**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

LEONARDO EIDI OKAMOTO IWAKI

**Influência dos Polieletrólitos na Resposta Eletroquímica de Filmes
Automontados Contendo Nanotubos de Carbono para Aplicação em
Nanomedicina**

**SÃO CARLOS
2011**

LEONARDO EIDI OKAMOTO IWAKI

Influência dos Polieletrólitos na Resposta Eletroquímica de Filmes Automontados Contendo Nanotubos de Carbono para Aplicação em Nanomedicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

SÃO CARLOS
2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Iwaki, Leonardo Eidi Okamoto

197i

Influência dos polieletrólitos na resposta eletroquímica de filmes automontados contendo nanotubos de carbono para aplicação em nanomedicina. / Leonardo Eidi Okamoto Iwaki ; orientador Valtencir Zucolotto. São Carlos, 2011.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento, Caracterização e aplicação de materiais)-- Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2011.

1. Quitosana. 2. Automontagem. 3. Nanotubos de carbono. 4. Nanomedicina. 5. Biossensores. I. Título.

Dedicatória

*Esta dissertação é dedicada em
memória a minha avó Fumi
Okamoto (out1920-jan2011)*

Este exemplar foi revisado e alterado em relação a versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, 05 de Agosto de 2011.

Leonardo Eidi Okamoto Iwaki

Agradecimentos

A minha família, especialmente meus pais Tatu Iwaki e Mituko Okamoto Iwaki e meus familiares Edson, Erika, Yurika e Amara pelo apoio e incentivo em todos os momentos decisivos da minha vida;

Ao meu orientador Prof Dr Valtencir Zucolotto (Xuxa) pela oportunidade, apoio, orientação, confiança e paciência na realização deste trabalho;

Ao Prof Dr Carlos José Leopoldo Constantino e seus alunos Pedro Aoki (Pedrão) e Diego Volpati do FCT-UNESP em Presidente Prudente, pela oportunidade e paciência na realização das medidas de Raman;

Aos técnicos do Grupo de Biofísica Molecular: Bel, Possato, Andressa;

Aos técnicos do Grupo de Polímeros Bernhard Gross: Débora Balogh, Níbio, Bertho e Ademir;

Aos companheiros e amigos do Grupo de Biofísica e Grupo de Polímeros;

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela infraestrutura oferecida;

A CAPES pelo auxílio financeiro;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho;

RESUMO

IWAKI, L.E.O. (2011). **Influência dos Polieletrólitos na Resposta Eletroquímica de Filmes Automontados Contendo Nanotubos de Carbono para Aplicação em Nanomedicina** 103p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Nanotubos de Carbono (Carbon Nanotubes - CNTs) são nanoestruturas de carbono na forma de tubos cilíndricos que apresentam excelentes propriedades ópticas, elétricas, térmicas e mecânicas. A imobilização dos CNTs em conjunto com polieletrólitos condutores e naturais na forma de filmes ultrafinos, utilizando a técnica automontagem, apresenta uma nova alternativa para o desenvolvimento de nanocompósitos aplicados em dispositivos sensores e biossensores. Neste trabalho de mestrado foram construídos e estudados filmes automontados contendo CNTs funcionalizados com grupos ácidos carboxílicos e imobilizados com os polieletrólitos polianilina (PANI) e quitosana (QUIT). Também foram fabricados para comparação filmes de PANI e poliestireno sulfonado (PSS). O crescimento dos filmes de PANI/CNT e PANI/PSS revelou um crescimento linear com o número de bicamadas, conforme mostraram as medidas de espectroscopia UV-Vis e voltametria cíclica (CV), enquanto que para o filme de QUIT/CNT, as medidas de microbalança de cristal de quartzo (QCM) mostraram um crescimento exponencial. Análises de espectroscopias Raman e infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) indicaram alterações nas bandas características dos filmes, comparadas com seus materiais precursores, indicando interação entre os componentes nas multicamadas dos filmes. Análises morfológicas obtidas por AFM mostraram um aumento da rugosidade com o aumento do número de bicamadas. O mapeamento Raman revelou que os filmes contendo CNTs apresentaram maior heterogeneidade química na superfície do que aos filmes somente com polieletrólitos. Foi observada uma queda na resistividade dos filmes, com o aumento do número de bicamadas, sendo esta, mais acentuada com a presença dos CNTs. Os eletrodos contendo os filmes automontados apresentaram alta estabilidade eletroquímica, a presença dos CNTs aumentou a intensidade das correntes de pico e tornou os sistemas mais reversíveis. Os eletrodos que se mostraram mais sensíveis à detecção de peróxido de hidrogênio foram selecionados para imobilização da enzima Glicose Oxidase (GOx). Foram investigados os seguintes sistemas biossensores: (PANI/CNT)₇, (PANI/PSS)₁ e (QUIT/CNT)₅ apresentando na mesma ordem: valores de sensibilidades de 190 nA/mmol.L⁻¹, 36 nA/mmol.L⁻¹ e 220 nA/mmol.L⁻¹; Limite de detecção de 2,2 µmol/L, 67,5 µmol/L e 8,5 µmol/L, e valores de constante de Michealis-Menten(K_m^{app}) de 2,2 µmol/L, 67,5 µmol/L e 8,5 µmol/L. Os resultados indicam que a utilização dos CNTs é bastante promissora para fabricação de dispositivos biossensores para aplicação em Nanomedicina, e além disso, a escolha dos componentes para formação dos nanocompósitos exerce grande influência no desempenho do dispositivo.

Palavras-chave: Automontagem. Nanotubos de carbono. Nanomedicina. Polianilina. Quitosana, Biossensores.

