene. **Polymer**, v. 54, n. 19, p. 5087–5103, ago. 2013.

LI, Y.; DENG, C.; YANG, M. Facilely Prepared Composites of Polyelectrolytes and Graphene as the Sensing Materials for the Detection of Very Low Humidity. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 194, p. 51–58, abr. 2014.

LIANG, W.; ZHUOBIN, Y. Direct electrochemistry of glucose oxidase at a gold electrode modified with single-wall carbon nanotubes. **Sensors**, v. 3, n. 12, p. 544–554, 2003.

LIN, Q.; LI, Y.; YANG, M. Gas sensing properties of layer-by-layer self-assembled ultrathin film of polyaniline/titanium dioxide. **Synthetic Metals**, v. 162, n. 24, p. 2242–2249, dez. 2012.

LIU, G.; LIN, Y. Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 3, p. 835–843, fev. 2006.

LIU, Y.; GAO, L.; SUN, J.; WANG, Y.; ZHANG, J. Stable Nafion-functionalized graphene dispersions for transparent conducting films. **Nanotechnology**, v. 20, n. 46, p. 465605, 2009.

LIU, Y.; YU, D.; ZENG, C.; MIAO, Z.; DAI, L. Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. **Langmuir**, v. 26, n. 9, p. 6158–6160, 4 maio 2010.

LÓPEZ-DÍAZ, D.; MERCEDES VELÁZQUEZ, M.; BLANCO DE LA TORRE, S.; PÉREZ-PISONERO, A.; TRUJILLANO, R.; FIERRO, J. L. G.; CLARAMUNT, S.; CIRERA, A. The Role of Oxidative Debris on Graphene Oxide Films. **ChemPhysChem**, v. 14, n. 17, p. 4002–4009, 2 dez. 2013.

LU, M.; XIAO, R.; ZHANG, X.; NIU, J.; ZHANG, X.; WANG, Y. Novel Electrochemical Sensing Platform for Quantitative Monitoring of Hg(II) on DNA-Assembled Graphene Oxide with Target Recycling. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 267–271, nov. 2016.

LUAN, E.; ZHENG, Z.; LI, X.; GU, H.; LIU, S. Inkjet-Assisted Layer-by-Layer Printing of Quantum Dot/Enzyme Microarrays for Highly Sensitive Detection of Organophosphorous Pesticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 916, p. 77–83, abr. 2016.

LUCKARIFHEATHER, H. R.; ATANASSOV, P. B.; JOHNSON, G. R. **Enzymatic Fuel Cells: From Fundamentals to Applications**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2014.

LUO, Z.; YUWEN, L.; HAN, Y.; TIAN, J.; ZHU, X.; WENG, L.; WANG, L. Reduced Graphene Oxide/PAMAM–silver Nanoparticles Nanocomposite Modified Electrode for Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Glucose Sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 36, n. 1, p. 179–185, jun. 2012.

MANI, V.; DEVADAS, B.; CHEN, S.-M. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase at Electrochemically Reduced Graphene Oxide-Multiwalled Carbon Nanotubes Hybrid Material Modified Electrode for Glucose Biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 309–315, mar. 2013.

MANSUR, A.; MANSUR, H.; GONZÁLEZ, J. Enzyme-Polymers Conjugated to Quantum-Dots for Sensing Applications. **Sensors**, v. 11, n. 12, p. 9951–9972, 21 out. 2011.

MARCANO, D. C.; KOSYNKIN, D. V.; BERLIN, J. M.; SINITSKII, A.; SUN, Z.; SLESAREV, A.; ALEMANY, L. B.; LU, W.; TOUR, J. M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. **ACS Nano**, v. 4, n. 8, p. 4806–4814, 24 ago. 2010.

