

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULHO DE MESQUITA FILHO” - UNESP

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais

Gislaine Passarella Gerola

**UTILIZAÇÃO DA BIOINTERFACE NANOFIOS/ENZIMAS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES NANOESTRUTURADOS**

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Botucatu

2014

Gislaine Passarella Gerola

**UTILIZAÇÃO DA BIOINTERFACE NANOFIOS/ENZIMAS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES NANOESTRUTURADOS**

**Dissertação apresentada ao Programa
Interunidades de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Materiais da
UNESP como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciência e Tecnologia
dos Materiais**

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

Botucatu

2014

Ficha catalográfica elaborada por

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO

UNESP – Bauru

Gerola, Gislaine Passarella.

Utilização da biointerface nanofios/enzimas para o desenvolvimento de biossensores nanoestruturados. / Gislaine Passarella Gerola, 2014. 77f. Il.

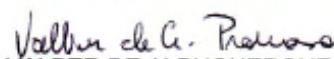
Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociência, Botucatu, 2014.

1. Biossensores. 2. Nanofios. 3. Nanoestruturas. 4. Glicose oxidase. I. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociência. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GISLAINE PASSARELLA GEROLA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DO(A) FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU.

Aos 28 dias do mês de janeiro do ano de 2014, às 08:30 horas, no(a) Sala da Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu, Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN do(a) Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia., Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI do(a) Departamento de Química / Instituto de Biociências de Botucatu, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GISLAINE PASSARELLA GEROLA, intitulada "Utilização da Biointerface nanofios/enzimas para o desenvolvimento de biosensores nanoestruturados". 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.


Prof. Dr. VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA


Prof. Dr. PAULO DOS SANTOS ROLDAN


Profa. Dra. MARGARIDA JURI SAEKI

Dedico este trabalho a toda minha Família

Especialmente a meus pais: João Gerola

(in memoriam) e Rosalina P. Gerola,

e a minha filha Brenda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Dr. Valber A. Pedrosa pela orientação, amizade, paciência e compreensão, a qual serei eternamente grata.

A todos os funcionários, estudantes e professores do Departamento de química e Bioquímica da UNESP - campus de Botucatu, pela amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica de Botucatu pela atenção e recepção durante as análises.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo nº 2012/01402-2).

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

Gerola, G. P.. “**Utilização da biointerface nanofios/enzimas para o desenvolvimento de biossensores nanoestruturados**”. 2014. 77f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais). UNESP, Botucatu 2014.

Resumo

Este projeto tem como objetivo principal o desenvolvimento de nanofios para a aplicação em biossensores. Os nanomateriais tem se destacado pela extrema sensibilidade quando funcionam como sensores biológicos. Como eles possuem virtualmente as mesmas dimensões que as moléculas que devem detectar, estes nanossensores podem revolucionar a forma com que são feitos os diagnósticos em exames médicos e biológicos. Logo este projeto consistiu-se na produção e caracterização de nanofios multissegmentados utilizando diferentes tipos de metais e polímero, os quais foram preparados pelo processo de deposição eletroquímica. Foi realizada a caracterização dos mesmos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após a síntese dos nanofios, os mesmos foram modificados para fixação da enzima glicose oxidase e foram avaliados vários parâmetros experimentais do biossensor como: a otimização do pH em 6, em função da corrente de pico obtida da glicose; a concentração enzimática de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ necessária para preparar o biossensor; como também o estudo da variação do potencial eletroquímico, onde se observou que o ideal é utilizar potencial abaixo de 0,4 V. Na construção da curva analítica para a determinação de glicose os resultados obtidos mostraram uma inclinação da reta de $7,95 \mu\text{A mol}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,997 e o limite de detecção do biossensor foi definido sendo, $3,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. O biossensor apresentou alta seletividade apenas para detecção da glicose e manteve-se com uma boa resposta de detecção de 85% em 30 dias para detecção de glicose. Assim, a utilização de nanofios para a preparação de biossensores torna-se uma alternativa para detecção direta de glicose.

Palavras chaves: Biossensores; Nanofios; Nanoestruturas; Glicose oxidase.

Gerola, G. P. **“Development of biosensors nanostructured based biointerface nanowires/enzymes”**. 2014. 77f. Dissertation (Graduate Program in Materials Science and Technology). UNESP, Botucatu 2014.

Abstract

This project has as main objective the development of nanowires for application in biosensors. Nanomaterials have been highlighted by high sensitivity when applied to biological sensors. As they have virtually the same dimensions as the molecules that should detect, these nanosensors could revolutionize the diagnoses way are made in medical and biological examinations. Therefore, in this research, we prepared and characterized multithreaded nanowires using different types of metal and polymer. These nanowires were prepared by electrochemical deposition process and characterized by scanning electron microscopy (SEM). The synthesized nanowires have been changed for the attachment of the enzyme glucose oxidase. Several experimental parameters of biosensor was evaluated as the optimization of pH (at 6), as a function of the peak current obtained from glucose; the enzyme concentration of 0.4 mg ml^{-1} required to prepare the biosensor; as well as the study of electrochemical potential variation, where it was observed that the ideal is to use potential less than 0.4 V. The analytical curve for the determination of glucose showed a slope of $7.95 \mu\text{A mol}^{-1}$, with a correlation coefficient of 0.997 and detection limit of the biosensor determined was $3.7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. The biosensor showed high selectivity only for detection of glucose and maintained a good response to glucose sensing (85%) in 30 days. Thus, the use of nanowires for the preparation of biosensors becomes an alternative to direct detection of glucose.

Key words: Biosensors, Nanowires, Nanostructures, Glucose oxidase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de moldes rígidos para síntese de nanofios. (A) Membrana de alumina porosa anódica. (B) Matriz mesoporoso de sílica.....	5
Figura 2. Fabricação de nanofios multissegmentados utilizando membranas AAO.....	10
Figura 3. Representação dos diferentes funcionamentos de um biossensor. (A) Primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração.	15
Figura 4. Célula Eletrolítica de vidro Pyrex ®.....	25
Figura 5. Esquema da produção dos nanofios pela técnica de eletrodeposição utilizando membrana de alumina porosa. (A) Ilustração da membrana, (B) contato elétrico com ouro feito pela técnica de “Sputter”, (C) metal de sacrifício – cobre depositado a um potencial de -1 V vs Ag/AgCl e uma carga de 7C, (D) deposição de ouro E^0 -0,9 V vs Ag/AgCl, (E) deposição de níquel a um E^0 -1,0 V vs Ag/AgCl, (F) deposição de pirrol a E^0 0,8 V vs Ag/AgC e, eliminação do contato elétrico e do metal de sacrifício e (G) dissolução da membrana para liberação dos nanofios.	27
Figura 6. Metodologia geral da síntese dos Nanofios multissegmentados.....	28
Figura 7. Metodologia geral da produção do biossensor desenvolvido com nanofios multissegmentados.	
Figura 8. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. A) Nanofios composto por ouro-níquel-ouro-polipirrol e B) ouro-níquel-prata-cobre.....	33
Figura 9. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. (A) Vista lateral da membrana. (B-C) Aglomerados de Nanofios de ouro. (D) Nanofios multissegmentados de Au-Ni-PPY-Ni.	34
Figura 10. Nanofios com segmentos de ouro-polipirrol com diferentes tamanhos.....	35
Figura 11. Imagens por MEV e EDX apresentando os nanofios de ouro/polipirrol modificado com CNT.	36
Figura 12. A) Nanofios compostos de ouro após dissolução da prata e B) visão mais aproximada do segmento de ouro.....	38
Figura 13. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. A) Nanofios formados de ouro e polipirrol com nanopartículas de ouro dentro do segmento polimérico e B) visão mais aproximada das nanopartículas.	39

Figura 14. Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo de carbono na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ FMCA, com velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹ .	40
Figura 15. Voltamograma cíclicos do eletrodo de carbono obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura (10 - 250 mV s ⁻¹). As medidas foram realizadas em solução de KCl pH 4,0, na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ FMCA. No inset nota-se a dependência da corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.	41
Figura 16. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura (10 (a) - 250 mV s ⁻¹ (b)). As medidas foram em solução de KCl de pH 4,0, na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ FMCA. No insert nota-se a dependência da corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.	42
Figura 17. Resposta amperométrica para 1 mmol L ⁻¹ de glucose, com os nanofios orientados na vertical (A) e posição horizontal (B). Potencial aplicado + 0,36 V (vs. Ag/AgCl) em 0,5 mmol L ⁻¹ FMCA + 10 mmol L ⁻¹ PBS (pH = 6,0).	
Figura 18. Influência do pH na corrente para a oxidação de FMCA 0,5 mmol L ⁻¹ em PBS.	45
Figura 19. Variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo (FMCA = 0,5 mmol L ⁻¹ em PBS 10 mmol L ⁻¹ , pH = 6,0, potencial fixo de 0,36 V vs. Ag/AgCl).	46
Figura 20. Efeito da dependência do potencial na resposta do biossensor para 0,5 mmol L ⁻¹ FMCA em 10 mmol L ⁻¹ PBS, pH = 6,0.	47
Figura 21. Amperograma para o biossensor em diferentes concentrações de glicose, em solução tampão fosfato 10 mmol L ⁻¹ pH = 6,0 na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ de FMCA e potencial fixo de 0,36 V vs. Ag/AgCl. <i>Inset:</i> variação da concentração de glicose.	48
Figura 22. Teste de interferentes do biossensor de glicose na presença de glicose.	50
Figura 23. Resposta do biossensor com concentração de 2 mmol L ⁻¹ de glicose em diferentes dias.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificação dos reagentes utilizados.....	23
Tabela 2. Comparação da performance de diferentes biossensores eletroquímicos para determinação de glicose.....	48

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AAO	Membrana de Óxido de Alumina Anódica
AFM	Microscopia de Força Atômica
AA	Ácido ascórbico
AP	Acetoaminofeno
CNT	Nanotubo de Carbono
CTAB	Brometo de Cetil-trimetilamônio
E°	Potencial do eletrodo
e⁻	Elétrons
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
GC	Eletrodo de Carbono Vítreo
F	Constante de Farady
FMCA	Ferrocenomonocarboxílico
GOx	Glicose Oxidase de <i>Aspergillus Niger</i>
I	Corrente
LD	Limite de Detecção
M	Metal
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
3-MPA	Ácido Mercaptoundecanóico
NHS	N- Hidroxissuccinimida
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RSD	Desvio Padrão relativo
UA	Ácido Úrico

Sumário

1- INTRODUÇÃO	1
1.1. Nanotecnologia	3
1.2. Modelos de Síntese de Nanomateriais	4
1.2. Biossensores	14
2- OBJETIVOS	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Reagentes e Soluções	23
3.2. Instrumentação	24
3.2.1. Eletrodos	25
3.2.2. Células Eletrolíticas	25
3.2.3. Ajustes de pH	25
3.3. Metodologia	26
3.3.1. Preparação de Nanofios Multissegmentados	26
3.3.2. Preparação dos Nanorods Ouro	29
3.3.3. Pré - Tratamento de Nanotubos de Carbono (CNT)	29
3.4. Desenvolvimento do Biossensor baseado em Nanofios	30
3.5. Voltametria Cíclica e Amperométrica	31
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1. Síntese de Nanofios Multissegmentados	32
4.2. Controle do tamanho dos nanofios	35
4.3. Nanofios híbridos compostos de polímero e CNT	36
4.4. Nanofios com formato de cone	37
4.5. Nanofios com nanorods de Ouro	38
4.6. Estudos Eletroquímicos Utilizando o Controle Magnético	39
4.7. Biossensores baseados em Nanofios	43
4.7.1. Efeitos da quantidade de enzima no eletrodo	45
4.7.2. Efeitos da variação do Potencial	46
4.7.3. Determinação da Curva Analítica	47
4.7.4 Testes de Substâncias Interferentes	49
4.7.5. Vida útil do Biossensor	50
5. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53

1- INTRODUÇÃO

Considerações Iniciais

Nano é um prefixo grego que significa "anão". Um nanômetro é igual a 1 milionésimo de milímetro ou 1 bilionésimo de metro. Para termos uma ideia de que escala de comprimento estamos falando, um fio de cabelo possui o diâmetro de 100 nanômetros (nm). Em virtude do tamanho nanométrico, há cada vez mais interesse em materiais nanoestruturados. Devido a suas dimensões, os nanomateriais apresentam propriedades ópticas, elétricas, mecânicas, flexibilidade e elasticidade que são excelentes para aplicações em diversas áreas tecnológicas. Os nanotubos são uma das grandes conquistas tecnológicas nascidas na década de 1990. Eles medem de 1 a 6 nm de diâmetro e até 1.000 nm de comprimento, medidas comparáveis a um fio de cabelo dividido 50 mil vezes na forma longitudinal. Mesmo os cientistas mais conservadores projetam um futuro inovador a partir da nanociência e da nanotecnologia. De acordo com documentos recentes da "American Chemical Society", o impacto da nanociência e nanotecnologia beneficiaram diferentes áreas como: nanoeletrônica, dispositivos de informação tecnológica, saúde, biotecnologia, agricultura e educação. Para ter uma ideia sobre a importância destes nanomateriais, pode-se notar que os investimentos do governo dos Estados Unidos na área de nanociência e nanotecnologia vêm aumentando a cada ano. O orçamento para o ano de 2010 teve um aumento de 25% em relação ao do ano de 2009. Essa política tem o objetivo de manter a posição norte-americana no topo da lista das descobertas de novas tecnologias. Da mesma forma, como aconteceu com a microeletrônica e com as pesquisas em genoma, a nanotecnologia desponta como a nova área da ciência que recebe grandes investimentos, tendo em vista várias aplicações práticas.

Nosso país não tem ficado inerte a esta nova realidade. Entre os anos de 2001 e 2010 o Brasil investiu cerca de R\$ 272 milhões em nanotecnologia através de ações do Programa

Nacional de Nanotecnologia (PNN), fundos setoriais, subvenções econômicas (aplicação de recursos públicos não reembolsáveis a empresas) e editais. Anualmente, os Estados Unidos e o Japão investem cerca de 1 bilhão de dólares americanos. O forte investimento feito nessa área pelos países desenvolvidos gera produtos inovadores e altamente competitivos. Daí a importância do Brasil pensar estrategicamente na nanotecnologia. Dados do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) mostram que, entre 2002 e 2005, as redes de pesquisa na área de nanomateriais envolveram cerca de 300 pesquisadores, 77 instituições de ensino e pesquisa e 13 empresas. Em 2010, ainda de acordo com o MCT, foram aprovados 200 novos projetos de pesquisa; 106 projetos estão em andamento (aprovados no período 2010-2012) dos quais 50 de pesquisa básica, 46 envolvendo empresas, 5 de cooperação internacional e 5 de impactos socioambientais. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, agência de fomento à pesquisa do Ministério da Ciência e Tecnologia, anunciou recentemente três editais para a área de nanotecnologia no valor de R\$ 300 milhões, a serem investidos até 2014. Os recursos foram destinados a incentivar a capacitação de jovens pesquisadores, formação de redes de pesquisa e a criação de um programa de intercâmbio de pesquisadores entre Brasil e outros países para os estudos e desenvolvimento de nanomateriais. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) também vem incentivando a formação de novos grupos de pesquisa no estudo de nanotecnologia. Em 2014 será inaugurado o Centro de Pesquisas Avançadas em Grafeno, Nanomateriais e Nanotecnologia (MackGrafe), da Universidade Presbiteriana Mackenzie, que será situado em São Paulo, que pretende dominar as técnicas de obtenção do grafeno, tido como a matéria-prima do século XXI. Com apoio financeiro da FAPESP e primeiro deste gênero no país, o centro contará com sofisticadas equipes, sendo que o investimento realizado na estrutura do centro é de US\$ 15 milhões.

A nanotecnologia promoverá um impacto significativo na maioria das indústrias e áreas da sociedade. Melhorando os sistemas de construção e possibilitando a fabricação de produtos mais duráveis, seguros e inteligentes, realizados por processo rápido, limpo e barato. Apresentando o potencial de mudar profundamente a economia e melhorar o padrão de vida, da mesma forma como os avanços da tecnologia da informação revolucionaram a sociedade ao longo das últimas duas décadas.

1.1. Nanotecnologia

Dentro deste contexto, a utilização de nanoestruturas tem crescido nos últimos anos devido às suas propriedades que os diferenciam de macroestruturas. Seu tamanho reduzido demonstra diferentes propriedades físicas, químicas e eletrônicas quando comparados às macromoléculas. As características únicas dos nanocompostos os credenciam a uma infinidade de aplicações importantes em ciência e tecnologia, podem, por exemplo, interligar nanochips de silício na indústria eletrônica (WANG, 2009, p. 1748), produzir materiais híbridos para torná-los mais resistentes (CAVALCANTI *et al.* 2008, p. 015103) deixar tecidos impermeáveis (INOVAÇÃO TECNOLÓGICA, 2005), produzir nanomotores (CABEZON, LANZA, ARCHAGA, 2012, p. 537), liberadores de drogas (VRIES, ZHANG, HERRMANN, 2013, p. 467) e biossensores (KIM *et al.* 2006, p. 3394). Logo a produção de nanocompostos tem sido um dos tópicos mais atuantes nas ciências nos últimos tempos, devido a seu potencial para aplicação em diversas áreas. Como consequência, o número de artigos publicados com este enfoque tem crescido constantemente.

O método mais comum para a fabricação de nanoestruturas é a tecnologia "top-down" (de grande a pequeno), onde se faz uso das técnicas de nanolitografia. No entanto, conforme nos aproximamos de tamanhos abaixo de 100 nm esta técnica apresenta o problema de

reprodutibilidade. Logo abaixo deste tamanho passa-se a utilizar a tecnologia do "bottom-up" (de pequenas a grande). Sendo uma das metodologias mais populares "bottom-up" é denominada de "template synthesis" (síntese por molde).

1.2. Modelos de Síntese de Nanomateriais

Uma das formas mais fáceis de controlar a forma e o tamanho de um nanomaterial é sintetizá-lo dentro de um molde ou modelo. Este processo é bastante utilizado no mundo da manufatura industrial. Carros, pneus, muros de concreto e brinquedos são exemplos de produtos produzidos utilizando um molde, isso permanece verdadeiro até em dimensões nanométricas. O modelo simplesmente serve como um apoio contra o qual outros tipos de materiais com morfologias semelhantes são sintetizados. Em outras palavras, o material gerado é moldado nanométricamente com sua morfologia complementar ao molde. O processo global da síntese do molde envolve geralmente os seguintes procedimentos: (1) o material precursor reage com o molde por impregnação ou incorporação, (2) as espécies sólidas são formadas por meio de reação de nucleação e (3) por último, remove-se o molde, seletivamente, a fim de recolher as nanoestruturas produzidas. Com base em diferentes tipos de moldes, o modelo de síntese pode ser classificado em: síntese por molde duro ou molde mole. Nesta dissertação utilizamos molde duro por isso discutir se - á apenas este modelo.