ABSTRACT

IWAKI, L.E.O. (2011). **Influence the Polyelectrolytes on the Electrochemical Response of Layer-by-Layer films containing Carbon Nanotubes for Applications in Nanomedicine**, 103p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Carbon Nanotubes (CNTs) are cylindrical carbon nanostructures exhibiting excellent electrical, thermal, optical and mechanical properties. The immobilization of CNTs in nanostructured thin films in conjunction with polymers using the Layer-by-Layer (LbL) technique provides a new alternative for development of nanocomposites to be used as sensors and biosensors. In this study we report the fabrication of LbL films containing CNTs functionalized with carboxylic acid immobilized in conjunction with polyaniline (PANI) or chitosan (QUIT). Films comprising PANI and sulfonated polystyrene (PSS) were also produced for comparison. Film growth was monitored by UV-Vis spectroscopy, cyclic voltammetry (CV) and quartz crystal microbalance (QCM) and the results showed a linear increase with the number of bilayers in PANI films, and an exponential growth for QUIT/CNT films. FTIR and Raman analyses revealed changes in the bands of nanocomposites compared to their precursor materials, indicating the interactions between the components in the multilayers. Morphological analysis of the films obtained by atomic force microscopy (AFM) showed that the roughness of the films increased with the number of bilayers. Raman mapping showed that the presence of CNTs generated a high heterogeneity in film surface in comparison to a films formed only by polyelectrolytes. Electrical resistivity of the films decrease upon increasing the number of bilayers, especially for CNTs-containing films. Furthermore, electrodes containing LbL films exhibited high electrochemical stability, in which the presence of CNTs increased the intensity of response signal. The electrodes that exhibited best performance toward hydrogen peroxide detection were employed for immobilization of glucose oxidase (GOx) and used as glucose biosensors. The systems (PANI/CNT)₇, (PANI/PSS)₁ and (QUIT/CNT)₅ exhibited a sensitivity of 190 nA/mmol.L⁻¹, 36 nA/mmol.L⁻¹ and 220 nA/mmol.L⁻¹, respectively. The detection limit was estimated at 2.2 mmol/L, 67.5 mmol/L and 8,5 mmol/L, whereas the Michaelis-Menten constant (K_m^{app}) values was found to be 2.2 mmol/L, 67.5 mmol/L and 8.5 mmol/L, respectively, to the three systems employed. The results indicated that the use of CNTs in Layer-by-layer thin films is promising for use as biosensors. Furthermore, we showed that the choice of the polyelectrolyte is a crucial parameter to tailor specific, high performance sensors.

Keywords: Layer-by-Layer. Carbon nanotubes. Nanomedicine. Polyaniline. Chitosan. Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de automontagem (LbL) modificado [17].	26
Figura 2. Estruturas de Carbono: a) folha de grafeno b) Single - Walled Carbon Nanotube (SWCNT) c) Multi - Walled Carbon Nanotube (MWCNT)[55].	31
Figura 3. Diagrama esquemático de como uma folha de grafeno (modelo <i>honeycomb</i>) é enrolada para formar um nanotubo [60].	32
Figura 4. Conformações de um SWCNT. (A) Armchair (B) Zig-zag e (C), Quiral [61].	33
Figura 5. Densidade de estados eletrônicos para SWNTs semicondutores (a) e metálicos (b). Os estados preenchidos (orbitais π) estão localizados abaixo do nível de Fermi e os estados vazios (orbitais π^*) acima do nível de Fermi [60].	33
Figura 6. Funcionalização de nanotubos de carbono: A) funcionalização das regiões com defeitos, B) funcionalização química covalente das paredes, C) funcionalização exohedral(não covalentes) com surfactantes, D) funcionalização exohedral não covalente com polímeros e E) Funcionalização endohedral, (ex. com C60). [68].	36
Figura 7. Defeitos típicos em um SWNT: A) anéis com cinco ou sete carbonos ao invés do anel normal de seis induz curvatura do tubo B) defeitos de hibridização sp^3 (R=H e OH), C) áreas de defeito do tubo funcionalizadas por grupos $-COOH$, obtidas em meio oxidante, e D extremidade aberta do SWNT preenchida por grupos $-COOH$ (é possível a inserção de outros grupos, como NO_2 , OH, H e S) [68].	37
Figura 8. Estrutura química da PANI (forma não dopada) [75].	39
Figura 9. Formas de oxidação da PANI [76].	40
Figura 10. Estrutura química idealizada quitina (a) quitosana (b)[86] e celulose (c)[87].	42
Figura 11. Diagrama mostrando as partes de um biossensor: a) analito e o meio b) elemento biológico c) transdutor d) sinal elétrico.	44
Figura 12. Elementos sensores e biológicos dos biossensores.	44
Figura 13. Espectro UV-Vis da solução PANI pH=4,0.	55
Figura 14. Espectro de absorção do filme LbL de PANI/CNT, crescimento em 640 nm (inset).	56
Figura 15. Espectro de absorção do filme LbL de PANI/PSS, crescimento em 650 nm (inset).	56
Figura 16 quantidade de massa depositada em função do número de bicamadas para o sistema QUIT/CNT obtidas por QCM.	57