MASCAGNI, D. B. T.; MIYAZAKI, C. M.; DA CRUZ, N. C.; DE MORAES, M. L.; RIUL, A.; FERREIRA, M. Layer-by-Layer Assembly of Functionalized Reduced Graphene Oxide for Direct Electrochemistry and Glucose Detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 739–745, nov. 2016.

MATSUMOTO, K.; TORIMARU, A.; ISHITOBI, S.; SAKAI, T.; ISHIKAWA, H.; TOKO, K.; MIURA, N.; IMATO, T. Preparation and characterization of a polyclonal antibody from rabbit for detection of trinitrotoluene by a surface plasmon resonance biosensor. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 305–311, 15 dez. 2005.

MEISSNER, M.; GRUENEWALD, M.; SOJKA, F.; UDHARDT, C.; FORKER, R.; FRITZ, T. Highly ordered growth of PTCDA on epitaxial bilayer graphene. **Surface Science**, v. 606, n. 21–22, p. 1709–1715, nov. 2012.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237–256, 2002.

MIYAZAKI, C. M.; BARROS, A. de; MASCAGNI, D. B. T.; GRAÇA, J. S.; CAMPOS, P. P.; FERREIRA, M. Self-assembly Thin Films for Sensing. In: PAIXÃO, T. R. L. C.; REDDY, S. M. (Ed.). **Materials for Chemical Sensing**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 141–164.

MORAES, M. L.; PETRI, L.; OLIVEIRA, V.; OLIVATI, C. A.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; PAULOVICH, F. V.; OLIVEIRA, O. N.; FERREIRA, M. Detection of glucose and triglycerides using information visualization methods to process impedance spectroscopy data. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 166–167, p. 231–238, maio 2012.

NELSON, K. Y.; LEHNINGER, A. L.; COX. **Lehninger Princípios de bioquímica**. [s.l.] Sarvier, 2002.

OHNUKI, H.; SAIKI, T.; KUSAKARI, A.; ICHIHARA, M.; IZUMI, M. Immobilization of Glucose Oxidase in Langmuir–Blodgett Films Containing Prussian Blue Nano-Clusters. **Thin Solid Films**, v. 516, n. 24, p. 8860–8864, out. 2008.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, 2013. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20130040>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

PALANISAMY, S.; KARUPPIAH, C.; CHEN, S.-M. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Glucose Oxidase Immobilized on Reduced Graphene Oxide and Silver Nanoparticles Nanocomposite Modified Electrode. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 164–169, fev. 2014.

PARK, S.; AN, J.; POTTS, J. R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R. S. Hydrazine-Reduction of Graphite- and Graphene Oxide. **Carbon**, v. 49, n. 9, p. 3019–3023, ago. 2011.

PARVIZ, D.; DAS, S.; AHMED, H. S. T.; IRIN, F.; BHATTACHARIA, S.; GREEN, M. J. Dispersions of Non-Covalently Functionalized Graphene with Minimal Stabilizer. **ACS Nano**, v. 6, n. 10, p. 8857–8867, 23 out. 2012.

PAUL, H.; MOHANTA, D. Hydrazine Reduced Exfoliated Graphene/Graphene Oxide Layers and Magnetoconductance Measurements of Ge-Supported Graphene Layers. **Applied Physics A**, v. 103, n. 2, p. 395–402, maio 2011.

PEI, S.; CHENG, H.-M. The Reduction of Graphene Oxide. **Carbon**, v. 50, n. 9, p. 3210–3228, ago. 2012.

PENG, D.; ZHANG, J.; QIN, D.; CHEN, J.; SHAN, D.; LU, X. An Electrochemical Sensor Based on Polyelectrolyte-Functionalized Graphene for Detection of 4-Nitrophenol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 734, p. 1–6, nov. 2014.

PETTY, M. C. Langmuir-blodgett films. **Endeavour**, v. 7, n. 2, p. 65–69, 1983.