A síntese em molde rígido possui espaço bem definido, que pode estar na forma de: canais, poros e/ou ligado a espaços ocultos. Dois tipos de moldes encontram-se ilustrados na Figura 1. A conectividade dos poros ou canais influencia fortemente a nanoestrutura resultante. No caso de matrizes porosas como membranas de óxido de alumina anódica (AAO) (MARTIN, 1994, p. 1961) e/ou mesoporosos de sílica (YANG *et al.* 1998, p. 152), (ASEFA *et al.* 1999, p. 867) as formas sólidas são produzidas no interior dos canais. No

entanto, os nanofios fabricados a partir de nanotubos de sílica mesoporoso, estão inter-relacionados por pequenos pilares formados nos mesoporos das paredes da sílica em uma dimensão. O que se diferencia da síntese utilizando membranas AAO, é que esta metodologia produz estruturas em 3 dimensões (NORRIS, VLASOV, 2001, p. 371). Atualmente membranas AAO são os moldes rígidos mais utilizados, por causa da sua fácil preparação e reprodutibilidade. Logo o método de síntese de nanoestruturas utilizando um molde com base nas membranas AAO tem gerado bastante interesse da comunidade científica devida a sua simplicidade e fácil aplicabilidade.

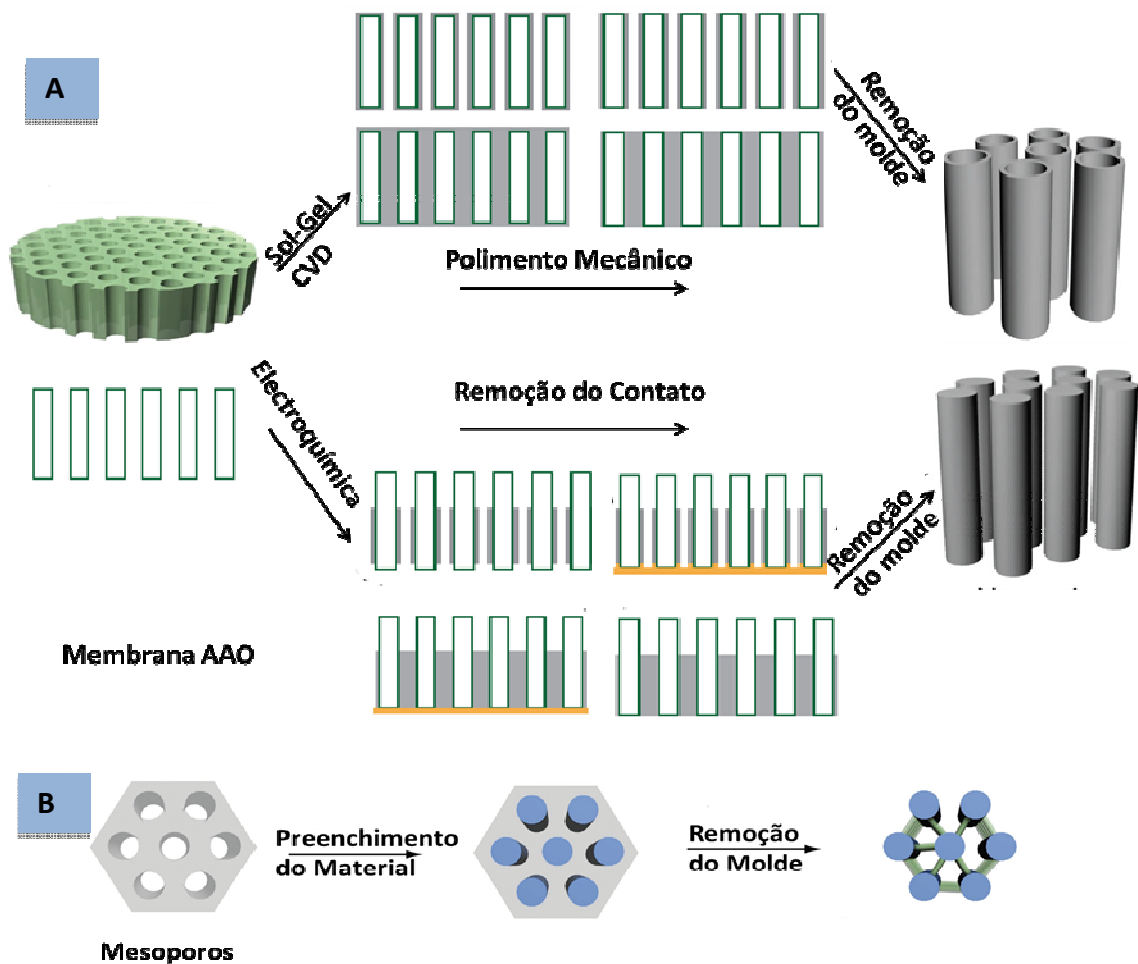


Figura 1. Exemplos de moldes rígidos para síntese de nanofios. (A) Membrana de alumina porosa anódica. (B) Matriz mesoporosa de sílica.

O grupo do professor Charles R. Martin (Universidade da Florida/EUA) foi o pioneiro nos estudos da utilização de membranas AAO para fabricação de nanoestruturas (HULTEEN, MARTIN, 1997, p. 1075), (MARTIN, 1996, p. 1739), (KLEIN *et al.* 1993, p. 902). Eles aplicaram diferentes métodos para produção de nanoestruturas por: deposição eletroquímica (BAO *et al.* 2001, p. 1631), sol-gel (LAKSHMI, DORHOUT, MARTIN, 1997, p. 857) e deposição por vapores químicos (CHE *et al.* 1998, p. 260). Também foi possível a utilização de diferentes materiais na fabricação dos nanomateriais compostos por: metais (MBINDYO *et al.* 2002, p. 4020), carbono (CHE *et al.* 1998, p. 346), semicondutores (MA, SASAKI, 2010, p. 5082), óxidos metálicos (LI *et al.* 2006, p. 548), polímeros condutores (ZANG *et al.* 2008, p. 14847), e com diferentes morfologias: nanotubos (WANG *et al.* 2006, p. 1594), nanofios (YUAN *et al.* 2008, p. 075608), nanodots (LEI, CHIM, 2005, p. 580) e nanoestruturas heterogêneas (LUI, LEE, 2008, p. 2942). Eles também demonstraram que as dimensões das nanoestruturas depositadas poderiam ser facilmente controladas regulando os poros e o tamanho dos moldes utilizados.

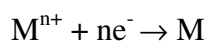
Trabalhos mais recentes encontrados na literatura relatam diversas metodologias para a fabricação de nanofios por deposição térmica (IVANOVA *et al.* 2006, p. 3383), deposição via eletroquímica (NI *et al.* 2005, p. 1746) e via síntese química (GELVES *et al.* 2006, p. 3075). Das técnicas acima citadas para a construção de nanoestruturas, a deposição via eletroquímica oferece algumas vantagens, pois não requer instrumentação de alto valor nem utilização de altas temperaturas e pressões. Este método também não consome grande tempo para produção de nanoestruturas, além de apresentar um melhor controle no tamanho dos nanomateriais fabricados. Outra vantagem é a possibilidade de construção de multissegmentos de metais/polímeros apenas variando a solução de deposição e o potencial aplicado. A técnica de deposição eletroquímica também visa dar versatilidade para a produção de diferentes formas geométricas como fios, cones, hastes entre outros. Alguns artigos encontrados na

literatura discutem o procedimento de deposição eletroquímica para preparação de nanoestruturas em detalhes (JOYCE *et al.* 2007, p. 921).

A deposição eletroquímica de nanomateriais oferece diversas vantagens que se distinguem de outros métodos de síntese de nanoestruturas (LUI, LEE, 2008, p. 2942):

- Síntese eletroquímica ocorre perto do eletrodo dentro da dupla camada elétrica, que tem uma gradiente de potencial (E^0) muito elevado de 10^5 V cm^{-1} . Sob estas condições, as reações conduzem frequentemente a produtos que não podem ser obtidos numa simples síntese química.
- Síntese eletroquímica é uma técnica de baixa temperatura, limitada pelo ponto de ebulição do eletrólito. Este pode ser aumentado usando eletrólitos de sais fundidos.
- O controle cinético pode ser exercido por meio do controle da corrente que passa através da célula, enquanto o controle termodinâmico pode ser exercido, escolhendo o potencial de célula aplicado.
- A composição e a morfologia dos nanomateriais podem ser controladas variando a composição das soluções de deposição e as condições eletroquímicas.
- As experiências são simples de realizar e os instrumentos são baratos quando comparados com outras técnicas de produção de nanoestruturas.

A deposição eletroquímica de metais é o caso mais simples e mais estudado. Quando os íons se difundem para o fundo dos poros das membranas, os elétrons são fornecidos a partir de uma corrente aplicada e o metal é reduzido à sua forma metálica. Isto é demonstrada pela seguinte reação em que "M" representa um metal e "n" a valência.



Com base na Lei de *Faraday*: a carga total utilizada pode ser calculada através da integral da corrente (I) sobre o tempo usado na deposição eletroquímica, e o número de mols de material depositado pode ser calculado como:

$$M = \frac{1}{nF} \int I dt \quad (1)$$

A primeira vez que se utilizou uma membrana para produção de nanoestruturas foi em 1970 por Possin (1970). Ele preparou nanofios de zinco, estanho e índio em pequenos poros na superfície de mica e estudaram as propriedades supercondutoras do material. O método de produção de nanofios utilizando membranas com tamanho definido, foi popularizado por Gelves *et al.* (2005), (HIDALGO, ENDEZ, PIQUERAS, 2006, p. 2521). Hoje em dia, já existe na literatura, uma grande variedade de metais que foram utilizados para esta finalidade como: ouro, prata, cobre, níquel, platina, paládio, ferro, zinco e bismuto. O diâmetro dos nanofios é controlado pelo diâmetro da membrana, logo o pesquisador antes de iniciar os experimentos já define o diâmetro do nanofios, sendo que seu tamanho é apresentado pelo controle de carga depositada (lei de Faraday). Também é possível depositar compostos orgânicos, como polímeros. A diferença entre a deposição de metais e polímeros, é que para a deposição de metais se utiliza um potencial negativo, já para a deposição de polímeros utiliza-se potencial positivo. Quando um potencial positivo é aplicado em uma solução orgânica contendo um monômero ou misturas deles, ocorrem à polimerização nas paredes da membrana. Martin e colaboradores foram os pioneiros no desenvolvimento de novas metodologias para a deposição de polímeros como: polianilina (CHI, WANG, XUE, 2010, p. 4883), polipirrol (POSSION, 1970, p. 772), politiofeno (MENON, MARTIN, 1995, p.1920) em formas de nanofios. Wang e colaboradores têm pesquisado alguns sistemas para produção de nanofios. Recentemente publicaram um artigo no qual relataram a fabricação de nanofios

por deposição de multissegmentos de metais utilizando índio, chumbo e bismuto (SAPP, MITCHELL, MARTIN, 1999, p. 1183), conseguindo desenvolver uma nova metodologia que se apresentou de fácil aplicabilidade, com boa reprodutibilidade e boa condutividade eletrônica, podendo ser aplicada na construção de baterias e materiais ópticos. Já em outro estudo Joyce *et al.* (2007), relataram o desenvolvimento dos nanofios controlando o efeito magnético e o ângulo de orientação do nanofio, proporcionando assim um melhor efeito catalítico, quando utilizado para determinação direta de glicose e metanol.

Também tem sido bastante estudada, a síntese de nanoestruturas heterogêneas, tais como: nanofios de compostos, nanofios segmentados, e nanofios coaxiais. (Figura 2). Estes nanofios híbridos como ligas metálicas podem ser co-eletrodepositados em uma única solução de eletrólito. Recentemente Cai *et al.* (2010), publicaram a produção de nanofios híbridos formados de espinélio estanato de zinco (Zn_2SnO_4) e nanopartículas de prata, obtidos por óxido de prata (Ag_2O). Estes nanofios $\text{Ag}_2\text{O}/\text{Zn}_2\text{SnO}_4$ híbridos se mostraram sensíveis à presença de etanol. Eles sugeriram um mecanismo reversível para detecção de etanol/oxigênio ativado pelas configurações dos nanofios híbridos, o que pode fornecer um novo caminho para a concepção de dispositivos modernos para a detecção de gás inteligente, compatíveis com a detecção de transiente. Já Zhang *et al.* (2012), descreveram a produção de um electrocatalisador, composto por nanofios de cobre e nanotubos de carbono para monitoramento de glicose em meio alcalino. O material híbrido produzido foi utilizado para o monitoramento de glicose e apresentou uma ampla faixa dinâmica de concentração com um limite de detecção de 89 nmol L^{-1} e com boa seletividade contra espécies comumente interferentes. Estes resultados indicaram que o nanobiossensor desenvolvido se candidata como um material promissor em várias aplicações que vão desde a energia (célula combustível de glicose) como para sensores (monitoramento de processos industriais de glicose). Em outro artigo, Aguilar *et al.* (2010) reportam a construção de nanossensor híbrido

para detecção de eletroquímica de trinitrotolueno. O sensor se mostrou capaz de detectar nível de TNT em 6 partes por trilhão na presença de vários interferentes dentro do espaço de tempo de 1-2 minutos.

Também existem os nanofios metálicos segmentados fabricados por eletrodeposição subsequente de diferentes soluções em um único experimento (HURST *et al.* 2006, p. 2672). Nanofios multissegmentados que contêm heterojunções entre o metal e semicondutor (PENA *et al.* 2002, p. 7458) ou polímeros condutores (HERNANDEZ *et al.* 2004, p. 3431) também já foram reportados, e suas propriedades estudadas (Figura 2). Nanofios coaxiais podem ser sintetizados através de rotas que inclui fabricar nanofios funcionalizados e posterior preenchimento dos nanotubos com outros materiais no interior do nanofio. Por exemplo, Mallouk *et al.* (2002) prepararam nanofios coaxiais de seleneto de cádmio (CdSe) revestido com polímeros. Os comprimentos dos segmentos individuais dos nanofios foram controlados pela variação da quantidade de carga depositada. A composição dos segmentos CdSe foi caracterizado por espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX). Os nanofios sintetizados demonstraram propriedades de fotocondutância, o que pode levar a produção de diversos materiais eletrônicos.

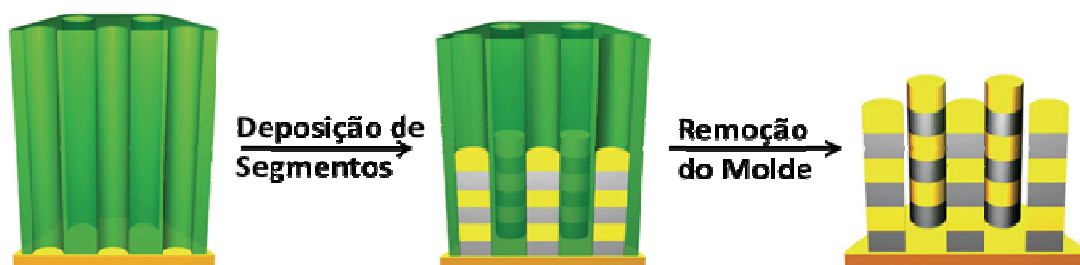


Figura 2. Fabricação de nanofios multissegmentados utilizando membranas AAO.

O modelo de nanomateriais sintetizados a partir de moldes é considerado útil em muitas aplicações. Exemplos bem conhecidos incluem as aplicações da eletroanalítica (SILVESTRINI, FRUK, UGO, 2013, p. 265), bioanalíticos (MAZEIKOA *et al.* 2013, p. 187-193), biosseparação (ZHANG *et al.* 2013, 2265), óptica - cristais fotônicos (MADANI, ENTEZAR, 2013, p. 1-5), magnético (SUN, KOSEL, 2013, p. 547), biomédico - drugs delivery (LI, MARK, KRICKA, 2009, p. 182) e de conversão de energia eletroquímica - células a combustível, (KANG *et al.* 2006, p. A554) e armazenamento - supercapacitores, (LIU, LEE, 2008, p. 2942).

Após a produção dos nanofios é possível modificá-los quimicamente para que estes se acoplem a um composto biológico. Já existem algumas metodologias para tais fins, como por exemplo: nanofios com segmentos de ouro modificados com alcanos tióis (PEDROSA *et al.* 2007, p. 1415), segmentos de platina modificados com isocianetos (COCO *et al.* 2008, p. 3544) e segmento de níquel com histidina (KAMOTO *et al.* 2008, p. 8004). Após tais modificações os nanofios podem ser conectados a compostos biológicos na presença de alguns grupos funcionais. Dentre os diferentes grupos já estudados, podem ser citadas as classes de compostos: carboxílicos e amina, que podem ser usados para formação de ligação cross-linking com grupos funcionais presentes em moléculas biológicas. Cada interação entre os nanofios e as biomoléculas leva a formação de um novo sistema híbrido, que agrega diferentes propriedades biológicas (reconhecimento molecular e/ou biocatalítico) com as atrativas propriedades eletrônicas e estruturais características dos nanofios. Estudos recentes mostram que biossensores formados com nanofios conseguem detectar concentrações diminutas de biomoléculas - algo como 1.000 moléculas dissolvidas em um milímetro cúbico de solução (LIU *et al.* 2008, p. 441). Isto é feito sem a utilização de qualquer reagente ou agente fluorescente ou mesmo marcadores radioativos. Estes novos biossensores funcionam mais ou menos como se conseguíssemos ligar diretamente um circuito eletrônico a um

sistema biológico (enzimas, DNA, RNA, aptâmeros e células). A utilização de nanofios para formação de biossensores oferecem vantagens específicas, como controle da concentração e tipo de dopagem resultando na melhoria da reprodutibilidade, em função de uma melhor distribuição da enzima imobilizada na superfície do eletrodo e alta condutividade que facilita o processo de transferência eletrônica (MURPHY, 2007, p. 259). Por isso, esse material tem sido destacado como um forte candidato para aplicações nas áreas da nanomedicina e da nanobioeletrônica.