Figura 17. Espectros a) FTIR e b) Raman do sistema PANI/CNT ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$).	59
Figura 18. Espectros a) FTIR e b) Raman do sistema PANI/PSS ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$).	62
Figura 19. Espectros a) FTIR e b) Espectros Raman do sistema QUIT/CNT ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$).	64
Figura 20. Mapeamento Raman (PANI/CNT) ₅ na linha de 100 μm (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).	66
Figura 21. Mapeamento Raman (PANI/PSS) ₅ na linha de 100 μm (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).	67
Figura 22. Mapeamento Raman (QUIT/CNT) ₅ na linha de 100 μm (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).	68
Figura 23. Imagens de AFM de 1, 3 e 5 bicamadas dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT.	69
Figura 24. Imagens de TEM PANI/CNT escala 100nm a) 50nm b). <i>inset</i> : nanopartículas de PANI escala 100nm.	71
Figura 25. Histograma com a contagem de 100 nanopartículas de PANI.	72
Figura 26. Imagens TEM filmes <i>cast</i> QUIT/CNT, escala 500 nm a) 100 nm b).	72
Figura 27. Curvas I x V dos filmes automontados PANI/CNT a) PANI/PSS b) e QUIT/CNT c) , Variação da Resistência por bicamada nos filmes d).	73
Figura 28. Perfil Voltamétrico indicando efeito da adição de CNTs para PANI a) e QUIT b), filmes com 5bicamadas solução PBS pH 7,4 velocidade de varredura 100 mV/s.	74
Figura 29. Estabilidade dos eletrodos (PANI/CNT) ₅ a) (PANI/PSS) ₅ b) e (QUIT/CNT) ₅ , voltamogramas com 20 ciclos, velocidade de varredura 100 mV/s, eletrólito, tampão PBS pH=7,4.	76
Figura 30. Voltamograma eletrodos (PANI/CNT) ₅ a) (PANI/PSS) ₅ em diferentes velocidades de varredura, no <i>Inset</i> pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura , eletrólito PBS 0,15mol/L pH 7,4	76
Figura 31. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (PANI/CNT) ₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H ₂ SO ₄ 0,1 mol/L. <i>Inset</i> : correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	78
Figura 32. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (PANI/PSS) ₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H ₂ SO ₄ 0,1mol/L. <i>Inset</i> : correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.	78

Figura 33. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (QUIT/CNT) ₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H ₂ SO ₄ 0,1mol/L. <i>Inset</i> : correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.....	79
Figura 34. Voltametria Cíclica dos eletrodos (PANI/CNT) ₅ para diferentes números de bicamadas no <i>Inset</i> : pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura , eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,4.	81
Figura 35. Voltamogramas Cíclicos dos eletrodos (PANI/PSS) ₅ em diferentes velocidades de varredura, no <i>Inset</i> : pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura , eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,4	81
Figura 36. Cronoamperogramas com variação no potencial de 01 V - 0,7 V na presença de 1 mmol/L peróxido de hidrogênio, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0.	82
Figura 37. Curvas analíticas com peróxido de hidrogênio com diferentes números de bicamadas dos sistemas PANI/CNT a) PANI/PSS b) e QUIT/CNT c) e gráfico sensibilidade em função do número de bicamadas.....	83
Figura 38. Cronoamperogramas biossensor (PANI/CNT) ₇ , <i>inset</i> curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.....	86
Figura 39. Cronoamperograma biossensor (PANI/PSS) ₁ , <i>inset</i> curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.....	86
Figura 40. Cronoamperogramas biossensor (QUIT/CNT) ₅ , <i>inset</i> curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.....	87
Figura 41. Curvas de Lineweaver-burk para os sistemas (PANI/CNT) ₇ a) (PANI/PSS) ₁ b) e (QUIT/CNT) ₅ c).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Síntese e Comparação dos principais métodos de obtenção de CNTs [65].....34

Tabela 2. Valores de Rugosidade Rms (nm) dos filmes automontados por bicamada..... 70

LISTA DE ABREVIACÕES

AFM	<i>Atomic Force microscopy</i>
CNTs	Nanotubos de Carbono (<i>Carbon nanotubes</i>)
CV	Voltametria Cíclica
CVD	<i>Chemical vapor deposition</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GlcNAc	Glicoacetamido
GLcN	Glicosamina
GOx	Glicose Oxidase
ITO	<i>Índium tin Oxide</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K_m^{app}	Constante de Michaelis-Menten aparente
LB	<i>Langmuir-Blodget</i>
LbL	<i>Layer-by-Layer</i>
MET	<i>Microscopia de Transmissão Eletronica</i>
MWCNT	<i>Multi walled carbon nanotube</i>
PAA	poli(ácidoacrilíco)
PAH	poli(alilamina hidrociorada)
PAAm	poliacrilamida
PANI	Polianilina
PEO	poli(óxido de etileno)
PVA	poli(vinil álcool)
PVI	poli(vinilimidazol)
PVP	poli(vinil pirrolidona)
PSS	poli(estireno sulfonado)
QUIT	Quitosana

SAM	<i>Self Assembly Monolayer</i>
SAX	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SWCNT	<i>Single walled carbono nanotube</i>
QCM	<i>Quartz Cristal microbalance</i>
UV-Vis	Espectroscopia Ultravioleta-Visível

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Filmes Automontados.....	25
2.1.1 Filmes automontados em biossensores.....	29
2.2 Nanotubos de Carbono.....	30
2.2.1 Síntese e Purificação de nanotubos de carbono.....	34
2.2.2 Funcionalização dos Nanotubos de Carbono.....	35
2.3 Polímeros Condutores.....	38
2.3.1 Polianilina.....	38
2.4 Quitosana	40
2.5 Biossensores	43
3 OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Síntese Química da Polianilina (PANI)	49
4.2. Fabricação dos filmes automontados.....	50
4.2.1 Substratos	50
4.2.2 Preparação dos filmes automontados	50
4.3. Caracterização dos filmes automontados	51
4.3.1 Espectroscopia UV-Vis	51
4.3.2 Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	51
4.3.3 Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
4.3.4 micro-Espectroscopia e Mapeamento micro-Raman.....	53
4.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)	53
4.3.6 Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET).....	54
4.3.7 Caracterização Elétrica DC	54
4.3.8 Voltametria Cíclica e Cronoamperometria.....	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1 Espectroscopia UV-Vis	55
5.2 Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	57
5.3 Espectroscopia FTIR e Raman	58