PORTACCIO, M.; DELLA VENTURA, B.; MITA, D. G.; MANOLOVA, N.; STOILOVA, O.; RASHKOV, I.; LEPORE, M. FT-IR Microscopy Characterization of Sol–gel Layers Prior and after Glucose Oxidase Immobilization for Biosensing Applications. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 204–211, fev. 2011.

QI, G.; WANG, Y.; ZHANG, B.; SUN, D.; FU, C.; XU, W.; XU, S. Glucose Oxidase Probe as a Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Glucose. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 26, p. 7513–7520, out. 2016.

QIU, H.-J.; GUAN, Y.; LUO, P.; WANG, Y. Recent Advance in Fabricating Monolithic 3D Porous Graphene and Their Applications in Biosensing and Biofuel Cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 85–95, mar. 2017.

RANI, A.; OH, K. A.; KOO, H.; LEE, H. jung; PARK, M. Multilayer Films of Cationic Graphene-Polyelectrolytes and Anionic Graphene-Polyelectrolytes Fabricated Using Layer-by-Layer Self-Assembly. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 11, p. 4982–4989, mar. 2011.

RCSB PDB - 1CF3: GLUCOSE OXIDASE FROM APERGILLUS NIGER Structure Summary Page. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1cf3>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

REBECCA J. GREEN; FRAZIER, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C. J.; TENDLER, S. J. B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 1823–1835, 2000.

REN, Q.; FENG, L.; FAN, R.; GE, X.; SUN, Y. Water-Dispersible Triethylenetetramine-Functionalized Graphene: Preparation, Characterization and Application as an Amperometric Glucose Sensor. **Materials Science and Engineering: C**, v. 68, p. 308–316, nov. 2016.

RIBET, F.; STEMME, G.; ROXHED, N. Ultra-Miniaturization of a Planar Amperometric Sensor Targeting Continuous Intradermal Glucose Monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 90, p. 577–583, abr. 2017.

ROBERTS, G. G. Langmuir-Blodgett Films. **Contemporary Physics**, v. 25, n. 2, p. 109–128, mar. 1984.

ROBERTS, G. G. An Applied Science Perspective of Langmuir-Blodgett Films. **Advances in Physics**, v. 34, n. 4, p. 475–512, jan. 1985.

ROUSE, J. H.; LILLEHEI, P. T. Electrostatic Assembly of Polymer/Single Walled Carbon Nanotube Multilayer Films. **Nano Letters**, v. 3, n. 1, p. 59–62, jan. 2003.

SADRIEH, N.; BROWER, J.; YU, L.; DOUB, W.; STRAUGHN, A.; MACHADO, S.; PELSOR, F.; MARTIN, E. S.; MOORE, T.; REEPMAYER, J.; TOLER, D.; NGUYENPHO, A.; ROBERTS, R.; SCHUIRMANN, D. J.; NASR, M.; BUHSE, L. Stability, Dose Uniformity, and Palatability of Three Counterterrorism Drugs—Human Subject and Electronic Tongue Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 10, p. 1747–1756, 22 set. 2005.

SAPOUNTZI, E.; BRAIEK, M.; VOCANSON, F.; CHATEAUX, J.-F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; LAGARDE, F. Gold Nanoparticles Assembly on Electrospun Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(Ethyleneimine)/Glucose Oxidase Nanofibers for Ultrasensitive Electrochemical Glucose Biosensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 238, p. 392–401, jan. 2017.

SEREDYCH, M.; ROSSIN, J. A.; BANDOSZ, T. J. Changes in Graphite Oxide Texture and Chemistry upon Oxidation and Reduction and Their Effect on Adsorption of Ammonia. **Carbon**, v. 49, n. 13, p. 4392–4402, nov. 2011.

SHERVEDANI, R. K.; AMINI, A. Novel Graphene-Gold Hybrid Nanostructures Constructed via Sulfur Modified Graphene: Preparation and Characterization by Surface and Electrochemical Techniques. **Electrochimica Acta**, v. 121, p. 376–385, mar. 2014.