Estudos atuais mostram que os nanofios promovem um excelente micro ambiente para a atividade biocatalítica das enzimas, o que provoca uma melhoria na transferência eletrônica causada por fatores como: menor barreira eletrônica, alta condutância, resultando numa melhor sensibilidade. Zhu *et al.* (2006) desenvolveram um biossensor para detecção de DNA por hibridização utilizando a polianilina com nanofios. Os nanofios poliméricos foram depositados sobre o eletrodo de carbono vítreo e apresentou um excelente limite de detecção, da ordem de $1,0 \times 10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$. Cui *et al.* (2001) utilizaram nanofios para fixação de um receptor biológico (biotina) para a detecção de streptavidina e observaram que após a fixação da biotina não houve diminuição da condutividade do eletrodo. Logo o sensor se mostrou estável para o sistema streptavidina/biotina demonstrando que é possível um sensor sensível para este sistema com limite de detecção na ordem de pico molar. Fan *et al.* (2007) desenvolveram um biossensor por meio da hibridização de RNA utilizando nanofios contendo polianilina, um polímero condutor. Por meio de interações eletrostáticas entre o ânion do RNA e cátion da anilina, puderam observar a formação dos nanofios poliméricos hibridizados com RNA. Após aperfeiçoarem as condições experimentais, utilizaram o biossensor para detecção em células cancerígenas. Lu *et al.* (2007) desenvolveram um sensor para detecção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) usando nanofios preparados com platina. Os resultados apresentaram um efeito catalítico para a redução do H_2O_2 . Após esta etapa, foi imobilizada

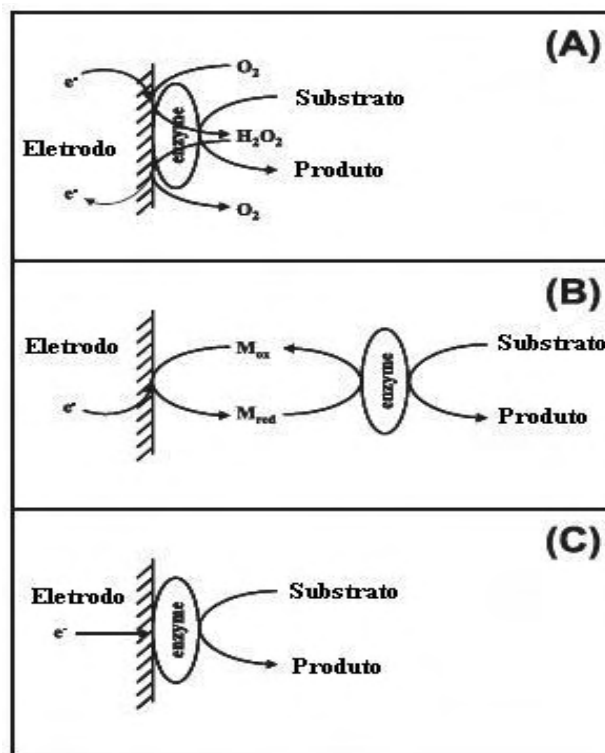
glicose oxidase (GOx) na superfície do eletrodo, utilizando-se glutaraldeído como agente modificador. A detecção de glicose foi feita em potencial de -0,2 V vs Ag/AgCl. O biossensor mostrou-se de fácil manipulação, com alta sensibilidade e com uma rápida resposta de análise. Já Willner *et al.* (2007) reportaram a detecção de álcool utilizando um biossensor construído a partir de nanotubos/nanofios de carbono. Usaram técnicas como Microscopia de Força Atômica (AFM), Ultravioleta e Raman para a caracterização da formação dos nanocompostos. Este biossensor apresentou uma excelente atividade eletrocatalisadora para a oxidação de etanol, com boa estabilidade e reprodutibilidade.

Outra vantagem de se trabalhar com nanofios é poder formar segmentos com propriedades magnéticas. Logo, estes biossensores, além de ter as vantagens acima citadas, passarão também a contar com os benefícios dos campos magnéticos. Estudos recentes têm mostrado que a força magnética melhora sensivelmente a resposta dos biossensores, o que promove um maior efeito bioeletrocatalítico. Laoiza *et al.* (2007) reportaram a aplicação do controle magnético na resposta de um biossensor e demonstraram que a atividade eletrocatalítica dos nanofios pode ser controlada pelos diferentes ângulos direcionados no campo magnético. Este comportamento é atribuído ao bloqueio do processo eletroquímico pela simples orientação dos nanofios na superfície do eletrodo. Este protocolo mostrou-se de fácil aplicabilidade além de poder ser utilizado em outros sistemas. Wang e colaboradores também demonstraram que o efeito magnético pode influenciar na resposta biocatalítica dos biossensores (LAOCHAROENSUK *et al.* 2007, p. 7774). O controle do ângulo dos nanofios proporcionou um melhor efeito catalítico, quando utilizado para determinação direta de glicose e metanol. Por isso, o método de construção de biossensores utilizando nanofios com segmentos magnéticos pode ser muito promissor, permitindo orientar as enzimas sobre a superfície do eletrodo sem desnaturação, além, de controlar a transferência eletrônica direta destas para a superfície dos eletrodos.

Ainda há muito que pode ser estudado na área de biossensores utilizando nanofios, levando em consideração as novas descobertas. Por isso a cada ano há um maior interesse sobre a utilização desses materiais. Os resultados preliminares demonstram que: 1) nanofios podem ser acoplados com enzimas para se estudar as mudanças provocadas por um determinado substrato; 2) enzimas imobilizadas em nanofios, ainda conservam suas funções biocatalíticas e 3) as propriedades magnéticas podem favorecer ou desfavorecer (bloqueando a superfície eletródica) uma determinada reação.

1.2.Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzima, anticorpos, organismo, tecido animal e vegetal, células, etc.) conectado a um transdutor o qual converte o sinal biológico em sinal elétrico (FATIBELLO FILHO & CAPELATO 1992, p. 28). Imobiliza-se o material biológico em uma membrana adequada, acoplada junto à superfície do transdutor, e este monitora o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material com o seu respectivo substrato de interesse (por exemplo, a utilização de glicose oxidase para detecção de peróxido de hidrogênio). Este acoplamento eletrônico entre a enzima e o eletrodo para construção de biossensores é baseado na eletroatividade do substrato da enzima ou no produto gerado da reação enzimática, esquema da Figura 3A (biossensor de primeira geração). A eletroatividade também pode ser medida por meio de mediador presente, esquema 3B (biossensor de segunda geração) e por último por transferência direta de elétrons entre a espécie ativa e a enzima, esquema 3C (biossensor de terceira geração). Neste trabalho foram utilizados mediadores que atuam na transferência de carga entre o grupo prostético da enzima e a superfície do eletrodo para determinar a eletroatividade do substrato da enzima (biossensor de segunda geração).



Adaptado de FREIRE *et al.* (2003)

Figura 3. Representação dos diferentes funcionamentos de um biossensor. (A) Primeira geração, (B) segunda geração e (C) terceira geração.

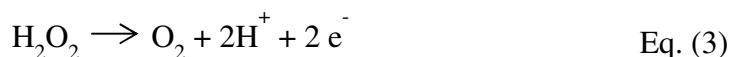
Eletrodos enzimáticos amperométricos, com base em GOx vêm liderando os testes simples e fácil de glicose no sangue, pois desempenham um papel importante no contínuo monitoramento da glicose. Como há necessidade de usar com frequência os biossensores, o eletrodo enzimático pode causar a perda de sensibilidade da superfície do eletrodo, assim, às enzimas oxidoredutases são as mais adequadas para estes biossensores, desde que a transferência de elétrons esteja envolvida no processo de transdução.

O primeiro dispositivo utilizando eletrodos de enzima para detecção da glicose foi desenvolvido por Clark e Lyons do Hospital Infantil de Cincinnati, em 1962 e, baseou-se numa fina camada de Glicose Oxidase (GOx) retida sobre um eletrodo de oxigênio (através de uma membrana semipermeável de diálise), a GOx oxida a glicose em ácido glucônico e as enzimas utilizam o oxigênio molecular como receptor de elétrons, liberando peróxido de

hidrogênio pela reação com o analito, uma vez que o consumo de oxigênio é proporcional à concentração de glicose, determinado pela seguinte reação:



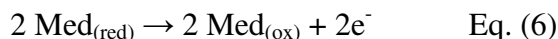
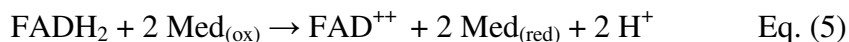
Biossensores eletroquímicos para análise de glicose, baseado na monitoração amperométrica (anódica) da liberação do peróxido de hidrogênio (Equação 3), foi lançado comercialmente em 1975, pela Yellow Springs Company (Ohio), onde foi utilizado amostras de sangue com total de 25 µL (NEWMAN & TURNER, 2005, p. 2435).



Dentre os principais grupos de sensores amperométricos para a determinação da glicose, os dispositivos da primeira geração têm contado com o uso de um substrato natural, o oxigênio e a produção e detecção de peróxido de hidrogênio (Equação 2 e 3). As medições da formação de peróxido têm a vantagem de ser mais simples e especialmente quando realizados em sensores miniaturizados.

O biossensor de segunda geração se baseia no uso de mediadores ou de cofatores que atuam na transferência de carga entre o grupo prostético da enzima e a superfície do eletrodo (HENDRY *et al.* 1993, p. 453). Com isso, busca-se melhorar os parâmetros analíticos visando um aumento na eficiência do biossensor. Tais mediadores eletrônicos, podem ser materiais orgânicos, inorgânicos, polímeros condutores ou complexos de metais de transição, os quais surgiram na tentativa de diminuir o alto potencial proporcionado pelos de primeira geração. Os mediadores são geralmente moléculas de baixo peso molecular, as quais podem reagir com o centro ativo da enzima ou com um produto da reação enzimática e as formas oxidada ou reduzida do mediador sofrem rápidas reações eletroquímicas redox, a

potenciais mais baixos que aqueles dependentes da concentração de O₂. Nestes biossensores, têm-se as seguintes reações:



onde, Med_(ox) e Med_(red) são as formas oxidadas e reduzidas, respectivamente, dos mediadores e a Eq. 6 ocorre entre o mediador e o eletrodo. Assim, a presença de mediadores pode facilitar a transferência de elétrons proveniente de reação redox paralela à reação entre a enzima e o substrato, causando interferências durante a detecção. Na oxidação de glicose um grupo prostético (Flavin Adenin Dinucleotide - FAD) é utilizado para transferir os elétrons do substrato. Após a oxidação do substrato, FADH₂ retorna ao FAD na presença de oxigênio. O receptor de elétrons (mediador - Med_(ox)) é reduzido para Med_(red) pelo cofator e depois oxidado para Med_(ox) quando em contato com o ânodo, que é polarizado num potencial adequado. Na forma reduzida o mediador é insolúvel em meio aquoso e, então, pode ser adsorvido na superfície do eletrodo; quando oxida, sob operação, torna-se mais solúvel o que possibilita o seu movimento, por difusão, do eletrodo até o sítio ativo da enzima, reagindo com a forma reduzida da mesma.

A utilização de mediadores na fabricação de biossensores de glicose se tornou uma das técnicas mais indicadas, pois possibilita menor custo na produção dos biossensores e o sinal mostra-se independente da concentração de oxigênio. Possibilitando também, o uso de outras enzimas oxiredutases para biossensoriamento, incluindo peroxidases e desidrogenases, as quais não se utilizam do O₂ como substrato para troca eletrônica.

Os biossensores de terceira geração são caracterizados pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo sem o uso de mediadores, onde a enzima pode passar diretamente de reduzida para oxidada, sob baixos potenciais, fazendo do componente bioativo uma parte integrante do transdutor. Isso é possível pela imobilização da enzima em polímeros oxiredutores ou, enzima e mediador, imobilizados num polímero condutor. Esta classe de biossensores é a mais atrativa pela possibilidade de se obter um dispositivo simplificado, miniaturizado e, ainda, com uma boa sensibilidade e seletividade, já que operam em potenciais mais próximos ao da enzima, diminuindo assim, efeitos de interferentes (ALBERY *et al.* 1985, p. 223), (ZHANG & LI, 2004, p. 603).

As características e sensibilidade dos biossensores podem ser melhoradas utilizando os nanomateriais em sua construção. Os materiais nanoestruturados, tais como nanopartículas metálicas e magnéticas, têm atraído interesse especial devido à sua facilidade de síntese e funcionamento, estabilidade química, propriedades elétricas, ópticas, excelente condutividade e propriedades catalíticas, que dependem da sua composição, os tornando adequados para agir como "fios eletrônicos" para melhorar a transferência de elétrons entre o elemento biológico e a superfície do eletrodo e, podem ser usadas para aumentar a quantidade de biomoléculas imobilizadas na construção de um sensor (AGASTI *et al.* 2010, p. 316), (HERNANDEZ *et al.* 2002, p. 1225). Tais materiais além de tudo possuem uma boa compatibilidade, como nanopartículas de ouro (PINGARRON *et al.* 2008, p. 5848), nanotubos de carbono (YOU & JEAN, 2011, p. 2103), (ZHANG *et al.* 2011, p. 23), nanofios (MARIN *et al.* 2013, p. 293), nanocristais, nanocápsulas, etc.

Por serem dispositivos simples e de baixo custo, a utilização de sensores na biodeteção (qualitativa e quantitativa), possui como principal vantagem a sensibilidade que os tornam capazes de realizar testes com sinal de resposta proporcionalmente rápido (TELES,

2011, p. 28). Trabalhos recentes publicados na literatura utilizando biossensores desenvolvidos em cima de monocamadas vêm apresentando resultados muito satisfatórios para determinação de diversos compostos em diferentes matrizes. Bertok e colaboradores desenvolveram um biossensor eletroquímico bastante sensível com base no reconhecimento de biolectina capaz de detectar concentrações de até 1 mol L^{-1} de glicoproteínas. Este dispositivo possui um alto potencial para ser utilizado em diagnósticos precoces de doenças biomédicas como artrite ou câncer, que estão ligados pela glicosilação de proteínas biomarcadoras em fluidos biológicos (BERTOK *et al.* 2013, p. 12). Outro estudo muito interessante no desenvolvimento de biossensor foi o de Wu *et al.* (2013), onde desenvolveram um sensor usando nanofios de silício modificados com plasma de N_2O para a detecção de interleucina-1b. Sintetizaram nanofios com efeito de campo transistor de silício, capaz de detectar fragmentos de câncer pela hibridização e imobilização de DNA relacionados com o gene da interleucina-1b, que se caracteriza como um indicador de câncer nas regiões da mama, cólon, pulmão, faringe, cabeça e pescoço. Para fabricar o sensor utilizaram a técnica de circuito integrado (IC). Os nanofios produzidos foram submetidos a um tratamento de modificação com vários parâmetros, a fim de aumentar a sensibilidade do sensor, o que resultou numa boa capacidade de detecção e monitoramento da interleucina-1b em tempo real para avaliá-la durante o tratamento do câncer.

Wang (2010) ressalta a importância do uso de dispositivos digitais com aplicações de biossensoriamento analítico, baseando-se no processamento de sinais bioquímicos, onde é possível o acoplamento direto do processamento de sinal com atuadores químicos, produzindo sistemas integrados inteligentes, o que não é possível em dispositivos de biossensoriamento comuns, que têm por base um único analito. Os dispositivos baseados em sistemas bioquímicos requerem uma abordagem inovadora para o desenvolvimento de biossensor, ressaltando a importância dos transdutores eletrônicos e dos sistemas bioeletrônicos. Em

biossensores enzimáticos convencionais, sua eficiência depende, em partes, da camada dos reagentes imobilizados na superfície de transdução, proporcionando um contato que combinam os elementos de forma apropriada. Assim, o desempenho na obtenção de bons sinais em um dispositivo depende da composição, preparação e métodos de imobilização da camada superficial do sensor (WANG, KATZ, 2010, p. 1591).

Estudos recentes mostram que os nanofios promovem um excelente micro ambiente para a atividade biocatalítica das enzimas, o que provoca uma melhoria na transferência eletrônica causada por fatores como: menor barreira eletrônica, alta condutância, resultando numa melhor sensibilidade. Dentre as diversidades de detecção e tratamento nas doenças auxiliadas pelos nanodispositivos, destaca-se o controle dos níveis de glicose no sangue.

Durante a fabricação de um biossensor de glicose, deve-se levar em conta a imobilização da enzima no substrato por ser um processo crítico, pois o desempenho pode ser afetado pela transferência eletrônica e pela força de ligação entre a enzima e o eletrodo. Jung, Lim, (2013), desenvolveram biossensores de glicose baseados em nanofios de ZnO onde foi feita a imobilização de glicose oxidase (GOx), utilizando-se diferentes agentes de acoplamento, como (3-aminopropil) trimetoxissilano (APTMS), (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES), e (3-aminopropil) metildietoxissilano (APS) utilizados para aumentar a afinidade de ligação dos nanofios de ZnO com a GOx. O desempenho, sensibilidade e a resistência de transferência de elétrons de cada biossensor foram medidos, mostrando que o biossensor com APS obteve a melhor sensibilidade e a menor resistência de transferência de elétrons, resultando no biossensor de glicose com melhor desempenho dentre os estudados.

Ao longo dos últimos anos houve um enorme progresso em relação ao desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção de glicose. Porém a procura por metodologias inovadoras para construção de biossensores ainda é grande. Atualmente os biossensores para detecção de glicose representam quase 85% do mercado mundial. O sucesso

dos medidores de glicose no sangue tem estimulado o interesse por dispositivos de monitorização *in-vitro* e *in-vivo* com outros compostos fisiologicamente importantes. Apesar do enorme progresso em biossensores de glicose, há ainda muitos desafios relacionados com a realização do monitoramento *in-vitro* com resultados confiáveis. Assim, o desenvolvimento de novos biossensores de glicose permanece como o foco principal de muitos pesquisadores, pois a realidade deste mercado a fim de se obter testes de diagnósticos mais simples, rápidos e com menor custo ainda é grande, especialmente para diagnóstico *in-vitro*.

Por isso, ainda há muito que pode ser estudado na área de biossensores utilizando nanofios como suporte. Nessa dissertação iremos discutir que: 1) nanofios podem ser acoplados com enzimas para se estudar as mudanças provocadas por um determinado substrato; 2) após a imobilização da enzima nos nanofios, a mesma conserva suas funções biocatalíticas e 3) as propriedades magnéticas podem favorecer ou desfavorecer (bloqueando a superfície eletródica) uma determinada reação.

2- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para a fabricação de um biossensor baseada em nanofios. Esta metodologia foi fundamentada na construção de nanofios multissegmentados (metálico e polimérico), que foram modificados para receberem o acoplamento da enzima glicose oxidase de *Aspergillus Niger* (GOx) – Tipo X-S (EE 1.1.3.4., número CAS: 9001-37-0). Os nanofios foram produzidos utilizando a técnica de eletrodeposição. Após esta etapa, a enzima foi imobilizada no nanofio, e posteriormente foi levantada uma metodologia de trabalho para se medir a resposta biocatalítica do sensor na presença de seu respectivo substrato, a glicose.

Objetivos específicos:

- Preparação e caracterização de nanofios com diferentes segmentos preparados com metais (ouro, prata, níquel) e polímero (pirrol). Nesta etapa foram testados diferentes formas e tamanhos dos nanofios, objetivando a construção dos mesmos com multifuncionalidades.
- Modificação dos nanofios para a fixação da GOx. Estes biossensores foram testados na presença de seus respectivos substratos para a obtenção de uma resposta eletroquímica específica.
- Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de glicose, com a utilização de técnicas cronoamperométricas, na ausência e presença de interferentes.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados nos experimentos são originados da Sigma-Aldrich e possuem pureza analítica (PA), como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 1. Especificação dos reagentes utilizados.

Materiais	Composição %
Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado - ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	98,0
Cloreto de Cobre (II) - (CuCl_2)	99,0
Cloreto de Ouro (III) - (AuCl_3)	99,0
Cloreto de Níquel (II) Hexahidratado - ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	98,0
Sulfamato de Níquel (II) Tetrahidratado - ($\text{Ni}(\text{SO}_3\text{NH}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	98,0
Ácido Bórico - (H_3BO_3)	99,5
Ácido Nítrico - (HNO_3)	70,0
Ácido Clorídrico - (HCl)	37,0
Ácido Sulfúrico - (H_2SO_4)	99,0
Ácido Ascórbico - ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)	98,0
Ácido Fosfórico - (H_3PO_4)	85,0
Ácido Mercaptoundecanóico - ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$)	99,0
Fosfato de Sódio Monohidrogenado - (Na_2HPO_4)	98,0
Pirrol - ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$)	98,0
Hidróxido de Sódio - (NaOH)	98,0
Tween - ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)	97,0
Nitrato de Prata - (AgNO_3)	99,0
Borohidreto de Sódio - (NaBH_4)	98,0
Tetrabutilamônio Hexafluorofosfato - ($\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{F}_6\text{NP}$)	98,0
Acetonitrila - ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)	99,0
Ferrocenomonocarboxílico - (FMCA)	97,0
Brometo de Cetil-trimetilamônio - (CTAB)	98,0
Cloreto de Ouro (III) - (AuCl_3)	99,9
Nanotubo de Carbono - (CNT)	90,0
Glicose Oxidase de <i>Aspergillus Niger</i> - (GOx)	100.000 – 250.00 unidades/g sólida
D-(+)- Glicose - ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	99,5

O tampão fosfato (PBS) foi preparado com H_3PO_4 e Na_2HPO_4 na concentração de 10 mmol L^{-1} . O pH desta solução tampão foi ajustado quando necessário para utilização em diferentes valores de pH.