5.4 Mapeamento Raman	64
5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	69
5.6 Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)	71
5.7 Medidas Elétricas <i>dc</i>	73
5.8 Medidas Eletroquímicas.....	74
5.8.1 Efeito da Adição dos CNTs nos Filmes Automontados.....	74
5.8.2 Estabilidade e Efeito da Velocidade de Varredura	75
5.8.3 Cinética e Mecanismos de Transferência de Carga	77
5.8.4 Monitoramento do Aumento do Número de Bicamadas dos filmes por CV	80
5.8.5 Resposta Eletroquímica à Oxidação do Peróxido de Hidrogênio	82
5.8.6 Influência do Número de Bicamadas na Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio.....	83
5.8.7 Estudo do Biossensor de Glicose	85
6 CONCLUSÕES	91
7 PERSPECTIVAS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	93
REFERÊNCIAS	95

1 Introdução

A nanociência e a nanotecnologia, introduzidas na metade do século XX, são duas novas e promissoras áreas de pesquisa e desenvolvimento de materiais. Utilizando como ferramenta principal a manipulação da matéria em escala molecular e supramolecular[1], estes novos campos de pesquisa estudam e analisam materiais e sistemas com tamanho compreendido entre 0,1 e 100 nm, organizados de acordo com suas principais dimensões (0D,1D e 2D) [2]. A importância nos sistemas nanoestruturados não está relacionada somente ao tamanho ou à geometria dos sistemas formados, mas sim nas exclusivas propriedades que eles adquirem quando estão nesta escala. Fenômenos quânticos superficiais e supramoleculares que até antes não eram perceptíveis devido ao tamanho macroscópico, agora se tornam mais predominantes. Estes efeitos intrínsecos são os principais responsáveis pelas novas características físicas, químicas e biológicas exibidas por estes novos materiais [2, 3]. O avanço e as inovações prometidas pela nanociência e nanotecnologia advêm das novas e exclusivas propriedades obtidas pelos materiais e da forma como eles podem ser manipulados, o que impulsiona a pesquisa por novos nanomateriais e a sua utilização na obtenção de dispositivos com novas funcionalidades e maior eficiência[2].

Sendo um campo extremamente vasto em pesquisa, um dos desafios da nanociência e nanotecnologia atualmente, é projetar e organizar espacialmente a nível molecular, os mais diversos tipos de nanomateriais ou moléculas. O comportamento macroscópico nestes sistemas é regido pelas combinações das propriedades individuais dos nanoblocos de construção e da interação entre seus componentes. Devido a elevada complexidade e grande número destas interações, a tarefa de prever com exatidão estas propriedades se torna cada vez mais difícil, o que impede explorar de forma satisfatória todo potencial dos materiais nanoestruturados. Além disso, o alto controle da arquitetura a nível molecular exige o desenvolvimento de novas metodologias e técnicas de manipulação dos nanomateriais, além da necessidade de equipamentos cada vez mais precisos. Esses requisitos são essenciais para entender melhor o funcionamento da arquitetura molecular a assim possibilitar a construção de dispositivos mais complexos e eficientes[2, 3].

Neste contexto, a utilização de filmes finos em multicamadas torna-se um dos métodos mais promissores para estudar e construir dispositivos nanoestruturados. Das várias técnicas existentes[4-7], a automontagem ou *Layer-by-Layer* (LbL)[8-10] se destaca como uma das formas mais eficientes de obtenção de filmes finos com grande controle da espessura e da arquitetura molecular. A automontagem permite construir filmes ultrafinos em multicamadas com elevada organização estrutural tendo como grande vantagem a simplicidade experimental e o baixo custo na sua execução. A técnica também é bastante flexível, pois possibilita que uma ampla variedade de materiais (orgânicos, inorgânicos e biológicos) possam ser utilizados na forma de blocos de construção para cada camada. A deposição das camadas se baseia na adsorção alternada de espécies de cargas opostas via interações eletrostáticas, possibilitando modular a arquitetura do filme pela livre escolha na composição das camadas, obtendo-se multicamadas variadas. Além disso, a fabricação de filmes com espessura nanométrica pode promover e potencializar interações supramoleculares entre as camadas, obtendo-se efeitos que não seriam vistos em filmes mais espessos contendo os mesmos constituintes[8-10].

Descobertos em 1991, nanotubos de carbono (CNTs, do inglês, *carbon nanotubes*), se tornaram um dos nanomateriais mais promissores na área de nanotecnologia[11]. As excelentes propriedades ópticas, elétricas, térmicas e mecânicas exibidas por estes materiais demonstram o grande interesse na sua utilização devido ao seu grande potencial em diversas aplicações[11, 12]. A possibilidade de se realizar modificações químicas na sua superfície permitiu superar os problemas de baixa solubilidade, facilitando a sua manipulação. Tal fato permitiu sua utilização em conjunto com muitos outros materiais (polímeros, metais, cerâmicas, moléculas orgânicas e biológicas), diversificando e ampliando o número de aplicações. Esta alta versatilidade torna os CNTs excelentes materiais para serem utilizados em nanocompósitos na forma de filmes finos. Dessa maneira, podem-se integrar as propriedades dos CNTs em filmes com multicamadas ultrafinas, proporcionando uma elevada interação entre os materiais, tornando estes filmes adequados para serem utilizados em dispositivos sensores e biossensores. Além disso, parâmetros de espessura e arquitetura do filme podem ser utilizados para se obter uma alta sensibilidade, ao mesmo tempo em que moléculas biológicas podem ser facilmente integradas ao filme aumentando a especificidade com o analito. As possibilidades de “multiarquitetura” ainda incluem a inserção de polímeros

condutores e polímeros biocompatíveis como forma de aumentar a eficiência dos dispositivos.