SI, Y.; SAMULSKI, E. T. Synthesis of Water Soluble Graphene. **Nano Letters**, v. 8, n. 6, p. 1679–1682, jun. 2008.

SIERRA-ROSALES, P.; TOLEDO-NEIRA, C.; SQUELLA, J. A. Electrochemical Determination of Food Colorants in Soft Drinks Using MWCNT-Modified GCEs. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 1257–1264, mar. 2017.

SIERROS, K. A.; HECHT, D. S.; BANERJEE, D. A.; MORRIS, N. J.; HU, L.; IRVIN, G. C.; LEE, R. S.; CAIRNS, D. R. Durable transparent carbon nanotube films for flexible device components. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 23, p. 6977–6983, set. 2010.

SILVA, J. R.; DE SOUZA, N. C.; OLIVEIRA, O. N. Adsorption kinetics and charge inversion in layer-by-layer films from nickel tetrasulfonated phthalocyanine and poly(allylamine hydrochloride). **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 18–19, p. 937–940, abr. 2010.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de análise instrumental**. [s.l.] Bookman, 2002. reimpressão, 2002.

SOLDANO, C.; MAHMOOD, A.; DUJARDIN, E. Production, properties and potential of graphene. **Carbon**, v. 48, n. 8, p. 2127–2150, 2010.

STANKOVICH, S.; PINER, R. D.; CHEN, X.; WU, N.; NGUYEN, S. B. T.; RUOFF, R. S. Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly (sodium 4-styrenesulfonate). **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 155–158, 2006.

SU, P.-G.; SHIU, C.-C. Flexible H₂ sensor fabricated by layer-by-layer self-assembly of thin films of polypyrrole and modified in situ with Pt nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 157, n. 1, p. 275–281, set. 2011.

SUN, Z.; CHANG, H. Graphene and Graphene-like Two-Dimensional Materials in Photodetection: Mechanisms and Methodology. **ACS Nano**, v. 8, n. 5, p. 4133–4156, 27 maio 2014.

SUN, Z.; LIAO, T.; ZHANG, Y.; SHU, J.; ZHANG, H.; ZHANG, G.-J. Biomimetic Nanochannels Based Biosensor for Ultrasensitive and Label-Free Detection of Nucleic Acids. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 194–201, dez. 2016.

SYEDMORADI, L.; DANESHPOUR, M.; ALVANDIPOUR, M.; GOMEZ, F. A.; HAJGHASSEM, H.; OMIDFAR, K. Point of Care Testing: The Impact of Nanotechnology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 373–387, jan. 2017.

TAN, F.; CONG, L.; SAUCEDO, N. M.; GAO, J.; LI, X.; MULCHANDANI, A. An Electrochemically Reduced Graphene Oxide Chemiresistive Sensor for Sensitive Detection of Hg²⁺ Ion in Water Samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 320, p. 226–233, dez. 2016.

TELLECHEA, E.; WILSON, K. J.; BRAVO, E.; HAMAD-SCHIFFERLI, K. Engineering the Interface between Glucose Oxidase and Nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, n. 11, p. 5190–5200, 20 mar. 2012.

TITELMAN, G. I.; GELMAN, V.; BRON, S.; KHALFIN, R. L.; COHEN, Y.; BIANCO-PELED, H. Characteristics and Microstructure of Aqueous Colloidal Dispersions of Graphite Oxide. **Carbon**, v. 43, n. 3, p. 641–649, jan. 2005.

UNNIKRISHNAN, B.; PALANISAMY, S.; CHEN, S.-M. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 70–75, jan. 2013a.

UNNIKRISHNAN, B.; PALANISAMY, S.; CHEN, S.-M. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene–glucose oxidase biocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 39, n. 1, p. 70–75, jan. 2013b.