Todo material utilizado (balões volumétricos, espátulas, béqueres, etc), passou por um procedimento de limpeza adotado com o intuito de assegurar a ausência de quaisquer resíduos orgânicos que pudessem interferir nas medidas. Para isto, foi utilizada uma solução sulfonítrica [$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$ 1:1 (v/v)] e posteriormente lavados com água destilada. Foram utilizadas pipetas automáticas de 50, 100 e 1000 μL (da marca Capp) e 5 e 10 mL (Capp), todas com ponteiros volumétricos descartáveis de polietileno.

3.2. Instrumentação

As medidas de eletroquímica foram feitas usando um $\mu\text{Autolab}$ modelo Tipo III/FRA2 (Eco Chemie BV). Os experimentos foram realizados em solução aquosa de ferroceno monocarboxílico (FMCA) 0,5 mmol L^{-1} com PBS 10 mmol L^{-1} . Cronoamperometria foi utilizada para caracterizar a resposta do biossensor para a determinação de glicose. Alíquotas de glicose de concentração conhecida foram adicionadas na célula eletroquímica após a estabilização da corrente de fundo.

Para as análises da superfície dos nanofios foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI Company), acoplado com um Detector de Energia Dispersiva de raios-X (EDX). Esse equipamento integra o parque de equipamentos do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu.

3.2.1. Eletrodos

Como eletrodo de trabalho (W), foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo impresso (3 mm). O eletrodo de referência (R) utilizado nos experimentos constitui-se de um fio de prata imerso em uma solução saturada de cloreto de prata (AgCl) e cloreto de potássio (KCl) a $3,0 \text{ mol L}^{-1}$ em meio aquoso, cujo o valor de potencial é de 0,222 V, em relação ao eletrodo normal de hidrogênio. Como eletrodo auxiliar ou contra eletrodo (C), utilizou-se uma placa de platina com área geométrica de $0,4 \text{ cm}^2$.

3.2.2. Célula Eletrolítica

Para os estudos eletroanalíticos, utilizou-se uma célula de vidro Pyrex[®] de compartimento único, com capacidade de 10 mL, equipada com uma tampa em Teflon[®], contendo orifícios, para desoxigenação da solução com nitrogênio, e para posicionamento dos eletrodos, sendo um de referência (Ag/AgCl) (R), um de trabalho (W) e um contra eletrodo (C).

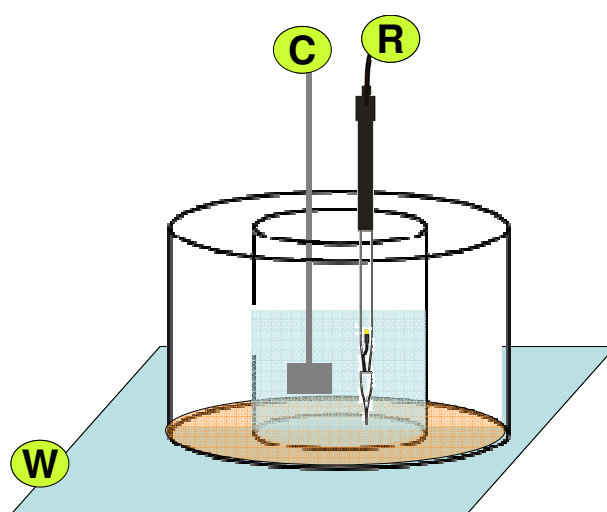


Figura 4. Célula Eletrolítica de vidro Pyrex[®]

3.2.3. Ajustes de pH

Todas as soluções tiveram seus valores de pH ajustados por um Titroprocessor 682 da Metrohm e um eletrodo combinado de vidro da Digimed – Instrumentação analítica. O Titroprocessor foi calibrado diariamente com tampões comerciais de pH 4 e 7, também da Metrohm.

3.3. Metodologia

3.3.1. Preparação de Nanofios Multissegmentados

Foram utilizados membranas de alumina porosa (AAO) - Whatman (Maidstone, Reino Unido), com 200 nm de diâmetro e 60 μ m de tamanho, como base para a construção dos nanofios. A primeira etapa consistiu na limpeza da membrana, onde a mesma foi lavada com água destilada a vácuo, para remoção de impurezas e garantir a desobstrução dos poros. Todo o procedimento da síntese dos nanofios pode ser observado na Fig. 6.

Os nanofios foram sintetizados pela eletrodeposição de diversos metais (níquel, ouro, prata, cobre) e a solução polimérica de pirrol (PPY) nos poros da membrana, utilizando-se soluções próprias para cada segmento e potencial apropriado, onde foram testadas diversas sequências de metais e polímero a serem eletrodepositados. Foi utilizado o potenciostato μ Autolab, e a técnica de cronoamperometria para fixação do potencial, controlando-se o tamanho dos nanofios pela passagem de carga, ver Figura 5 A-G.

Primeiramente foi criado um contato elétrico pela técnica de “sputter”, Fig. 5B, onde uma das superfícies da membrana foi coberta por ouro e a mesma foi colocada em uma cela

de Teflon[®] com vedação. Na produção de todos os nanofios foi primeiro eletrodepositado uma fina camada de cobre (metal de sacrifício) utilizando uma solução de 1 mol L^{-1} de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Aplicando o potencial de $-1,0 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ e uma quantidade de 7 Coulombs (C) para a deposição do metal (Fig. 5C), que ao final da deposição foi dissolvido com seu respectivo reagente oxidante.

- O ouro foi depositado pela aplicação de potencial de $-0,9 \text{ V}$ usando uma solução de $1,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ AuCl}_3$ (Fig. 5D).
- O segmento de níquel foi eletrodepositado a $-1,0 \text{ V}$ a partir de uma solução contendo $20 \text{ g L}^{-1} \text{ NiCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$, $515 \text{ g L}^{-1} \text{ Ni (H}_2\text{NSO}_3)_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ e $20 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$ (tamponado a pH 3,4), (Fig. 5E).
- A solução de eletropolimerização de pirrol consistiu em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de pirrol + tetrabutilamônia ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) foi diluída em 20 mL de acetonitrila. A eletropolimerização foi efetuada com potencial de $0,8 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, até a quantidade de carga desejada (Fig. 5F).

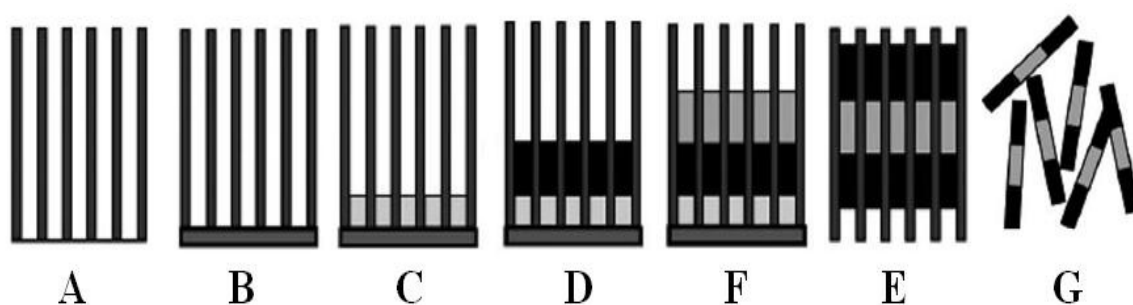


Figura 5. Esquema da produção dos nanofios pela técnica de eletrodeposição utilizando membrana de alumina porosa. (A) Ilustração da membrana, (B) contato elétrico com ouro feito pela técnica de “Sputter”, (C) metal de sacrifício – cobre depositado a um potencial de -1 V vs Ag/AgCl e uma carga de 7C, (D) deposição de ouro $E^\circ -0,9 \text{ V vs Ag/AgCl}$, (E) deposição de níquel a um $E^\circ -1,0 \text{ V vs Ag/AgCl}$, (F) deposição de pirrol a $E^\circ 0,8 \text{ V vs Ag/AgC}$ e, eliminação do contato elétrico e do metal de sacrifício e (G) dissolução da membrana para liberação dos nanofios.

Os nanofios na forma de cone foram preparados pela mistura das soluções de ouro e prata sob diferentes proporções: 9/1, 8,5/1,5, 8/2, 7,5/2,5, e 7/3. Após a preparação dos nanofios, os mesmos foram colocados em uma solução de ácido nítrico 35% durante 15 min. Este tratamento dissolveu a prata que tinha sido depositada continuamente com o ouro, o que levou a formação de nanocones.

Após o fim da eletrodeposição dos metais e polímero, a membrana foi polida mecanicamente com uma haste de algodão a fim de remover o contato elétrico feito com o ouro, em seguida, a membrana foi imersa numa solução de cloreto de cobre (para remover o cobre, como superfície de sacrifício) 0,5 mol L⁻¹ em solução de 30% de HCl. Lavou-se a membrana de AAO com água destilada após esta etapa e colocou-se a mesma em um béquer com solução de hidróxido de sódio 3,0 mol L⁻¹ por 30 min para completa dissolução das paredes da membrana, Figura 5G. Os resultantes foram lavados repetidamente com água deionizada para remover os resíduos de sais da base e usando uma centrifugação de 5 min, até se obter a suspensão de nanofios em pH neutro, a qual foi armazenada em temperatura ambiente.

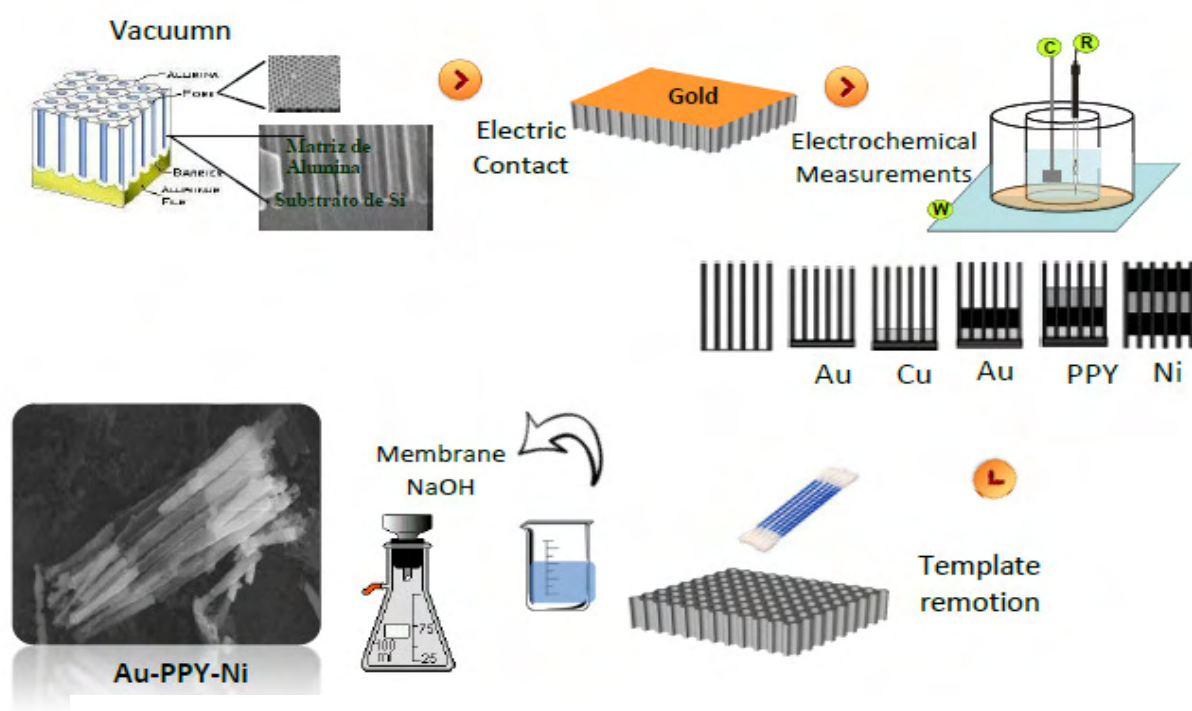


Figura 6. Esquema geral da metodologia da síntese dos Nanofios multissegmentados.

3.3.2. Preparação dos *Nanorods* de Ouro

Primeiro foram preparados soluções de Borohidreto de Sódio (NaBH_4) a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$, Brometo de Cetil-trimetilamônio (CTAB) a $78,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e Cloreto de Ouro (HAuCl_4) a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Depois se adicionou 5 ml de CTAB e 5 mL de HAuCl_4 . Após notar-se a mudança de cor da solução para marrom adicionou-se $600 \mu\text{L}$ NaBH_4 . Para preparar os nanorod, utilizou-se $12 \mu\text{L}$ dessa solução, a qual foi mantida em temperatura controlada entre $27\text{-}30^\circ \text{C}$, por 4 horas, e até a obtenção da mudança de cor da solução. Após isso, colocou-se a solução em um eppendorf de 2 mL e $700 \mu\text{L}$ de ácido ascórbico a $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e manteve-se sob agitação por 20 min, a 4000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e adicionou-se $500 \mu\text{L}$ de água, mantendo sob agitação por mais 20 min, e ao final retirou-se o sobrenadante e se recolheu os nanorods.

3.3.3. Pré - Tratamento de Nanotubos de Carbono (CNT)

Para realizar o tratamento dos nanotubos de carbono, pesou-se 1,0 g de CNT e adicionou-se 100 mL de HNO_3 concentrado. A solução foi colocada em um ultrassom à temperatura de 60°C por 90 min, deixando a solução descansar por mais 24 horas sobre o controle da temperatura de 60°C . Adicionou-se 3500 mL de água destilada e deixou-se a solução descansar por mais 24 horas. Decantou-se a solução e o que sobrou foi levado para a centrífuga por 30 min a velocidade de 3000 rpm. Esse procedimento foi repetido até atingir o pH entre 5-7. Após essa etapa deixou-se a solução restante por mais 24 horas em uma estufa a 60°C para completa secagem da solução. Tais CNT foram utilizados para produzir nanofios híbridos modificados.

3.4. Desenvolvimento do Biossensor baseado em Nanofios

Após os nanofios de Au-Ni-PPY-Ni (Fig. 9-D), serem sintetizados pelo método já descrito, foram modificados por imersão em uma solução etanólica $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ contendo uma solução de ácido 3-mercaptopundecanóico (3-MPA), durante 2 horas para a funcionalização dos nanofios com o grupo carboxílico. Os nanofios foram imersos em 5 mL de solução tampão fosfato ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) contendo uma solução de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida (EDC) $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e *N*- Hidroxissuccinimida (NHS) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ durante cerca de 2 h, sob agitação contínua, onde reagiram com o grupo carboxílico para possibilitar a imobilização da proteína no nanofio. Em seguida, adicionou-se 100 mL de GOx de *Aspergillus niger* ($10,0 \text{ mg mL}^{-1}$ em PBS $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 5,5) e agitou-se durante a noite. Assim, a GOx foi imobilizada na superfície dos nanofios por ligações covalentes entre os grupos funcionais da enzima e a superfície do nanofios modificada.

Para o procedimento de medição, antes do uso, a superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida cuidadosamente com suspensões de alumina $3,0$ e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, em seguida lavou-se com água deionizada. As medidas voltamétricas anódicas foram realizadas na superfície do eletrodo de carbono vítreo (GC) coberta com os nanofios alcanotióis Au-PPY-Ni modificados (detidos por um campo magnético externo). A orientação dos nanofios funcionalizados foi controlada por um magneto externo rotativo (colocado sob o eletrodo de trabalho) em 90° . Os nanofios foram alinhados na posição "vertical" no que diz respeito à superfície durante o estado "ativo" e foram transferidos para a posição "horizontal" para o estado "passivo" (entre as medições) (Ver Figura 7). Todas as medições eletroquímicas foram realizadas numa solução de PBS contendo $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e Ferrocenomonocarboxílico (FMCA) $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

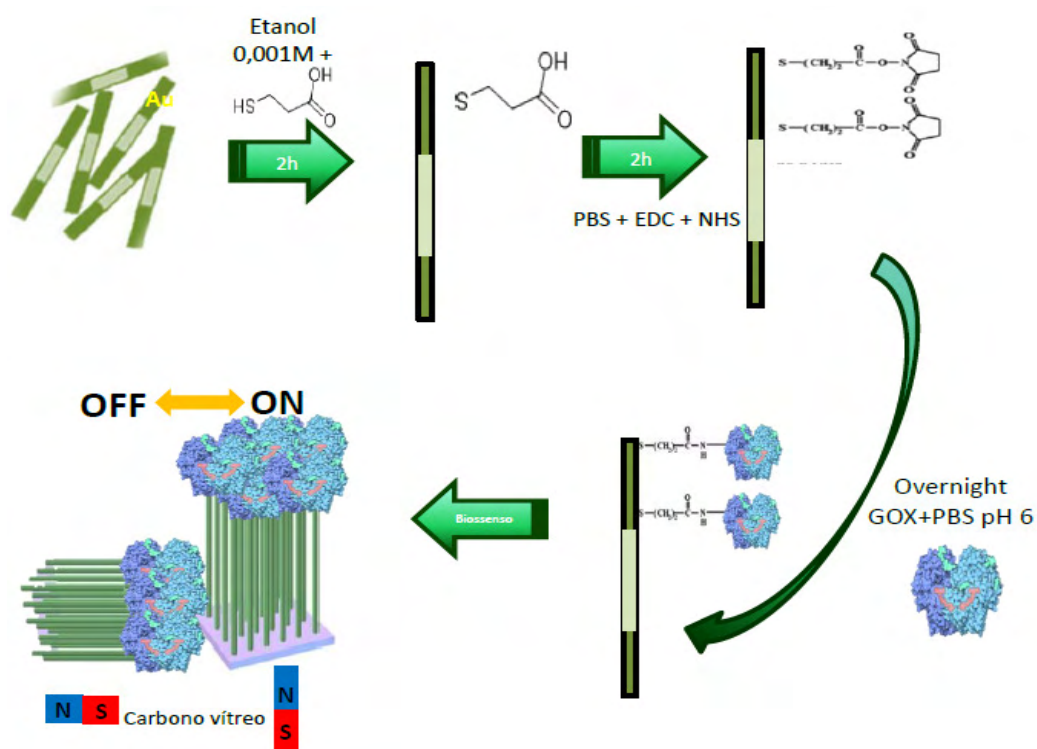


Figura 7. Esquema geral da metodologia da produção do biossensor desenvolvido com nanofios multissegmentados.