Neste trabalho, nanotubos de carbono de parede simples funcionalizados com grupos ácidos carboxílicos foram imobilizados em conjunto com os polieletrólitos polianilina (PANI) e quitosana (QUIT), utilizando a técnica de automontagem. Para comparação, filmes automontados de PANI ou quitosana que não continham CNTs foram preparados, utilizando-se poliestireno sulfônico (PSS) como poliânion. Os estudos das propriedades físico-químicas dos filmes foram realizados através de técnicas espectroscópicas, elétricas, morfológicas e eletroquímicas. A partir disto, estes sistemas foram utilizados em biossensoriamento para detecção de glicose através da imobilização da enzima glicose oxidase (GOx).

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Filmes Automontados

A automontagem, (do inglês, *Layer-by-Layer - LbL*) é uma técnica de fabricação de filmes ultrafinos em multicamadas através do uso de interações eletrostáticas com a formação de estruturas supramoleculares. O processo, como o próprio nome sugere, reorganiza espontaneamente os componentes de um sistema desordenado, reestruturando-o sem qualquer intervenção ou auxílio, de forma termodinamicamente favorável. Historicamente, a primeira concepção da automontagem foi reportada por Iler[13] em 1966, onde filmes eram fabricados partir da deposição de partículas coloidais de cargas opostas. Apesar do imenso potencial destes colóides carregados e a possibilidade de se utilizar vários outros materiais, este trabalho não despertou atenção do público.

Foi então que a partir do início da década de 80, através dos trabalhos de Sagiv *et al.*[14, 15], com a obtenção dos primeiros filmes em multicamadas, deu-se o início da expressão automontagem, ou *self-assembly*. Nesse método, chamado de quimissorção, as multicamadas eram obtidas através de reações químicas em moléculas bifuncionais com a formação de ligações covalentes. Apesar de ser muito utilizado no início, foi considerado limitado devido a obrigatoriedade de se utilizar moléculas com grupos funcionais específicos.

Na tentativa de superar estas limitações, Decher e Lvov *et al.* [14-16], na década de 90, retomaram o uso da técnica de automontagem proposta por Iler, reformulando-a. A nova metodologia se baseou na adsorção física de materiais com cargas opostas por meio de interações eletrostáticas. O novo método permitiu superar as limitações do método utilizado por Sagiv, permitindo que quaisquer materiais com cargas de sinais opostos fossem imobilizados na forma de filmes. Além disso, a nova técnica estendeu o uso da técnica de automontagem, pois permitiu ampliar a gama de materiais utilizados. Esta versão modificada da automontagem foi designada como ELbL (do inglês, *electrostatic Layer-by-Layer*) ou simplesmente LbL.

A preparação de filmes poliméricos por automontagem para filmes poliméricos é relativamente simples, sem uso de procedimentos ou instrumentos sofisticados. Detalhes

do processo de automontagem são mostrados na figura 1. No processo, geralmente são empregados substratos como vidro, sílica, mica, entre outros, previamente preparados de modo que adquiram carga superficial não neutra. A deposição da primeira camada é realizada pela imersão o substrato na solução do poliíon de carga oposta (etapa 1). Depois de deixado tempo suficiente para adsorção, o substrato é então colocado na solução de lavagem, de onde é retirado o excesso de material não adsorvido (etapa 2). Durante o processo, a adsorção da camada de poliíon cria uma supercompensação da carga superficial. Desse modo, o sinal da carga líquida na superfície é inverso, e a subsequente deposição de outro poliíon de carga oposta torna-se possível, formando uma bicamada (etapa 3). A posterior lavagem (etapa 4) e a repetição de todo processo torna possível a deposição de outra bicamada. Dessa forma obtém-se a montagem de filmes finos multicamadas com o número desejado de bicamadas.

Figura 1. Etapas do processo de automontagem (LbL) modificado [17].

Comparado com outras técnicas de produção de filmes finos, como Langmuir-Blodgett (LB) [18] e Self Assembly Monolayers (SAM) [19, 20], a técnica de automontagem apresenta vantagens: 1) por ser extremamente barata, pois não necessita de equipamentos sofisticados para ser realizada; 2) O processo de fabricação é simples e pode ser feito manualmente; 3) Pode ser utilizado a princípio, em substratos de diferentes formas e tamanhos, com o número desejado de camadas; 4) Pode utilizar diversos materiais para diferentes aplicações. Dentre os materiais aplicados estão incluídos polieletrólitos convencionais ou funcionalizados. Mais recentemente, a técnica se

mostrou também promissora na utilização de biomateriais hidrossolúveis, como proteínas[21], enzimas[22-25], DNA[17, 26] e vírus[27, 28] com superfícies carregadas. Também há destaque na possibilidade do uso de inúmeros materiais inorgânicos carregados, como nanopartículas coloidais[29, 30], argilas[31, 32], nanotubos de carbono[33, 34] e complexos organo-metálicos[35].

Além da grande variedade de materiais empregados, características estruturais como a espessura e o ordenamento do filme podem variar, dependendo das condições de deposição. Deste modo, parâmetros como tempo de imersão, temperatura, tipo de polímero, peso molecular, concentração do polímero, pH e força iônica podem ser utilizados para regular as propriedades dos filmes de forma desejada.

A pesquisa com os filmes automontados avançou ainda mais quando outros tipos de interações, além da eletrostática puderam ser explorados na formação dos filmes. Desta maneira, a classificação dos filmes automontados se estendeu, dando origem a quatro categorias de filmes distintas, obtidas de acordo com o tipo e a intensidade das interações entre as camadas.