WALCARIUS, A.; MINTEER, S. D.; WANG, J.; LIN, Y.; MERKOÇI, A. Nanomaterials for Bio-Functionalized Electrodes: Recent Trends. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 38, p. 4878, 2013.

WANG, F.; XU, Y.; WANG, L.; LU, K.; YE, B. Immobilization of DNA on a Glassy Carbon Electrode Based on Langmuir–Blodgett Technique: Application to the Detection of Epinephrine. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 6, p. 2127–2133, jun. 2012a.

WANG, H.; OHNUKI, H.; ENDO, H.; IZUMI, M. Impedimetric and Amperometric Bifunctional Glucose Biosensor Based on Hybrid Organic–inorganic Thin Films. **Bioelectrochemistry**, v. 101, p. 1–7, fev. 2015.

WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, n. 12, p. 983, 2001.

WANG, J. Electrochemical Biosensors: Towards Point-of-Care Cancer Diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887–1892, abr. 2006.

WANG, K.-H.; SYU, M.-J.; CHANG, C.-H.; LEE, Y.-L. Immobilization of Glucose Oxidase by Langmuir–Blodgett Technique for Fabrication of Glucose Biosensors: Headgroup Effects of Template Monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 164, n. 1, p. 29–36, mar. 2012b.

WANG, X.; BAI, H.; SHI, G. Size Fractionation of Graphene Oxide Sheets by PH-Assisted Selective Sedimentation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 16, p. 6338–6342, 27 abr. 2011.

WANG, X.; ZHI, L.; MÜLLEN, K. Transparent, conductive graphene electrodes for dye-sensitized solar cells. **Nano letters**, v. 8, n. 1, p. 323–327, 2008.

WEN, J.; JIANG, Y.; YANG, Y.; LI, S. Conducting Polymer and Reduced Graphene Oxide Langmuir–Blodgett Films: A Hybrid Nanostructure for High Performance Electrode Applications. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 25, n. 2, p. 1063–1071, fev. 2014.

WENG, X.; CAO, Q.; LIANG, L.; CHEN, J.; YOU, C.; RUAN, Y.; LIN, H.; WU, L. Simultaneous Determination of Dopamine and Uric Acid Using Layer-by-Layer Graphene and Chitosan Assembled Multilayer Films. **Talanta**, v. 117, p. 359–365, dez. 2013.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes care**, v. 27, n. 5, p. 1047–1053, 2004.

WU, P.; SHAO, Q.; HU, Y.; JIN, J.; YIN, Y.; ZHANG, H.; CAI, C. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Assembled on Graphene and Application to Glucose Detection. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8606–8614, dez. 2010.

YANG, D.-Q.; ROCHETTE, J.-F.; SACHER, E. Spectroscopic evidence for π - π interaction between poly (diallyl dimethylammonium) chloride and multiwalled carbon nanotubes. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 10, p. 4481–4484, 2005.

YANG, Y.; YANG, X.; YANG, W.; LI, S.; XU, J.; JIANG, Y. Ordered and ultrathin reduced graphene oxide LB films as hole injection layers for organic light-emitting diode. **Nanoscale research letters**, v. 9, n. 1, p. 537, 2014.

YOON, H. C.; KIM, H.-S. Multilayered Assembly of Dendrimers with Enzymes on Gold: Thickness-Controlled Biosensing Interface. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 922–926, mar. 2000.

YU, H.; JIANG, J.; ZHANG, Z.; WAN, G.; LIU, Z.; CHANG, D.; PAN, H. Preparation of Quantum Dots CdTe Decorated Graphene Composite for Sensitive Detection of Uric Acid and Dopamine. **Analytical Biochemistry**, v. 519, p. 92–99, fev. 2017.

YU, Y.; CHEN, Z.; HE, S.; ZHANG, B.; LI, X.; YAO, M. Direct Electron Transfer of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on PDDA-Capped Gold Nanoparticle Modified Graphene/Multi-Walled Carbon Nanotubes Electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, p. 147–152, fev. 2014.