3.5. Voltametria Cíclica e Amperométrica

Alguns critérios da técnica de voltametria cíclica foram utilizados para especulações iniciais sobre o comportamento eletroquímico do nanofios depositados sobre o eletrodo de carbono vítreo. Para a realização das medidas adicionou-se à célula eletroquímica 10 mL do eletrólito suporte (tampão PBS) e então a solução foi desoxigenada durante 2 minutos com nitrogênio.

Para as medidas de amperometria realizadas, adicionou-se à célula eletroquímica 10 mL do eletrólito suporte e então se purgou esta solução durante 10 minutos com nitrogênio. Após a eliminação do oxigênio presente, obtiveram-se as curvas de trabalho pelo método da adição de padrão.

4- RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Síntese de Nanofios Multisegmentados

A primeira etapa do projeto consistiu em aprender a síntese dos nanofios com diferentes tamanhos e diferentes composições. O tamanho dos nanofios foi controlado pela quantidade de carga utilizada para depositar os metais ou polímeros. Na Figura 8A vemos nanofios composto por 4 segmentos (ouro-níquel-ouro-polipirrol). Podemos notar que o segmento de ouro é a primeira e terceira parte do nanofios quando olhando de baixo pra cima, já o níquel é o segundo segmento e a parte polimérica sendo a última de cor escura. Os potenciais utilizados para os respectivos segmentos foram -0,9, -1,0, -0,9 e 0,8 V vs. Ag/AgCl. Pode-se notar que para os metais, os potenciais utilizados são negativos já para o polímero é positivo. A uniformidade de comprimento dos nanofios pode ser atribuída a uma lenta taxa de difusão de íons. O transporte de cátions em massa ocorre na entrada dos poros e devido ao excesso de cátions, ocorre assim uma deposição massiva do metal. Este processo de deposição de camadas metálicas em regime de sobrepotencial pode ser influenciado por fatores cinéticos envolvidos nas etapas: (i) transferência de massa, ou seja, transporte de espécies reagentes do seio da solução para uma posição na superfície do substrato onde as reações ocorrem, e pela (ii) transferência de carga que seguem a esta etapa (TRAHEY, BECKER, STACY, 2007, p. 2535). Logo como utilizamos altos potenciais negativos (-0,9 V para o Au) para a eletrodeposição e alta concentração dos metais a serem depositados conseguiu-se a formação dos nanofios com estruturas uniformes em todas as configurações estudadas (Nanofios híbridos, nanocones e nanorods de ouro). Na Figura 8B, podemos notar um nanofio composto por 4 segmentos, sendo observado do sentido esquerdo para o direito: ouro-níquel-prata-cobre. Logo a primeira barreira do trabalho foi vencida, pois aprendemos que é possível a

deposição multissegmentada para a formação de nanofios, utilizando os corretos potenciais e soluções de cada metal ou polímero, pela técnica de cronoamperometria.

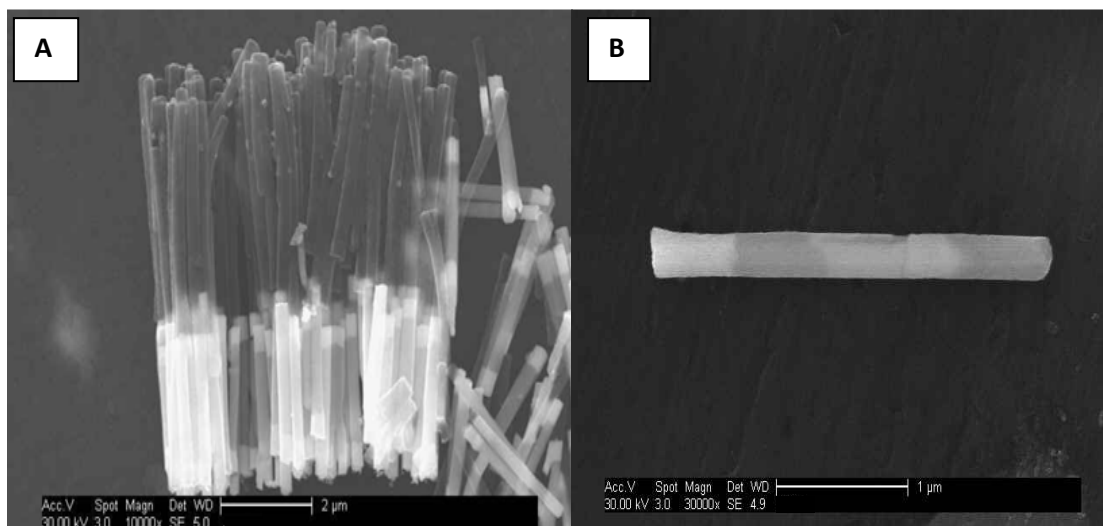


Figura 8. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. A) Nanofios composto por ouro-níquel-ouro-polipirrol e B) ouro-níquel-prata-cobre.

A Figura 9 representa as fases da síntese do nanofios, mostrando como ocorrem as deposições dos segmentos nos poros da membrana e os nanofios resultantes, a fim de se obter um melhor entendimento deste trabalho. Após a realização de corte lateral na membrana, podemos notar que temos um recobrimento contínuo de ouro que serve como o contato elétrico. Na Figura 9A, pode-se notar: (i) a membrana com a camada de sputtering, (ii) a formação dos nanofios dentro da membrana e (iii) o resto da membrana, com seus poros vazios. As imagens de MEV demonstram que o procedimento de formação dos nanofios foi bem sucedido. Os nanofios, como esperado, são formados próximo ao contato elétrico de forma ordenada, pois em todos os procedimentos não houve variação das condições experimentais. O maior receio seria que se não tivéssemos uma boa formação dos nanofios, os metais poderiam começar a se depositarem nas paredes das membranas aleatoriamente,

levando a formação de nanofios quebradiços. Na Figura 9B podemos notar os nanofios dispersos e com a formação de alguns agregados. Na Figura 9C podemos notar um aglomerado de nanofios de ouro, em sua maioria temos tamanhos contínuos e com poucos nanofios quebrados. Por fim, a formação de nanofios com multissegmentos, Au-Ni-PPY-Ni, observados do sentido esquerdo para o direito (Figura 9D).

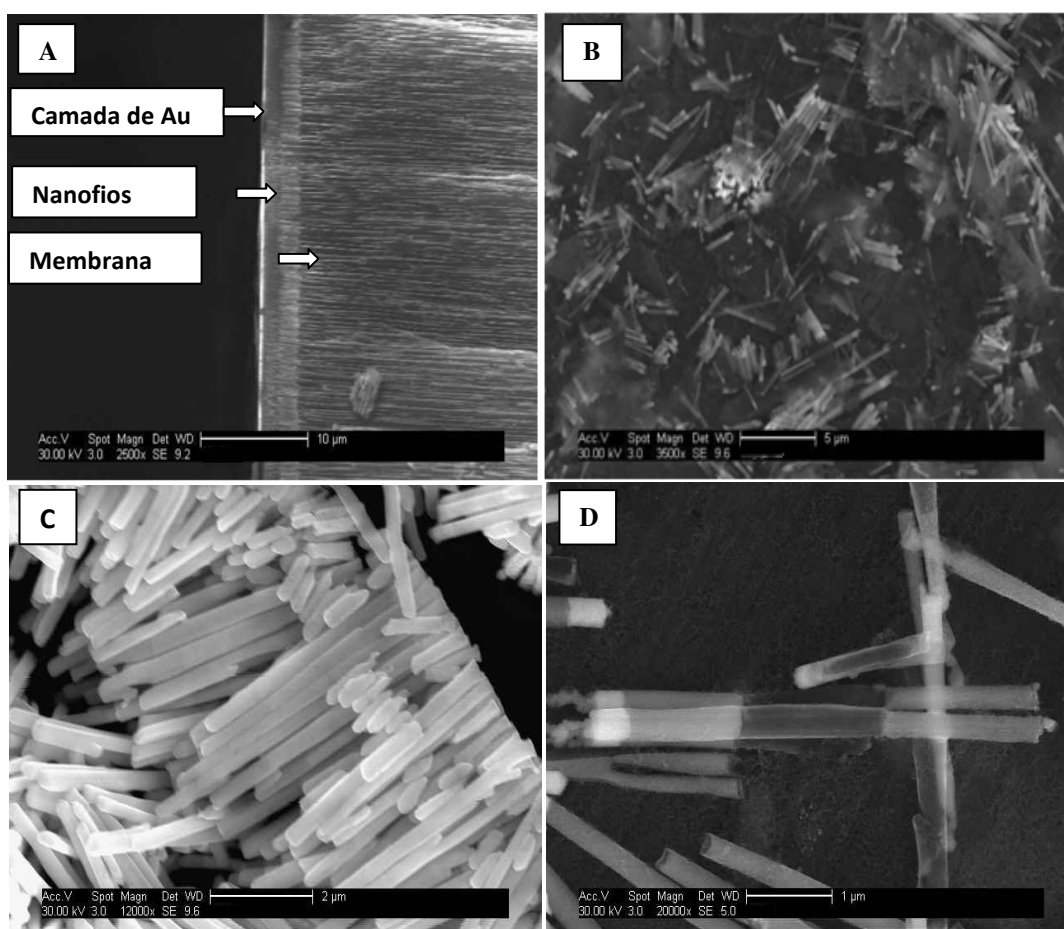


Figura 9. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. (A) Vista lateral da membrana. (B-C) Aglomerados de Nanofios de ouro. (D) Nanofios multissegmentados de Au-Ni-PPY-Ni.

4.2. Controle do tamanho dos nanofios

Na Figura 10 podemos ver a preparação de um conjunto de nanofios com mesmo tamanho do segmento de polímero e controle do segmento de ouro. Todos os potenciais aplicados são em relação ao eletrodo de referência (Ag/AgCl), e os tamanhos dos nanofios foram calculados de acordo com a lei de Faraday assumindo uma eficiência de 100% de corrente, e completo preenchimento dos poros das membranas. Utilizando diferentes quantidades de carga 1,0 (a), 4,0 (b) e 6,0 C (c), podemos notar que o tamanho do segmento de ouro varia conforme a quantidade de carga (parte branca do nanofios), comprovando que podemos produzir nanofios com diversos tamanhos controlando a carga. Os tamanhos obtidos foram de 1,0 (a), 3,2 (b) e 5 μm (c) respectivamente. Já o tamanho do segmento polimérico foi de 10,5 μm para todos os nanofios, pois foi fixada uma quantidade de carga em 6,0 C. Logo podemos desenvolver nanofios com tamanhos programáveis apenas calculando a carga depositada de cada metal ou polímero a ser depositado.

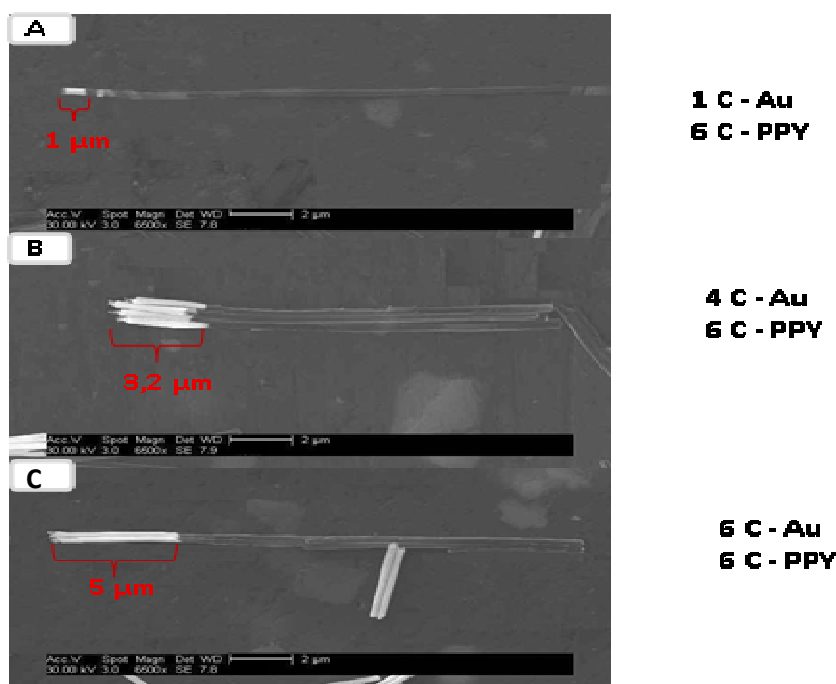


Figura 10. Nanofios com segmentos de ouro-polipirrol com diferentes tamanhos.

4.3. Nanofios híbridos compostos de polímero e CNT

Após a etapa de produção dos nanofios ter sido otimizada (realizada), iniciou-se a produção de nanofios híbridos. A primeira ideia foi produzir nanofios poliméricos modificados com CNT. As micrografias de MEV (Figura 11A) obtidas para ouro/polipirrol modificado com CNT indicam uma superfície altamente lisa. Simulações de EDX confirmaram claramente que o nanofio tinha uma composição de ouro (Figura 11A) e polímero/CNT (Figura 11B). Podemos notar que pela análise de EDX na Figura 11A tínhamos uma composição de 92% de ouro e na Figura 11B diminui para 34% e aumenta proporcionalmente a quantidade de carbono presente para 56%. Confirmando-se assim, que os nanofios preparados com CNT apresentam uma superfície mais homogênea, com altas propriedades elétricas e mecânicas, e pode apresentar um significativo aumento das propriedades catalíticas e na transferência de elétrons, o que pode beneficiar sua aplicação nas áreas de energia e sensores (AHN *et al.* 2013, p. 41; DUNG *et al.* 2013, p. 280).

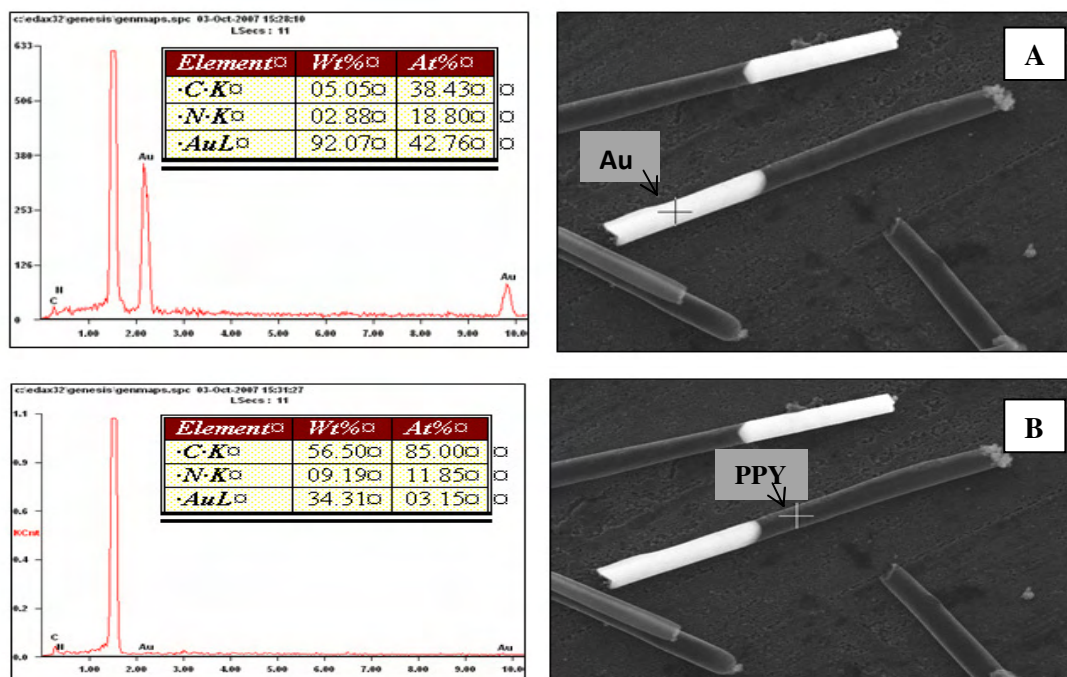


Figura 11. Imagens por MEV e EDX apresentando os nanofios de ouro/polipirrol modificado com CNT.

4.4. Nanofios com formato de cone

A partir dos resultados obtidos, foram despertando novas ideias, logo surgiram novos desafios. Na Figura 12A podemos ver um nanofio na forma de cone e com poros. Nessa metodologia utilizou-se a misturas de metais (ligas de ouro e prata) para produção desses nanofios e diferentes porcentagens de mistura: 20-80%, 30-70%, 40-60% e 50-50% de Au-Ag em diferentes etapas de deposições. A grande diferença no preparo desse nanofios foi que após o término de sua preparação colocou-se os nanofios em solução de ácido nítrico concentrado, o qual ataca a prata, levando a sua dissolução, e deixando apenas o ouro depositado. A Figura 12B corresponde à MEV com aumento de 35000 vezes, nota-se que a parte atacada pelo HNO_3 forma pequenos poros nos nanofios. A ideia é de aumentar a porosidade dos nanofios, e assim, aumentando a área de contato, o que poderá consequentemente, aumentar a transferência eletrônica. Laocharoensuk *et al.* (2007) prepararam nanofios porosos bimetálicos de ouro e prata variando as proporções, com diferentes formas e diâmetros, depositando os seguimentos da liga metálica em uma membrana de alumina. Eles sugeriram uma metodologia para obtenção de nanofios em forma de cone pela modificação das nanoestruturas através da remoção dos segmentos de prata e a reordenação dos segmentos de ouro. O diâmetro dos nanofios porosos de ouro foi controlado de acordo com a variação nas proporções da liga metálica, resultando em nanofios que podem ser utilizados em uma variedade de aplicações.

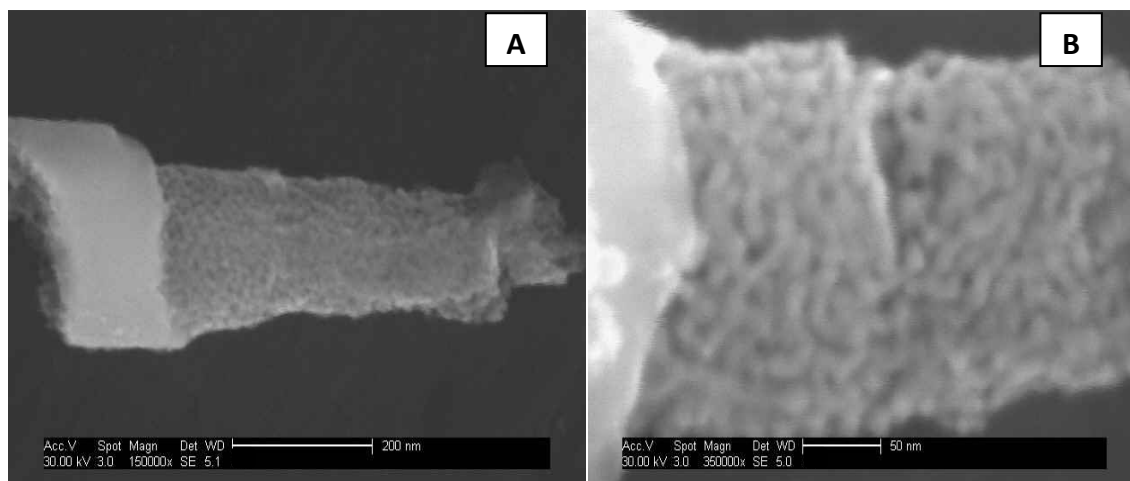


Figura 12. A) Nanofios compostos de ouro após dissolução da prata e B) visão mais aproximada do segmento de ouro.