O primeiro tipo de filme automontado a ser estudado foram os filmes contendo polieletrólitos altamente carregados. Estes filmes se caracterizaram por serem estáveis e homogêneos sendo extremamente finos (na ordem de 1 nm de espessura). Isto ocorre porque a alta concentração de cargas nos polieletrólitos, além de aumentar o grau de atração entre as camadas, também cria repulsões intracadeias forçando sua deposição em filme, adotando uma conformação mais estendida (*extended random coil*). A natureza predominantemente iônica torna o processo de deposição autolimitado, ou seja, a adsorção cessa quando ocorre o equilíbrio nas forças eletrostáticas. Este mecanismo de compensação de cargas age durante a deposição de uma camada sobre outra de carga oposta, e é o principal responsável pela manutenção da estrutura do filme, bem como a possibilidade de formação de multicamadas. A compensação de cargas em filmes automontados foi comprovada por medidas de potencial *zeta* em filmes de poli(vinilimidazol) (PVI) e poli(ácido acrílico) (PAA)[36]. A formação da estrutura em camadas pôde ser confirmada por medidas de espalhamento de raios-X de baixo ângulo (*small angle X-ray scattering* - SAXS) ou refletividade de nêutrons[37, 38]. O controle da espessura do filme pode ser obtido com a alteração do pH e da força iônica, já que alterações nestes parâmetros podem levar a uma diminuição da repulsão ao longo das

cadeias, fazendo com que a cadeia assuma uma posição menos estendida, levando a um aumento na espessura[39].

O segundo tipo de filme automontado, ocorre quando polieletrólitos parcialmente carregados são empregados. Eles tendem a apresentar espessuras maiores, variando em até duas ordens de grandeza em relação aos polieletrólitos altamente carregados. Apesar da adsorção ainda ocorrer via interações eletrostáticas, estes polieletrólitos se diferenciam dos anteriores, pois apresentam regiões menos carregadas ou com ausência de cargas na cadeia polimérica. Desse modo, enquanto regiões carregadas da cadeia polimérica adsorvem assumindo uma conformação estendida, as regiões não ionizadas se depositam na forma de *loops*, ocupando um volume maior, e consequentemente, aumentando a espessura do filme. Além disso, em virtude dos altos valores de constante ácida (pK_a) dos polieletrólitos parcialmente carregados, o pH do meio exerce grande influência no número de cargas formadas ao longo da cadeia, de modo que este se torna um importante parâmetro no controle da espessura do filme. Park *et al.*[40], demonstraram que a espessura de filmes automontados de polieletrólitos fracos como poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) e ácido poli(acrílico) PAA variaram de 0,25 nm a 8 nm, somente com uma pequena variação no pH.

No terceiro tipo de filme automontado, as forças eletrostáticas não são mais o principal meio para a formação do filme. Neste processo, a adsorção ocorre principalmente pela utilização de ligações secundárias como ligações de hidrogênio, interações de van-der-Waals e interações hidrofóbicas, todas elas podendo ocorrer juntamente com interações eletrostáticas. Os primeiros filmes utilizando ligações secundárias foram relatados por Stockton e Rubner[41], em filmes adsorvidos utilizando-se ligações de hidrogênio. Posteriormente [42], estes autores relataram filmes de PANI adsorvidos com outros polímeros não-iônicos, como poli(vinil pirrolidona) (PVP), poli(vinil álcool) (PVA), poliacrilamida (PAAm) e poli(óxido de etileno) (*poly(ethylene oxide) - PEO*). A adsorção nestes sistemas só foi possível devido à presença de grupos que são capazes de realizar ligações de hidrogênio entre as iminas e aminas presentes nas cadeias da PANI. Estas interações puderam ser comprovadas por meio de medidas de espectroscopia de absorção de infravermelho (FTIR).

O quarto tipo de filme automontado utiliza interações altamente específicas para se adsorver no substrato, com o destaque pela maneira na qual a bicamada é formada.

Apesar desse tipo de adsorção ser pouco encontrado, um exemplo importante é o obtido por Anzai *et al.*, que construíram filmes multicamadas de avidina em conjunto com poliaminas funcionalizadas com biotina[43]. O crescimento das multicamadas só foi possível porque as fortes interações entre a avidina e a biotina superaram as repulsões eletrostáticas mesmo quando ambos estavam positivamente carregados. A espessura destes filmes pode ser regulada com modificações na geometria da poliamina. Em outro trabalho, Shimazaki *et al.* [44] relataram a obtenção de filmes com os polímeros poli[2-(9-carbazol) etil metacrilato] e poli[2-[(3,5-dinitrobenzoi) oxil] etil metacrilato]. Neste caso, a adsorção ocorre por transferência de carga, por meio de grupos laterais que atuam como doadores e receptores de elétrons.

2.1.1 Filmes automontados em biossensores

Como observado anteriormente, a automontagem se mostra uma técnica versátil de modo a permitir a imobilização de uma série de biomateriais hidrossolúveis como proteínas, nucleotídeos, e até mesmo vírus e bactérias. Lvov *et al.*[45] foram pioneiros na imobilização destas moléculas, demonstrando que ela ocorre sem perda da atividade biológica. Também é positivo o fato do processo de automontagem ocorrer em meio aquoso, permitindo ajustar as soluções para serem utilizadas sob condições ótimas de pH e força iônica, minimizando o processo de desnaturação durante o processamento do filme.

Filmes automontados contendo biomoléculas imobilizadas têm forte aplicação como biossensores. Materiais biológicos como enzimas[25, 46, 47], sistemas antígeno-anticorpo[48, 49], peptídeos[50, 51] e nucleotídeos [52] exercem um papel importante nestes dispositivos de sensoriamento, agindo como biorreceptores e atuando de maneira específica sobre o analito, fornecendo desta forma, maior seletividade para o sensor. A técnica de automontagem torna-se uma ferramenta extremamente versátil na construção de biossensores possibilitando combinar materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos na forma de filmes finos obtendo-se propriedades específicas para o sensoriamento. O alto controle da espessura do filme possibilita um melhor ajuste das reações físico-químicas na superfície obtendo-se uma alta sensibilidade e um tempo de resposta mais rápido em

relação a outros tipos de filmes mais espessos. A interação entre as camadas ultrafinas do filme pode proporcionar um efeito sinérgico, possibilitando obter melhores propriedades, ou mesmo propriedades inteiramente novas. Além disso, dispositivos sensores baseados nestes filmes possuem outras vantagens como: i) as inúmeras possibilidades de arquitetura, que podem ser obtidas a partir da combinação de materiais apropriados gerando unidades sensoriais específicas, ii) o fino ajuste na arquitetura das camadas, que permite explorar e diversificar a interação dos componentes do sensor, iii) a pouca quantidade de material necessária para produção dos filmes.