ZAHARIE-BUTUCEL, D.; DIGIANANTONIO, L.; LEORDEAN, C.; RESSIER, L.; ASTILEAN, S.; FARCAU, C. Flexible Transparent Sensors from Reduced Graphene Oxide Micro-Stripes Fabricated by Convective Self-Assembly. **Carbon**, v. 113, p. 361–370, mar. 2017.

ZELLER, P.; DÄNHARDT, S.; GSELL, S.; SCHRECK, M.; WINTTERLIN, J. Scalable synthesis of graphene on single crystal Ir(111) films. **Surface Science**, v. 606, n. 19–20, p. 1475–1480, out. 2012.

ZENG, G.; XING, Y.; GAO, J.; WANG, Z.; ZHANG, X. Unconventional Layer-by-Layer Assembly of Graphene Multilayer Films for Enzyme-Based Glucose and Maltose Biosensing. **Langmuir**, v. 26, n. 18, p. 15022–15026, 21 set. 2010.

ZHANG, C.; LV, W.; XIE, X.; TANG, D.; LIU, C.; YANG, Q.-H. Towards low temperature thermal exfoliation of graphite oxide for graphene production. **Carbon**, v. 62, p. 11–24, out. 2013a.

ZHANG, J.; ZHOU, T.; QIAO, J.; LIU, Y.; ZHANG, J. Hydroxyl Anion Conducting Membranes Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(Diallyldimethylammonium Chloride) for Alkaline Fuel Cell Applications: Effect of Molecular Weight. **Electrochimica Acta**, v. 111, p. 351–358, nov. 2013b.

ZHANG, W.; WU, L.; DU, L.; YUE, L.; GUAN, R.; ZHANG, Q.; HOU, G.; SHAO, R. Layer-by-Layer Assembly Modification to Prepare Firmly Bonded Si–graphene Composites for High-Performance Anodes. **RSC Adv.**, v. 6, n. 6, p. 4835–4842, 2016.

ZHANG, X.; LIU, D.; LI, L.; YOU, T. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase on Novel Free-Standing Nitrogen-Doped Carbon Nanospheres@Carbon Nanofibers Composite Film. **Scientific Reports**, v. 5, p. 9885, 6 maio 2015.

ZHENG, Q.; SHI, L.; YANG, J. Langmuir-Blodgett Assembly of Ultra-Large Graphene Oxide Films for Transparent Electrodes. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 22, n. 10, p. 2504–2511, out. 2012.

ZHU, J.; ZHU, Z.; LAI, Z.; WANG, R.; GUO, X.; WU, X.; ZHANG, G.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; CHEN, Z. Planar amperometric glucose sensor based on glucose oxidase immobilized by chitosan film on Prussian blue layer. **Sensors**, v. 2, n. 4, p. 127–136, 2002.

ZHU, Z.; GARCIA-GANCEDO, L.; FLEWITT, A. J.; XIE, H.; MOUSSY, F.; MILNE, W. I. A Critical Review of Glucose Biosensors Based on Carbon Nanomaterials: Carbon Nanotubes and Graphene. **Sensors**, v. 12, n. 12, p. 5996–6022, 10 maio 2012.

ZHU, Z.; SU, M.; MA, L.; MA, L.; LIU, D.; WANG, Z. Preparation of Graphene Oxide–silver Nanoparticle Nanohybrids with Highly Antibacterial Capability. **Talanta**, v. 117, p. 449–455, dez. 2013.

ZUCOLOTTO, V.; DAGHASTANLI, K. R. P.; HAYASAKA, C. O.; RIUL, A.;
CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA, O. N. Using Capacitance Measurements as the Detection
Method in Antigen-Containing Layer-by-Layer Films for Biosensing. **Analytical Chemistry**,
v. 79, n. 5, p. 2163–2167, mar. 2007.