4.5. Nanofios com *Nanorods* de Ouro

Outra ideia desenvolvida foi a de produzir nanofios com multifunções. Neste caso, sugeriu-se o desenvolvimento de nanofios com nanopartículas de ouro, também chamados de “nanorods”. Na Figura 13A podemos notar o nanofio composto de polipirrol com nanopartículas de ouro dentro do polipirrol. Essa nova metodologia poderá ser utilizada na nanomedicina para melhor fixação de componentes biológicos como: enzimas, receptores, agentes ligantes e DNA para produção de biossensores ou “drugs delivery”. Na Figura 13B podemos notar que a formação de nanopartículas de ouro dentro do polipirrol não se mostrou totalmente uniforme, tendo inclusive diferentes tamanhos. Porém o indicativo da possibilidade de desenvolvimento da junção de nanofios e nanopartículas nos levou a outros testes, como a tentativa de formar segmentos com tripla funcionalidade como: polipirrol, ouro e nanopartículas de níquel.

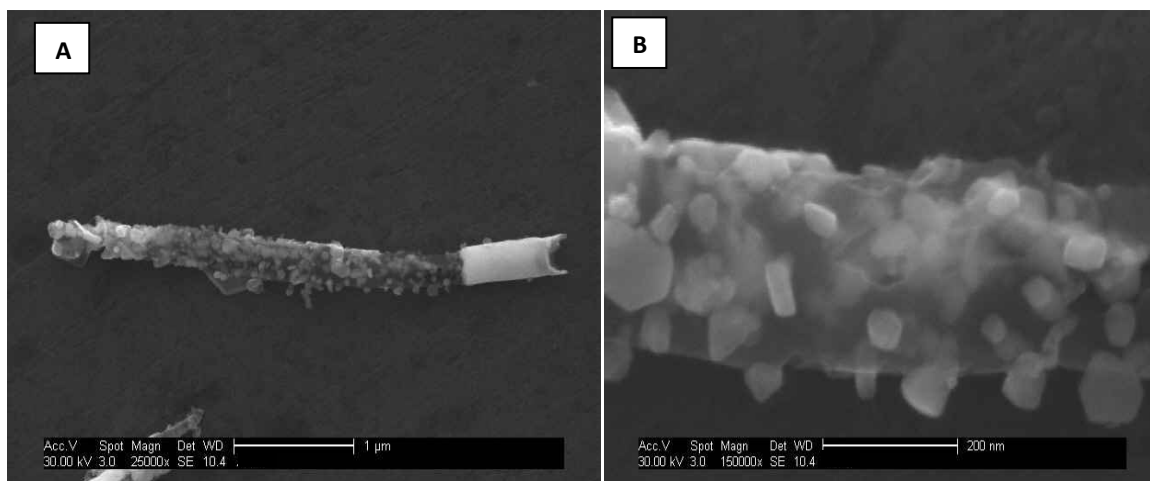


Figura 13. Imagens obtidas pelo MEV dos nanofios produzidos via eletrodeposição nos poros da membrana AAO. A) Nanofios formados de ouro e polipirrol com nanopartículas de ouro dentro do segmento polimérico e B) visão mais aproximada das nanopartículas.

4.6. Estudos Eletroquímicos Utilizando o Controle Magnético

Investigou-se o controle magnético dos nanofios de Au-Ni-PPy-Ni (Fig. 9-D) para modular sua atividade eletrocatalítica em diferentes ângulos. Tal capacidade pode ser extremamente útil para ajustar: a reatividade eletroquímica, a potência de saída das células de combustível, e/ou para controlar a transferência eletrônica em biossensores. Para estudar a capacidade de se usar nanofios por controle magnético em processos eletroquímicos, optamos por usar nanofios que continham seguimentos de níquel, pois possuem autoindução magnética, cuja medida de intensidade da fonte magnética é $2,8 \text{ Wb m}^{-2}$. Utilizando-se eletrodos de carbono vítreo impresso, os nanofios foram magneticamente orientados na posição (a) horizontal e (b) vertical sobre o eletrodo (Figura 14), para isso utilizou-se um ímã. Para estes estudos eletroquímicos utilizou-se o FMCA como par redox, e observou-se um par redox com potencial de oxidação de 0,27 V na ausência do campo magnético (nanofios

orientados na posição horizontal). Posicionando os nanofios sobre a superfície do eletrodo de carbono com a presença de um campo magnético, na orientação vertical, obteve-se um aumento de corrente (b), o que pode demonstrar que a espécie redox consegue atravessar as estruturas nanométricas com mais facilidade. Logo comparados os resultados obtidos, quando os nanofios encontram-se na posição horizontal sobre o eletrodo (a) existe uma diminuição da corrente e um menor deslocamento dos potenciais redox. O que confirma que os nanofios inibem o processo de transferência eletrônica para a espécie redox em solução na posição horizontal (dificultando a passagem de elétrons). A mudança observada é reversível e reproduzível entre estados inativos (horizontal) e ativos (vertical). Resultados semelhantes já foram estudados por Wang e colaboradores para oxidação de glicose e metanol sobre eletrodos de ouro na presença de nanofios sobre os efeitos magnéticos (WANG *et al.* 2006, p. 4562). Este comportamento foi atribuído ao bloqueio reversível nos processos redox e a alterações na velocidade do fluxo de elétrons.

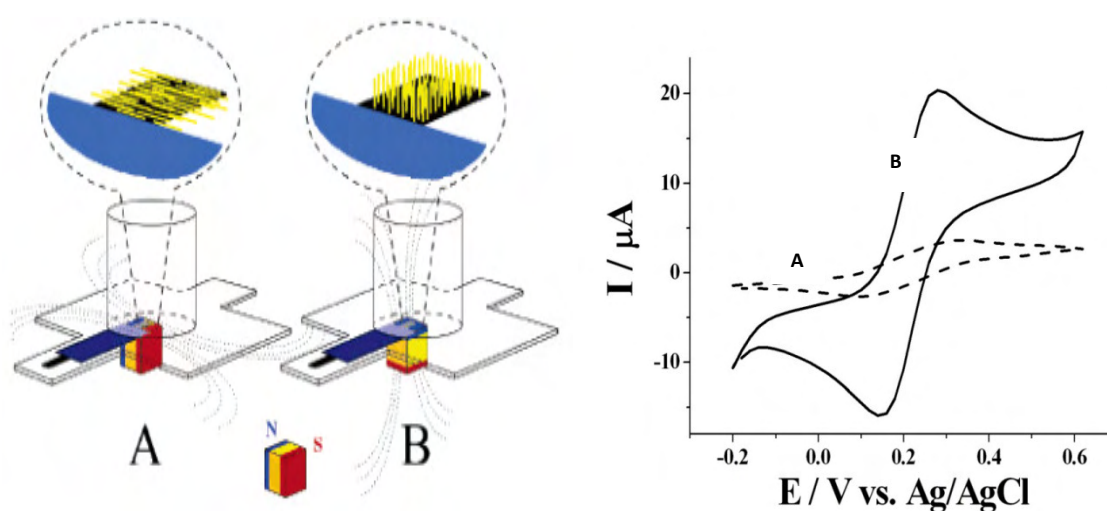
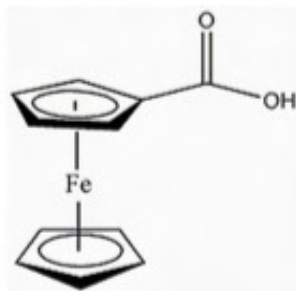


Figura 14. Voltamograma cíclico obtido para o eletrodo de carbono na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ FMCA, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .



Ácido Ferrocenomonocarboxílico
(Fc_2R^+)

Também foram estudados os efeitos da variação da velocidade por voltametria cíclica com aplicação do campo elétrico (nanofios na posição horizontal e vertical). Na Figura 15 (nanofios na posição vertical) estão representados os voltamogramas cíclicos correspondentes ao processo redox do ferroceno, após ter reagido com a GOx reduzida. Observa-se um aumento na intensidade das correntes de pico catódicas e anódicas variando linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (*inset* da Figura 15), mostrando que a transferência de íons da solução até a superfície do eletrodo é limitada pelo transporte difusional de massa, o que confirma ainda mais que a espécies redox não estão restritas à esfera do eletrodo.

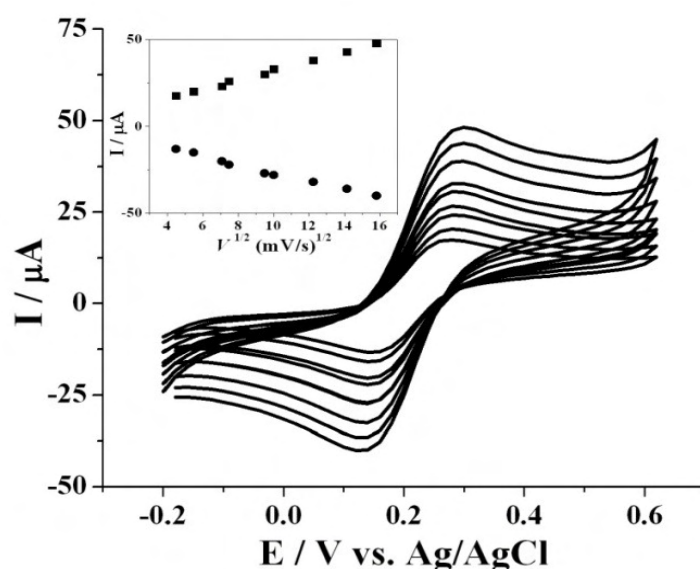


Figura 15. Voltamograma cíclicos do eletrodo de carbono obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura ($10 - 250 \text{ mV s}^{-1}$). As medidas foram realizadas em solução de KCl pH 4,0, na presença de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ FMCA. No *inset* nota-se a dependência da corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.

Assim como observado para os nanofios na posição vertical, foi estudada a variação da velocidade com os nanofios na posição horizontal. Comparando as Figuras 15 e 16, podemos notar que há uma diminuição gradativa da corrente de pico entre a posição vertical e horizontal. Assim, comprova-se que quando os nanofios estão dispostos na posição vertical é facilitada a passagem de corrente e, conseqüentemente, obtém-se uma participação de corrente maior que leva a um menor deslocamento dos picos de oxidação e redução. Já com os nanofios na posição horizontal há uma diminuição da corrente de pico devido ao bloqueio da superfície com a conseqüente diminuição da corrente.

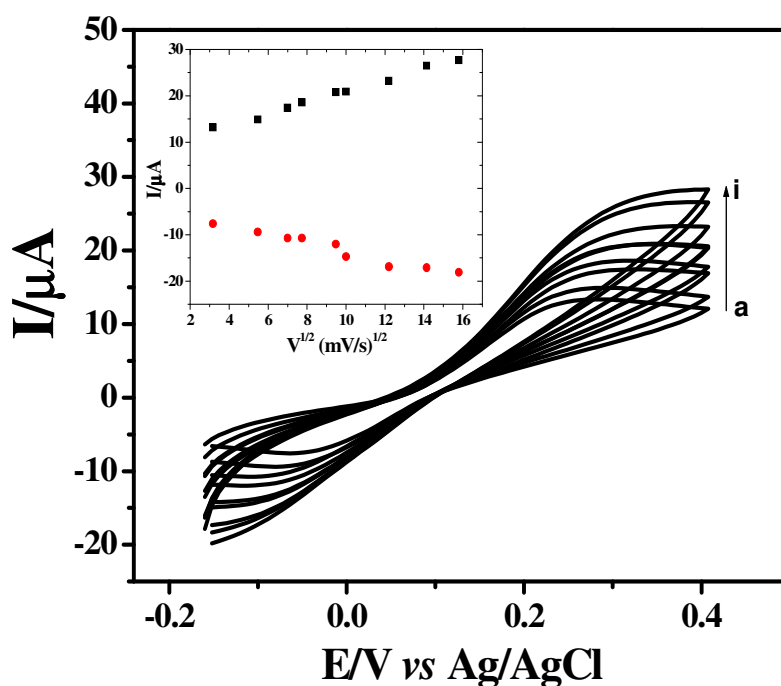
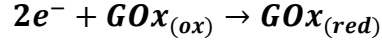
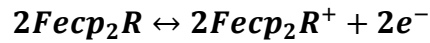
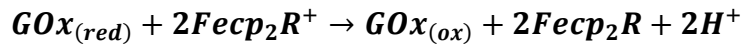


Figura 16. Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura (10(a) - 250 mV s^{-1} (i)). As medidas foram em solução de KCl de pH 4,0, na presença de 0,5 mmol L^{-1} FMCA. No *inset* nota-se a dependência da corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.

Oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase, que oxida diretamente a glicose.



Redução da enzima glicose oxidase pelo mediador que transporta os elétrons para o eletrodo de trabalho.



4.7. Biossensores baseados em Nanofios

Os nanofios utilizados para o desenvolvimento do biossensor foram os multissegmentados de Au-Ni-PPY-Ni (Fig. 9-D), aos quais receberam a enzima glicose oxidase. A enzima foi acoplada utilizando o sistema EDC/NHS, o qual tem afinidades pelo grupo carboxílico do 3-MPA, previamente descrito na parte experimental.

A capacidade de usar nanofios com controle magnético nos processos eletroquímicos é ilustrada na Figura 17, onde é mostrada a resposta amperométrica na presença de glicose. Como podemos notar os nanofios foram magneticamente orientados nas posições de sentido vertical (a) e horizontal (b). Posicionando os nanofios sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo, o sítio ativo da enzima fica disponível, e o campo magnético foi testado na orientação vertical levando a um aumento de corrente (A), demonstrando assim sua ação catalítica. Porém com os nanofios posicionados na posição horizontal (B) podemos notar uma

diminuição na corrente. Essa mudança de comportamento se mostrou reversível, logo podendo ser repetida várias vezes. Embora os sítios catalíticos sejam plenamente acessíveis para a glicose na orientação vertical, a mudança para a posição horizontal bloqueia parcialmente a resposta catalítica, o que dificulta o transporte de massa para a superfície do eletrodo. Estes efeitos de superfície são o oposto do que é esperado devido aos efeitos hidrodinâmicos do magneto que são pronunciados quando o campo magnético é paralelo à superfície do eletrodo, isto é, quando os nanofios estão na posição horizontal e quando a perpendicular é negligenciável.

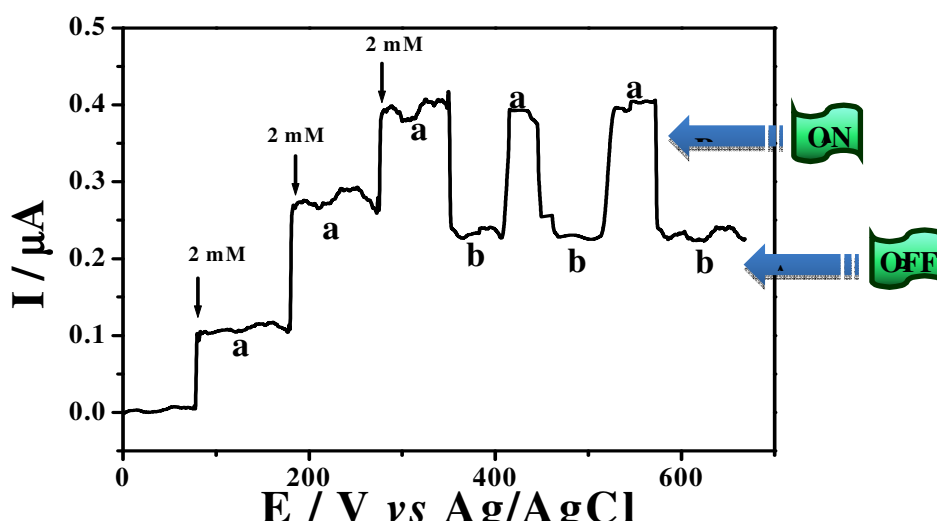


Figura 17. Resposta amperométrica para 1 mmol L⁻¹ de glicose, com os nanofios orientados na vertical (A) e posição horizontal (B). Potencial aplicado + 0,4 V (vs. Ag/AgCl) em 0,5 m mol L⁻¹ FMCA + 10 mmol L⁻¹ PBS (pH = 6,0).

Antes de se estabelecer uma metodologia de análise para a determinação de glicose variaram-se alguns parâmetros experimentais do biossensor como: pH da solução, concentração do substrato e da enzima para otimização do sistema. O primeiro efeito avaliado foi o pH da solução. O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. A enzima GOx apresenta pH ótimo em 5,5 onde a atividade e as velocidades das reações são máximas, porém possui uma faixa de boa atividade entre pH 4-7. O pH onde a soma das cargas negativas é igual a das cargas positivas, ou seja o seu ponto isoelétrico (pI) é 4,3. Em pH

maior do que o pI a proteína terá carga negativa efetiva. Em pH menor do que o pI a proteína terá carga positiva efetiva. Assim, a magnitude da carga elétrica efetiva de uma proteína depende da diferença entre o pH e o pI da mesma (PACE *et al.* 2009, p. 13285). A Figura 18 mostra a variação do pH da solução de 5,0 a 7,5 em função da corrente de pico obtida da glicose. O potencial de pico da glicose é fortemente influenciado pela variação do pH do meio. A melhor resposta da corrente de pico do biossensor foi verificada em pH 6,0, decrescendo em valores de pH inferiores e superiores. Consequentemente, os estudos a seguir foram realizados em tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ com o pH 6.

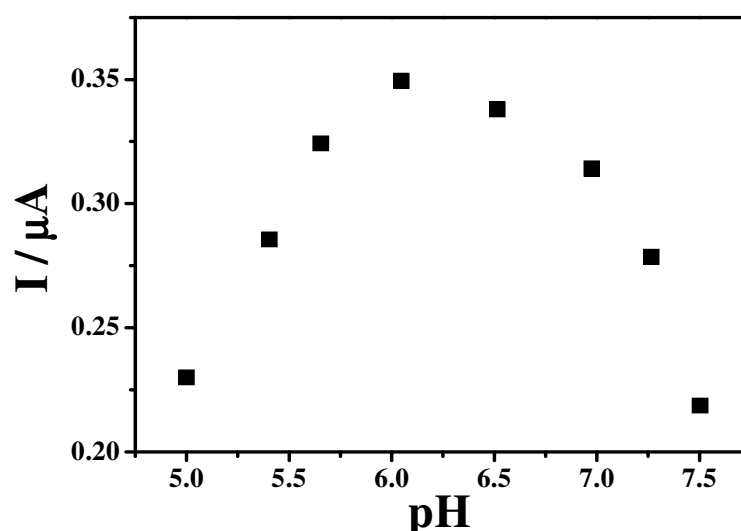


Figura 18. Influência do pH na corrente para a oxidação de FMCA 0,5 mmol L⁻¹ em PBS.