2.2 Nanotubos de Carbono

Nanotubos de carbono (CNTs) são uma forma alotrópica do carbono, como o grafite e o diamante, descobertos em 1991 pelo microscopista eletrônico japonês Sumio Iijima[11], durante um processo de pirólise de grafite, método utilizado para produção de fibras de carbono e fulerenos. Os CNTs formam estruturas cilíndricas tubulares constituídas somente por átomos de carbono. Conceitualmente são construídos a partir de uma folha de grafeno (figura 2a) enrolada, ou uma molécula de fullereno alongada. Este materiais possuem uma elevada razão comprimento/diâmetro (diâmetro na ordem de poucos nanômetros, e comprimento na ordem de micrômetros) conferindo-lhe um caráter unidimensional (1D) [53].

Os dois tipos de nanotubos de carbono mais importantes encontrados são: os nanotubos de parede única (SWCNT – *single-walled carbon nanotubes*) e os nanotubos de paredes múltiplas (MWCNT – *multi-walled carbon nanotubes*), ambos mostrados nas figuras 2b e 2c, respectivamente. O SWCNT possui uma estrutura constituída por um cilindro simples, obtido a partir de uma camada da folha de grafeno, enquanto o MWCNT é constituído de vários cilindros arranjados de forma concêntrica [11, 53].

Figura 2. Estruturas de Carbono: a) folha de grafeno b) Single - Walled Carbon Nanotube (SWCNT) c) Multi - Walled Carbon Nanotube (MWCNT)[55].

Os CNTs possuem ótimas propriedades eletrônicas, óticas, mecânicas e químicas[55], o que despertou grande interesse no estudo destes materiais, promovendo a integração de várias áreas, entre elas, a física, química, ciências dos materiais, biologia e farmacologia. Estas propriedades são resultado da influência direta na geometria cilíndrica dos nanotubos e incluem parâmetros relacionados a dimensionalidade, estrutura e topologia do tubo. Assim, as propriedades dos CNTs sofrem influência direta dos processos de síntese utilizados na sua obtenção[57, 58].

As propriedades físicas e a estrutura dos CNTs podem ser determinadas pela maneira na qual os grafenos se enrolam[53, 57, 59]. Os dois parâmetros estruturais mais relevantes dos nanotubos são: diâmetro (d) e ângulo quiral (θ) (também chamado de quiralidade ou helicidade). A estrutura dos nanotubos pode ser obtida em termos da quiralidade do tubo através do vetor quiral ($\vec{C}_h$), que conecta dois pontos cristalograficamente equivalentes numa rede hexagonal da folha de grafeno. Definido pela relação $\vec{C}_h = n\vec{a}_1 + m\vec{a}_2$, onde n e m são números inteiros e $\vec{a}_1$ e $\vec{a}_2$ são vetores da célula unitária da rede de grafeno, mostrados na figura 3. A partir disto, os parâmetros n e m podem ser obtidos a partir do vetor quiral ($\vec{C}_h$), de modo que três estruturas dos CNTs podem ser obtidas: *armchair*, *zig-zag* e *quiral*. Na conformação *armchair*, duas ligações C-C em lados opostos de cada hexágono estão perpendiculares ao eixo do tubo, enquanto que na conformação *zig-zag* estas ligações estão paralelas ao eixo do tubo. Nas conformações quirais, que são conformações intermediárias entre a *armchair* e a *zigzag*, o

ângulo quiral (θ) varia entre valores menores que 90° e maiores que 0° , um esquema ilustrativo dos vetores e das possíveis conformações é mostrada na figura 4.

O módulo do vetor quiral ($\overrightarrow{C}_h$) mede o comprimento da circunferência de uma seção reta no tubo, de modo que o valor do diâmetro do tubo pode ser obtido em função do parâmetro de rede a e os índices inteiros n e m , através da equação 1.

$$d_t = \frac{|\overrightarrow{C}|}{\pi} = \frac{a\sqrt{n^2 + m^2 + nm}}{\pi} \quad (\text{Equação 1})$$

O ângulo quiral (θ) também pode ser obtido em função dos mesmos parâmetros pela equação 2

$$\theta = \cos^{-1} \left(\frac{n + m}{2\sqrt{n^2 + m^2 + nm}} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

Figura 3. Diagrama esquemático de como uma folha de grafeno (modelo *honeycomb*) é enrolada para formar um nanotubo [60].

Figura 4. Conformações de um SWCNT. (A) Armchair (B) Zig-zag e (C), Quiral [61].

Além de definir sua estrutura, os índices n e m permitem caracterizar as propriedades eletrônicas dos nanotubos. Sendo assim, foi observado que se $n-m$ for múltiplo de 3, o nanotubo é denominado semicondutor de “gap” quase nulo e, se $n-m$ não for múltiplo de 3 o nanotubo é um semicondutor. No caso onde $n=m$ o nanotubo é tido como metálico[53, 57, 59]. A figura 5 mostra a diferença das densidades de estados das estruturas dos CNTs metálicos (5a) e semicondutores (5b) .

Figura 5. Densidade de estados eletrônicos para SWNTs semicondutores (a) e metálicos (b). Os estados preenchidos (orbitais π) estão localizados abaixo do nível de Fermi e os estados vazios (orbitais π^*) acima do nível de Fermi [60].