4.7.1. Efeitos da quantidade de enzima no eletrodo

A Figura 19 mostra a variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo. A razão da catálise enzimática depende diretamente da concentração da enzima em solução. Em geral, pode-se notar que a concentração de enzima em solução varia de 0,1-0,6 mg mL⁻¹. A concentração de enzima é bem menor do que a concentração de substrato, porém o mais importante é encontrar a melhor relação enzima/substrato para otimizar a velocidade da

reação enzimática. Pode-se observar, na Figura 19, que após a adição de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ de enzima, não houve mais aumento na intensidade da corrente, optando-se, então, por trabalhar com essa quantidade, pois nesta concentração a reação enzimática se mostrou a mais favorável para as análises seguintes.

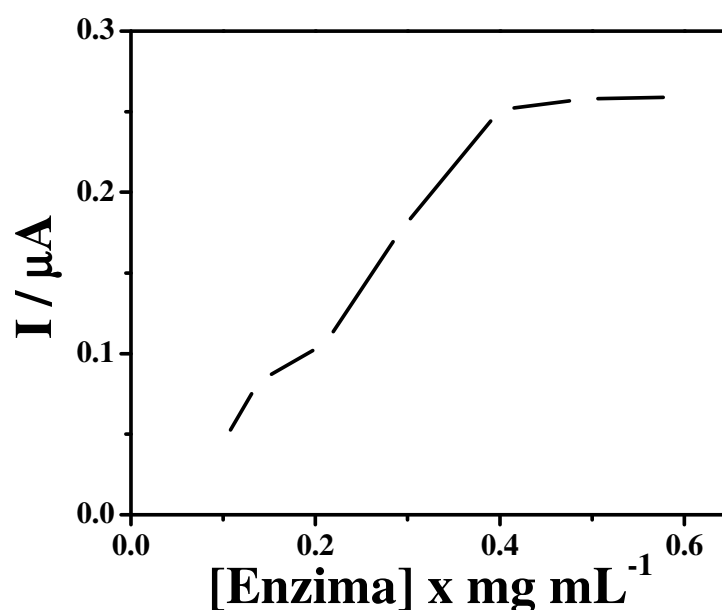


Figura 19. Variação da quantidade de enzima adicionada ao eletrodo (FMCA = $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ em PBS 10 mmol L^{-1} , pH = 6,0, potencial fixo de 0,36 V vs. Ag/AgCl).

4.7.2. Efeitos da variação do Potencial

O potencial eletroquímico aplicado é outro fator muito importante para se avaliar, pois este juntamente com a enzima, resulta na corrente medida nas análises. Esta variação pode ser vista na Figura 20. Variou-se a o potencial numa faixa de 0,2 a 0,55 V vs. Ag/AgCl. A partir do potencial aplicado de 0,4 V notou-se que a corrente não sofreu variações consideráveis. Logo pode-se notar que mesmo com o aumento do potencial, acima de 0,4 V, não houve aumento da reação enzimática.

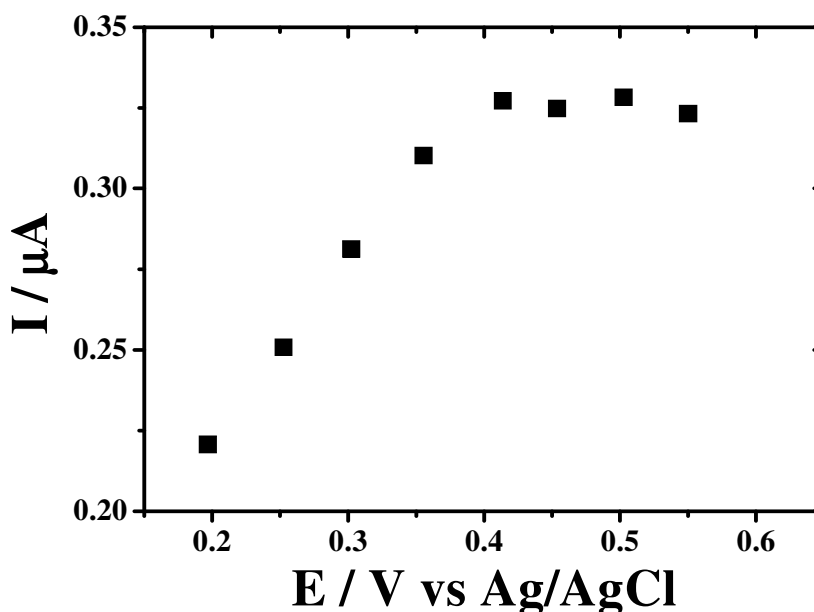


Figura 20. Efeito da dependência do potencial na resposta do biossensor para 0.5 mmol L⁻¹ FMCA em 10 mmol L⁻¹ PBS, pH = 6.0.

4.7.3. Determinação da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais e otimização na construção do biossensor, foi construída a curva analítica pelo método de adição de padrão. A técnica de cronoamperometria foi utilizada na obtenção da curva analítica para a determinação de glicose em presença de FMCA.

Os amperogramas para cada concentração de glicose são apresentados na Figura 21. Observa-se que a corrente de pico diminui proporcionalmente com o aumento da concentração até um determinado patamar. A curva analítica pode ser observada no *inset* da Figura 21. A faixa de concentração estudada foi de 2,0 - 16,0 mmol L⁻¹ de glicose em solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹, com inclinação da reta de 7,95 μA mol⁻¹ e um coeficiente de

correlação de 0,997. Para a determinação do limite de detecção utilizou-se o desvio padrão de 3x a relação sinal/ruído, obtidos das correntes medidas por amperometria no mesmo potencial do pico de oxidação do FMCA:

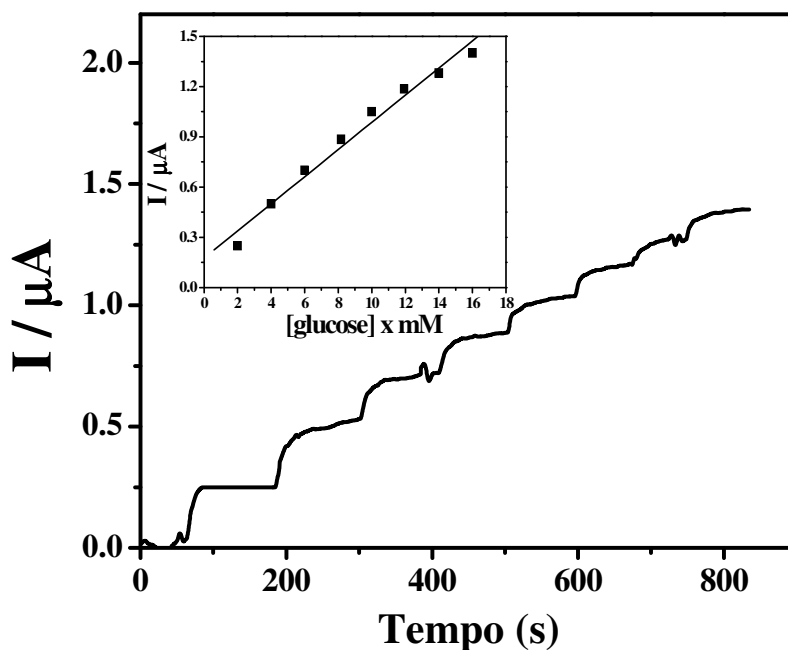


Figura 21. Amperograma para o biossensor em diferentes concentrações de glicose, em solução tampão fosfato 10 mmol L⁻¹ pH = 6,0 na presença de 0,5 mmol L⁻¹ de FMCA e potencial fixo de 0,36 V vs. Ag/AgCl. *Inset:* variação da concentração de glicose.

O limite de detecção obtido foi de $3,7 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. A reprodutibilidade do método foi determinada por medidas sucessivas de cinco soluções diferentes de glicose na concentração de $1,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, o coeficiente de variação foi de 5,2 %. Desta forma, o nanobiossensor surge como uma alternativa a tradicional técnica cromatográfica, com a vantagem das medidas serem realizadas em tempo bem menor e a possibilidade de serem feitas diretamente sem a necessidade de pré - tratamentos das amostras.

Tabela 2. Comparação da performance de diferentes biossensores eletroquímicos para determinação de glicose.

Biossensor de Glicose	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referências
PtNPs/CNT/GCE	-	0,4	LI <i>et al.</i> 2011.
PtNPs/GOx	30,33	0,1	ZHU <i>et al.</i> 2007.
AgNPs/CNT/Chitosana	135,9	0,1	LIN <i>et al.</i> 2009.
AuNPs/MwCNTs	-	0,03	NOROUZI <i>et al.</i> 2010.
Cu/MWCNT	700-3500	0,21	KANG <i>et al.</i> 2007.
NiNW	0,5-7000	0,1	LU <i>et al.</i> 2009.
GCE/Fe ₃ O ₄ /PB/GOD	0,5-80	0,1	LI <i>et al.</i> 2009.
(PAH-MCNT/HRP)n/(ConA/GOD)n/Au	2-170	0,25	CHEN <i>et al.</i> 2010.
GOx/Au-Ni-PPy NWs	2000-16000	0,37	Este Trabalho

4.7.4 Testes de Substâncias Interferentes

Também foram estudados os efeitos de substâncias interferentes tais como: ácido ascórbico (AA), acetoaminofeno (AP) e ácido úrico (UA) que podem estar presentes em fluidos fisiológicos, mascarando assim a resposta do biossensor de glicose. Foram investigados os efeitos de AA, AP e UA a $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, sobre a resposta do biossensor de glicose nas mesmas condições acima estabelecidas. A Figura 22 mostra a resposta amperométrica após injeção de AA, AP e UA. Pode-se notar que as espécies estudadas não resultaram em correntes de oxidação apreciáveis. Em comparação, a adição de glicose $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ produziu um grande aumento de corrente causada pela oxidação de glicose. Logo estes resultados demonstram que o biossensor se mostrou seletivo para glucose, na presença de outras substâncias interferentes.

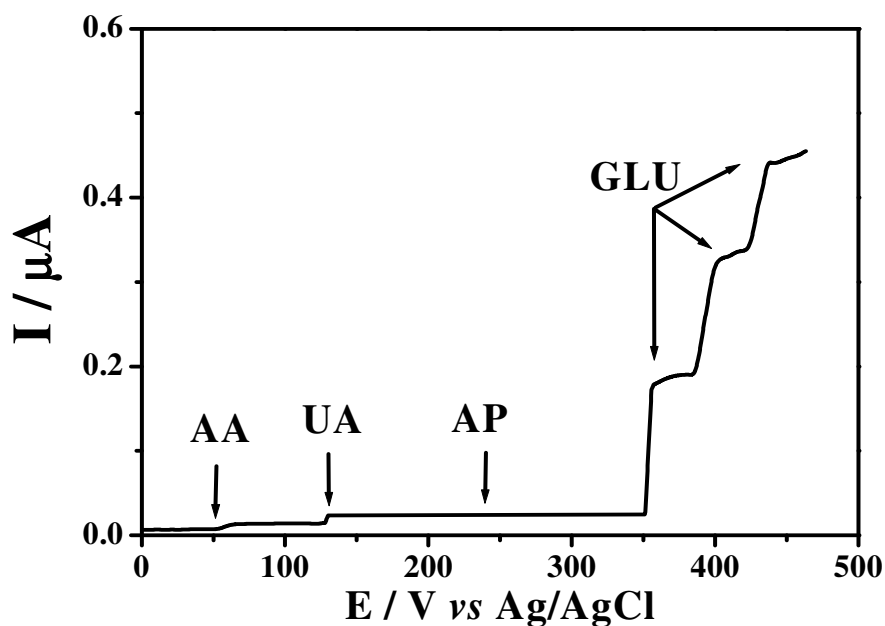


Figura 22. Teste de interferentes do biossensor de glicose na presença de glicose.

4.7.5. Vida útil do Biossensor

A Figura 23 mostra a resposta do sensor de concentração de 2 mmol L^{-1} de glicose registrada durante o período de 30 dias. A resposta do biossensor diminuiu gradativamente nos primeiros dias, após 15 dias observa-se um rendimento de 95% da sua resposta inicial, ao longo de um mês de armazenamento, o sinal de resposta caiu para 85%. No entanto, por causa da operação de modo cinético, este biossensor pode ser facilmente calibrado durante todo o tempo de funcionamento e redução significativa da atividade inicial não é um problema na medida em que a inclinação da curva de calibração é íngreme suficiente para proporcionar parâmetros apropriados do sensor e detecção confiável. O desvio padrão relativo (RSD) calculado das amostras foi de 8,2% estimada, revelando uma reprodutibilidade aceitável.

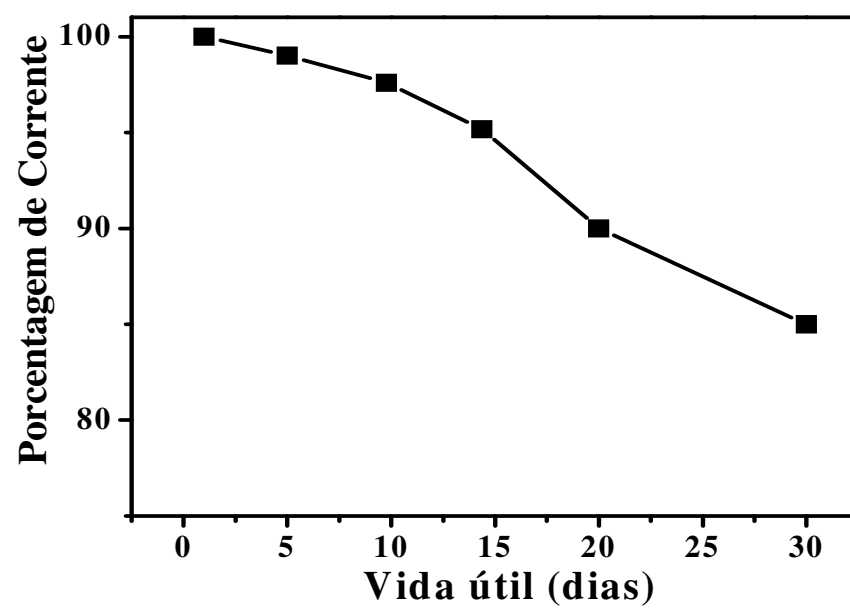


Figura 23. Resposta do biossensor com concentração de 2 mmol L^{-1} de glicose em diferentes dias.

5. CONCLUSÕES

Com este trabalho, descrevemos a síntese de nanofios utilizando membranas de AAO pela eletrodeposição de metais e polímero, tais nanofios são ideais para aplicações em biossensores. Os nanofios foram modificados com EDC/NHS para receber a enzima GOx, afim de se obter respostas biocatalíticas de sensoriamento na presença de glicose. Com a utilização do níquel foi possível controlar magneticamente a orientação dos nanofios sobre a superfície do eletrodo de carbono impresso. As respostas mostraram que os nanofios posicionados verticalmente, apresentaram um aumento significativo na ação catalítica pela resposta amperométrica na presença da glicose.

Vários parâmetros experimentais do biossensor foram estudados, como por exemplo: a otimização do pH da solução em 6; a concentração enzimática para se preparar o biossensor foi de $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, o resultados mostraram que após o aumento desta concentração não havia aumento na intensidade da corrente. Nas análises variando o potencial eletroquímico, determinou-se que a partir de um potencial de 0,4 V não houve aumento da reação enzimática, tornando desnecessária a utilização de um potencial maior. Na construção da curva analítica para a determinação de glicose os resultados obtidos mostraram uma inclinação da reta de $7,95 \text{ } \mu\text{A mol}^{-1}$, com um coeficiente de correlação de 0,997 e o limite de detecção do biossensor foi determinado, sendo $3,7 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Devido a presença de interferentes presentes nas amostras, foram realizados os testes de detecção de AA, AP e UA na presença de glicose. Os resultados apresentaram uma alta seletividade e eficiência para a detecção de glicose, mesmo na presença de outras substâncias. O tempo útil para a utilização do biossensor foi estimado em aproximadamente 30 dias, com uma faixa de 85% de resposta, provando-se que a detecção de glicose diminui gradativamente ao longo dos dias. Por isso acredita-se que a preparação de biossensores utilizando nanofios, como base, seja uma alternativa promissora para aplicação em análises médicas.

REFERÊNCIAS

AGASTI, S. S.; RANA, S.; PARK, M. H.; KIM, C. K.; YOU, C. C.; ROTELLO, V. M. Nanoparticles for detection and diagnosis. **Journal Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 62, p. 316–328, 2010.

AGUILAR, A. D.; FORZANI, E. S.; LERIGHT, M.; TSOW, F.; CAGAN, A.; IGLESIAS, R. A.; NAGAHARA, L. A.; AMLANI, I.; TSUI, R.; TAO, N. J. A Hybrid Nanosensor for TNT Vapor Detection. **Nano Letters**, California, v. 10, n. 2, p. 380-384, 2010.

ALBERY, W.J., BARTLETT, P.N. & CRACTON, D. Amperometric enzyme electrodes. Part 2: conducting organic salt as electrode materials for the oxidation of the glucose oxidase. **J. Eletroanal. Chem.**, V.194, p. 223-35, 1985.

AHN, J. Y.; KIM, J. H.; MOON, K. J.; KIM, J. H.; LEE, C. S.; KIM, M. Y.; KANG, J. W.; KIM S. H. Incorporation of multiwalled carbon nanotubes into TiO₂ nanowires for enhancing photovoltaic performance of dye-sensitized solar cells via highly efficient electron transfer. **Solar Energy**, v. 92, p. 41-46, 2013.

ASEFA, T.; MACIACHLAN, M. J.; COOMBS, N.; OZIN, G. A. Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls. **Nature**, Philadelphia-USA, v. 402, p. 867-871, 1999.

BAO, J. C.; TIE, C. Y.; XU, Z.; ZHOU, Q. F.; SHEN, D.; MA, Q. Template Synthesis of an Array of Nickel Nanotubules and Its Magnetic Behavior. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 13, n. 21, p. 1631-1633, 2001.

BERTOK, T.; SEDIVA, A.; KATRLIK, J.; GEMEINER, P.; MIKULA, M.; NOSKO, M.; TKAC, J. Label-free detection of glycoproteins by the lectin biosensor down to attomolar level using gold nanoparticles. **Talanta**, v. 108, p. 11-18, 2013.

CABEZON, E.; LANZA, V. F.; ARCHAGA, I. Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 537-544, 2012.

CAI, W.; SHIMPI, P.; JIAN, D.; GAO, P. X. Oxide-catalyzed growth of Ag₂O/Zn₂SnO₄ hybrid nanowires and their reversible catalytic ambient ethanol/oxygen detection. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 25, p. 5265-5270, 2010.

CAVALCANTI, A.; SHIRINZADEH, B.; FREITAS, R. A.; HOGG, T. Nanorobot architecture for medical target identification. **Nanotechnology**, United Kingdom, v. 19, n. 1, p. 015103, 2008.

CHE, G.; LAKSHMI, B. B.; MARTIN, C. R.; FISHER, E. R.; RUOFF, R. S. Chemical Vapor Deposition Based Synthesis of Carbon Nanotubes and Nanofibers Using a Template Method. **Chem. Mater.** Troy-New York, v. 10, n. 1, p. 260-267, 1998.

CHE, G. L.; LAKSHMI, B. B.; FISHER, E. R.; MARTIN, C. R. Carbon nanotubule membranes for electrochemical energy storage and production. **Nature**, New York, v. 393, p. 346-349, 1998.

CHEN, H.; XI, F. N.; GAO, X.; CHEN, Z. C.; LIN, X. F. Bionzyme bionanomultilayer electrode for glucose biosensing based on functional carbon nanotubes and sugar–lectin biospecific interaction. **Analytical Biochemistry**, v. 403, p. 36-42, 2010.

CHI, F.; WANG, Z. P. XUE, C. S. Synthesis and characterization of GaN nanowires by ammoniating Ga₂O₃/Cr thin films deposited on Si (1 1 1) substrates. **Applied Surface Science**. China, v. 256, p. 4883-4887, 2010.

COCO, S.; CORDOVILHA, C.; DONNIO, B.; ESPINET, P.; GARCIA-CASAS, M. J.; GUILLON, D. Self-Organization of Dendritic Supramolecules, Based on Isocyanide–Gold(I), –Copper(I), –Palladium(II), and –Platinum(II) Complexes, into Micellar Cubic Mesophases. **Chemistry-A European Journal**, Weinheim, v. 14, n.2, p. 3544-3552, 2008.

CUI, Y.; WEI, Q. Q.; PARK, H. K.; LIEBER, C. M. Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species. **Science**, v. 293, n. 5533, p. 1289-1292, 2001.

DUNG, N. Q.; PATIL, D.; JUNG, H.; KIMN, D. A high-performance nonenzymatic glucose sensor made of CuO–SWCNT nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 280-286, 2013.

FAN, Y.; CHEN, X. T.; TRIGG, A. D.; TUNG, C. H.; KONG, J. M.; GAO, Z. Q. Detection of MicroRNAs Using Target-Guided Formation of Conducting Polymer Nanowires in Nanogaps. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 17, p. 5437-5443, 2007.

FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores – Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 1, 28-39, 1992.

GELVES, G. A.; MURAKAMI, T. M.; KRANTZ, M. J.; HABER, J. A. Multigram synthesis of copper nanowires using ac electrodeposition into porous aluminium oxide templates. **Journal of Material Chemistry**, London, v.16, p. 3075-3083, 2006.

HENDRY, S.P., CARDOSI, M.F., TURNER, A.P.F. & NEUSE, E.W. Polyferrocenes as mediators in amperometric biosensors for glucose. **An. Chim. Ac.**, V.281, p. 453-59, 1993.

HERNANDEZ, R. M.; RICHETER, L.; SEMANCIK, S.; STRANICK, S.; MALLOUK, T. E. Template Fabrication of Protein-Functionalized Gold-Polypyrrole-Gold Segmented Nanowires. **Chem. Mater.** v. 16, n. 18, p. 3431-3438, 2004.

HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; GARCIA, M. B. G.; GARCIA, A. C. Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis. **Electroanalysis**, V. 14, N. 18, p. 1225-1235, 2002.

HIDALGO, P.; ENDEZ, B. M.; PIQUERAS, J. GeO₂ nanowires and nanoneedles grown by thermal deposition without a catalyst. **Nanotechnology**, v. 16, n. 11, p. 2521-2524, 2005.

HULTEEN, J. C.; MARTIN, C. R. A general template-based method for the preparation of nanomaterials. **Journal Mater. Chem.**, London, v. 7, p. 1075-1087, 1997.

HURST, S. J.; PAYNE, E. K.; QIN, L. D.; MIRKIN, C. A. Multisegmented One Dimensional Nanorods Prepared by Hard-Template Synthetic Methods. **Angew Chem. Int. Edit.** Weinheim, v. 45, n. 17, p. 2672-2692, 2006.

INOVAÇÃO TECNOLÓGICA. Nanofios poderão monitorar e estimular neurônios individuais, São Paulo, 2005. Disponível em: <http://www.inovacaotecnologica.com.br/noticias/noticia.php?artigo=010165050719>.

Acesso em: 05 de dez. de 2013.

IVANOVA, S.; LOUIS, B.; LEDOUX, M. J.; PHAM-HUU, C. J. Autoassembly of nanofibrous zeolite crystals via silicon carbide substrate self-transformation. **Journal the American Chemistry Society**, Salt Lake City, v. 129, n. 11, p. 3383-3391, 2007.

JOYCE, H. J.; GAO, Q.; TAN, H. H.; JAGADISH, C.; KIM, Y.; ZHANG, X.; GUO, Y. N.; ZOU, J. Twin-Free Uniform Epitaxial GaAs Nanowires Grown by a Two-Temperature Process. **Nano Letter**, California, v. 7, n. 4, p. 921-926, 2007.

JUNG, J.; LIM, S. ZnO nanowire-based glucose biosensors with different coupling agentes. **Applied Surface Science**, v. 265, p. 24-29, 2013.

KAMOTO, M.; UMEZAWA, N.; KATO, N.; HIGUCHI, T. Novel Probes Showing Specific Fluorescence Enhancement on Binding to a Hexahistidine Tag. **Chemistry-A European Journal**, v. 14, n. 26, p. 8004-8012, 2008.

KANG, S.; SU, P. C.; PARK, Y. I.; SAITO, Y.; PRINZ, F. B. Thin-Film Solid Oxide Fuel Cells on Porous Nickel Substrates with Multistage Nanohole Array. **Journal Electrochem. Soc.**, v. 153, n. 3, p. A554-A559, 2006.

KANG, X.; MAI, Z. ZOU, X.; CAI, P.; MO, J. A sensitive nonenzymatic glucose sensor in alkaline media with a copper nanocluster/ multiwall carbono nanotube-modified glassy carbono electrode. **Anal. Biochemical**, v. 363, p. 143-150, 2007.

KIM, T. H.; LEE, S. Y.; CHO, N. K.; SEONG, H. K.; CHOI, H. J.; JUNG, S. W.; LEE, S. K. Dielectrophoretic alignment of gallium nitride nanowires (GaN NWs) for use in device applications. **Nanotechnology**, United Kingdom, v. 17, n. 14, p. 3394-3399, 2006.

KLEIN, J. D.; HERRICK, R. D.; PALMER, D.; SAILOR, M. J.; BRUMLIK, C. J.; MARTIN, C. R. Electrochemical Fabrication of Cadmium Chalcogenide Microdiode Arrays. **Chemistry of Materials**, Troy-New York, v. 5, p. 902-904, 1993.

LAKSHMI, B. B.; DORHOUT, P. K.; MARTIN, C. R. Sol-Gel Template synthesis of semiconductor nanostructures. **Chem. Mater.**, Troy-New York, v. 9, n.3, p. 857-862, 1997.

LAOCHAROENSUK, R.; BULBARELLO, A.; HOCEVAR, S. B.; MANNINO, S.; OGOREVC, B.; WANG, J. On-Demand Protection of Electrochemical Sensors Based on Adaptive Nanowires. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 129, n. 25, p. 7774-7775, 2007.

LAOCHAROENSUK R.; SATTAYASAMITSATHIT, S.; BURDICK, J.; JANATHARANA, P.; THAVARUNGKUL, P.; WANG, J. Shape-tailored porous gold nanowires: from nano barbells to nano step-cones. **ACS Nano**, v. 1, p.403- 408, 2007.

LEI, Y.; CHIM, W. K. Shape and Size Control of Regularly Arrayed Nanodots Fabricated Using Ultrathin Alumina Masks. **Chem. Mater.**, Troy-New York, v. 17, n. 3, p. 580-585, 2005.

LI, W. J.;YUAN, R.; CHAI, Y. Q.; ZHONG, H. A.; WANG, Y. Study of the biosensor based on platinum nanoparticles supported on carbon nanotubes and sugar-lectin biospecific interactions for the determination of glucose. **Electrochimical Acta**. v. 56, p. 4203, 2011.

LI, L.; YANG, Y. W.; LI, G. H.; ZHANG, L. D. Conversion of a Bi nanowire array to an array of Bi-Bi₂O₃ core-shell nanowires and Bi₂O₃ nanotubes. **Small**, Weinheim, v. 2, n. 4, p. 548-553, 2006.

LI, S. F. Y.; MARK, S. S.; KRICKA, L. J. Polymeric Nanotubes and Nanorods for Biomedical Applications. **Current Nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 182-188, 2009.

LI, J. P.; WEI, X. P.; YUAN, Y. H. Synthesis of magnetic nanoparticles composed by Prussian blue and glucose oxidase for preparing highly sensitive and selective glucose biosensor. **Sensors and Actuators B**, v. 139, p. 400-406, 2009.

LIN, J. H.; HE, C. Y.; ZHAO, Y.; ZHANG, S. S. One-step synthesis of silver nanoparticles/carbon nanotubes/ chitosan film and its application in glucose biosensor. **Sensors and Actuators: B**, v. 137, p. 768, 2009.

LIU, G.; WANG, J.; LIN, Y.; WANG, J. Nanoparticle-based biosensors and Bioassays. **Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications**, p. 441-459, 2008.

LU, L. M.; ZHANG, L.; QU, F.; LU, H.; ZHANG, X.; WU, Z.; HUAN, S.; WANG, Q.; SHEN, G.; YU, R. A nano-Ni based ultrasensitive nonenzymatic electrochemical sensor for glucose: enhancing sensitivity through a nanowire array strategy. **Biosensors and Bioelectronic**. v. 25, p. 218-223, 2009.

LOAIZA, O. A.; LAOCHAROENSUK, R.; BURDICK, J.; RODRIGUEZ, M. C.; PINGARRON, J. M.; PEDRERO, M.; WANG, J. Adaptive Orientation of Multifunctional Nanowires for Magnetic Control of Bioelectrocatalytic Processes. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 9, p. 1508-1511, 2007.

LU, Y. S.; YANG, M. H.; QU, F. L.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. Amperometric Biosensors Based on Platinum Nanowires. **Analytical Letters**, v. 40, n. 5, p. 875-886, 2007.

LUI, R.; LEE, S. B. MnO₂/Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Coaxial Nanowires by One-Step Coelectrodeposition for Electrochemical Energy Storage. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 130, n. 10, p. 2942-2943, 2008.

LUO, X. L.; PEDROSA, V. A.; WANG, J. Enzymatic nanolithography of polyaniline nanopatterns by using peroxidase-modified atomic force microscopy tips. **Chemistry- A European Journal**, Weinheim-Germany, v. 15, n. 21, p. 5191-5194, 2009.

MA, R.; SASAKI, T. Nanosheets of Oxides and Hydroxides: Ultimate 2D Charge-Bearing Functional Crystallites. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 22, n. 45, p. 5082-5104, 2010.

MADANI, A.; ENTEZAR, S. R. Optical properties of one-dimensional photonic crystals containing graphene sheets. **Physica B**, v. 431, p. 1-5, 2013.

MARTIN, C. R. Nanomaterials: A membrane-based synthetic approach. **Science**, New York Avenue-Washington, v. 266, p. 1961-1966, 1994.

MARTIN, C. R. Membrane-Based Synthesis of Nanomaterials. **Chemistry of Materials**, Troy-New York, v. 8, p. 1739-1746, 1996.

MAZEIKOA, V.; MINKSTIMIENEA, A. K.; RAMANAVICIENEA, A.; BALEVICIUSB, Z.; RAMANAVICIUSA, A. Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 189, p. 187-193, 2013.

MARIN, C. M.; WANG, L.; BREWER, J. R.; MEI, W. N.; CHEUNG, C. L. Crystalline a-Sm₂S₃ nanowires: Structure and optical properties of an unusual intrinsically degenerate semiconductor. **Journal of Alloys and Compounds**, V. 563, p. 293–299, 2013.

MBINDYO, J. K. N.; MALLOUK, T. E.; MATTZELA, J. B.; KRATOCHVILOVA, I.; RAZAVI, B.; JACKSON, T. N.; MAYER, T. S. Template synthesis of metal nanowires containing monolayer molecular junctions. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 124, n. 15, p. 4020-4026, 2002.

MENON, V. P.; MARTIN, C. R. Fabrication and Evaluation of Nanoelectrode Ensembles. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 1920-1928, 1995.

MURPHY, C. J. Biosensors: Plasmons spring into action. **Nature Materials**, v. 6, p. 259-260, 2007.

NEWMAN, J.D.; TURNER, A.P.F. Home blood biosensors: a commercial perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, V.20 p. 2435-53, 2005.

NI, H.; LI, X. D.; GAO, H. S.; NGUYEN, T. P. Nanoscale structural and mechanical characterization of bamboo-like polymer/silicon nanocomposite films. **Nanotechnology**, United Kingdom, v. 16, n. 9, p. 1746-1753, 2005.

NORRIS, D. J.; VLASOV, Y. A. Chemical Approaches to Three-Dimensional semiconductor Photonic Crystals. **Advanced Materials**, Weinheim-Germany, v. 13, n.6, p. 371-376, 2001.

PACE, C. N.; GRIMSLEY, G. R.; SCHOLTZ, J. M. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 20, p. 13285-13289, 2009.

PENA, D. J.; MBINDYO, J. K. N.; CARADO, A. J.; MALLOUK, T. E.; KEATING, C. D.; RAZAVI, B.; MAYER, T. S. Template Growth of Photoconductive Metal-CdSe-Metal Nanowires. **Journal Phys. Chem. B**, v. 106, n. 30, p. 7458-7462, 2002.

PEDROSA, V. A.; CAETANO, J.; MACHADO, S. A. S.; FREIRE, R. S.; BERTOTTO, M. Acetylcholinesterase Immobilization on 3-Mercaptopropionic Acid Self Assembled Monolayer for Determination of Pesticides. **Electroanalysis**, v. 19, n. 13, p. 1415-1420, 2007.

PINGARRÓN, J. M.; SEDEÑO, P. Y.; CORTÉS, A. G. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Journal Electrochimica Acta**, V. 53, p. 5848–5866, 2008.

POSSION, G. E. A Method for Forming Very Small Diameter Wires. **Review of Scientific Instruments**, California, v. 41, n. 5, p. 772, 1970.

SAPP, S. A.; MITCHELL, D. T.; MARTIN, C. R. Using Template-Synthesized Micro- and Nanowires as Building Blocks for Self-Assembly of Supramolecular Architectures. **Chem. Mater.** Colorado, v. 11, n. 27, p. 1183-1185, 1999.

SILVESTRINI, M.; FRUK, L.; UGO, P. Functionalized ensembles of nanoelectrodes as affinity biosensors for DNA hybridization detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 40, p. 265-270, 2013.

SUN, J.; KOSEL, J. A Top-Contacted Extraordinary Magnetoresistance Sensor Fabricated With An Unpatterned Semiconductor Epilayer. **IEEE Electron Devices Letters**, v. 34, n. 4, p. 547-549, 2013.

TRAHEY, L.; BECKER, C. R.; STACY, A. M. Electrodeposited Bismuth Telluride Nanowire Arrays with Uniform Growth Fronts. **Nano Letters**, v. 7, n. 8, p. 2535-2539, 2007.

TELES, F. S. R. R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, p. 28-42, 2011.

WANG, J. Biomolecule-Functionalized Nanowires: From Nanosensors to Nanocarriers. **ChemPhysChem**, Weinheim-Germany, v. 10, n. 11, p. 1748-1755, 2009.

WANG, J.; KATZ, E. Digital biosensors with built-in logic for biomedical applications - biosensors based on a biocomputing concept. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 398, p.1591-1603, 2010.

WANG, J.; SCAMPICCHIO, M.; LAOCHAROENSUK, R.; VALENTINI, F.; GARCIA, O. G.; BURDICK, J. Magnetic Tuning of the Electrochemical Reactivity through Controlled Surface Orientation of Catalytic Nanowires. **J, Am. Chem. Soc.**, v. 128, n.14, p. 4562-4563, 2006.

WANG, S.; YU, G. J.; GONG, J. L.; LI, Q. T.; XU, H. J.; ZHU, D. Z.; ZHU, Z. Y. Large-area fabrication of periodic Fe nanorings with controllable aspect ratios in porous alumina templates. **Nanotechnology**, United Kingdom, v. 17, n. 6, p. 1594-1598, 2006.

WILLNER, I.; BARON, R.; WILLNER, B. Integrated nanoparticle–biomolecule systems for biosensing and bioelectronics. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 22, p. 1841-1852, 2007.

WU, J. Y.; TSENG, C. L.; WANG, Y. K.; YU, Y.; LIANG, K.; WU, C. C. Detecting Interleukin-1b Genes Using a N2O Plasma Modified Silicon Nanowire Biosensor. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 5, n.1, p. 12-16, 2013.

YANG, P. D.; ZHAO, D. Y.; MARGOLESE, D. I.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Generalized syntheses of large-pore mesoporous metal oxides with semicrystalline frameworks. **Nature**, Philadelphia-USA, v. 396, p. 152-155, 1998.

YOU, J. M.; JEON, S. A Glassy Carbon Electrode Modified with Glucose Oxidase and MWCNT-Palladium Nanoparticles for the Determination of Glucose. **Electroanalysis**, V. 23, N. 9, p. 2103 – 2108, 2011.

YUAN, Z. H.; ZHOU, W.; DUAN, Y. Q.; BIE, L. A simple approach for large-area fabrication of Ag nanorings. **Nanotechnology**, United Kingdom, v. 19, n. 7, p. 075608, 2008.

VRIES, J. W.; ZHANG, F.; HERRMANN, A. Drug delivery systems based on nucleic acid nanostructures. **Journal of Controlled Release**, v. 172, p. 467-483, 2013.

ZANG, J.; BAO, S. J.; LI, C. M.; BIAN, H.; CUI, X.; BAO, Q.; SUN, C. Q.; GUO, J.; LIAN, K. Well-aligned cone-shaped nanostructure of polypyrrole/RuO₂ and its electrochemical supercapacitor. **J. Physical Chemistry-C**, Sheridan Road Evanston, v. 112, n. 38, p. 14843-14847, 2008.

ZHANG, W. & LI, G. Third-generation biosensors based on the direct electron transfer of proteins. **Anal. Sc.**, 20, p. 603-9, 2004.

ZHANG, H.; MENG, Z.; WANG, Q.; ZHENG, J. A novel glucose biosensor based on direct electrochemistry of glucose oxidase incorporated in biomediated gold nanoparticles–carbon nanotubes composite film. **Journal Sensors and Actuators B: Chemical**, V. 158, p. 23– 27, 2011.

ZHANG, Y.; SU, L.; LUBONJA, K.; YU, C.; LIU, Y.; HUO, D.; HOU, C.; LEI, Y. Copper Nanowires-SWCNTs Hybrid Composite for Enhanced Glucose Electrooxidation and Detection in Alkaline Medium. **Science of Advanced Materials**, v. 4, n. 8, p. 825-831, 2012.

ZHANG, Z.; WANG, F.; OU, J.; LIN, H.; DONG, J.; ZOU, H. Preparation of a butyl–silica hybrid monolithic column with a “one-pot” process for bioseparation by capillary liquid chromatography. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 405, p. 2265-2271, 2013.

ZHU, Y.; ZHU, H.; YANG, X.; XU, L.; LI, C. Sensitive Biosensors Based on (Dendrimer Encapsulated Pt Nanoparticles)/Enzyme Multilayers. **Electroanalysis**, v. 19, p. 698, 2007.

ZHU, N. N.; CHANG, Z.; HE, P. G.; FANG, Y.Z. Electrochemically fabricated polyaniline nanowire-modified electrode for voltammetric detection of DNA hybridization. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 3758-3762, 2006.