2.2.1 Síntese e Purificação de nanotubos de carbono

Para a fabricação dos CNTs, são utilizados principalmente três métodos diferentes: Descarga por arco elétrico [62, 63] Ablação por laser [63] e Deposição Química a Vapor(CVD) [64]. Estes processos de obtenção de CNTs são descritos resumidamente na tabela 1.

Para utilização dos CNTs em dispositivos, são requeridos métodos de fabricação que permitam a produção de grande quantidade destes materiais com grande precisão a um baixo custo, permitindo a obtenção de um produto com características estruturais bem definidas. Neste contexto, o método CVD é considerado o método mais próximo do ideal para produzir grandes quantidades de CNTs, pois gera menos estruturas amorfas de carbono e resíduos de partículas metálicas do que em outras técnicas. Além disso, neste método há um alto rendimento, possibilitando também a obtenção de CNTs alinhados de forma ordenada sobre o substrato.

Tabela 1. Síntese e Comparação dos principais métodos de obtenção de CNTs [65].

Método de Síntese	Princípio da Técnica	SWCNTs MWCNTs
Descarga por arco elétrico	Os CNTs são gerados através de uma descarga elétrica entre dois eletrodos a temperaturas > 3000°C. Os nanotubos são formados na presença de catalisadores metálicos (Fe, Co ou Ni).	Ambos
Ablação por laser	O processo sintetiza CNTs através da irradiação de um laser pulsado sobre um bastão de grafite aquecido a 1000°C.	SWCNT
Deposição Química a Vapor (CVD)	A decomposição de hidrocarbonetos gasosos (etileno ou acetileno) fornece carbono para formação dos CNTs. A síntese ocorre num substrato aquecido a alta temperatura (500-1000°C) contendo catalisadores metálicos (Ni, Fe, Co ou Y).	Ambos

Devido ao fato de todas as técnicas apresentarem a formação de subprodutos, e dos CNTs formados ainda apresentarem defeitos ao longo de sua estrutura, geralmente são aplicados métodos de purificação após a síntese para remoção dos resíduos dos catalisadores, do carbono amorfo, e das nanopartículas metálicas formadas [66]. Para a eliminação do carbono amorfo, geralmente são empregados métodos de grafitação ou anelamento. Neste processo amostras de CNTs são aquecidas a altas temperaturas em atmosfera inerte possibilitando remover defeitos estruturais na rede de carbono, além de retirar uma parcela das partículas metálicas. Para a remoção das partículas metálicas não complexadas, geralmente são empregados banhos ácidos de HCl diluído sob sistema de extração Soxhlet. As impurezas metálicas complexadas com partículas carbonáceas são inertes aos tratamentos térmicos e ácidos, sendo este, um dos grandes problemas na síntese dos CNTs.

2.2.2 Funcionalização dos Nanotubos de Carbono

Os CNTs são formados apenas por átomos de carbono, e desta forma apresentam baixa solubilidade em meios aquosos devido a seu caráter altamente hidrofóbico. O fato dos CNTs geralmente estarem dispostos na forma de feixes de tubos unidos por interações de Van der Waals torna difícil dispersá-los, o que também dificulta a sua utilização. A funcionalização dos CNTs veio com o objetivo inicial de aumentar sua solubilidade, permitindo dispersá-los em solventes de interesse, através da modificação física ou química de sua superfície. Sendo uma área recente, vem recebendo um grande destaque por permitir incorporar modificações nas propriedades originais dos nanotubos, obtendo-se mudanças na solubilidade, reatividade, e nas propriedades eletrônicas [67], abrindo dessa forma, novas possibilidades de uso destes materiais.

Os métodos de funcionalização podem ser divididos em dois grandes grupos: não covalentes e covalentes (figura 6). A seguir iremos abordar separadamente estes dois processos de funcionalização.

Funcionalizações não covalentes são baseadas principalmente na utilização de interações supramoleculares do tipo interação de Van der Waals, e interações de empilhamento π ou (π -stacking) entre os CNTs e outros materiais. Este método neutraliza as interações entre os tubos, permitindo sua dispersão. Este tipo de funcionalização física é denominado exohedral, e tem a vantagem de manter intacta a estrutura dos CNTs sem alterar suas propriedades originais [68]. Nesse método, são comumente utilizados surfactantes, peptídeos, polímeros, e ácidos nucleicos[69-72]. Um caso especial, é a funcionalização endohedral que ocorre quando pequenas moléculas como fulerenos ou átomos de baixo peso molecular são inseridos dentro dos nanotubos. A figura 6 mostra as possibilidades de funcionalização não covalente e covalente dos CNTs [67].

Figura 6. Funcionalização de nanotubos de carbono: A) funcionalização das regiões com defeitos, B) funcionalização química covalente das paredes, C) funcionalização exohedral(não covalentes) com surfactantes, D) funcionalização exohedral não covalente com polímeros e E) Funcionalização endohedral, (ex. com C60). [68].

Figura 7. Defeitos típicos em um SWNT: A) anéis com cinco ou sete carbonos ao invés do anel normal de seis induz curvatura do tubo B) defeitos de hibridização sp^3 ($R=H$ e OH), C) áreas de defeito do tubo funcionalizadas por grupos $-COOH$, obtidas em meio oxidante, e D extremidade aberta do SWNT preenchida por grupos $-COOH$ (é possível a inserção de outros grupos, como NO_2 , OH , H e S) [68].

Em funcionalizações covalentes, grupos funcionais são inseridos nas paredes dos CNTs através de reações químicas. Devido à alta estabilidade química na superfície dos CNTs, a maioria das reações deste tipo é realizada em condições muito reativas, geralmente ocorrendo associadas à mudança na hibridização do carbono sp^2 para sp^3 com perda simultânea da conjugação, modificando as propriedades eletrônicas dos CNTs[60, 67]. A vantagem desta funcionalização é que ela também modifica áreas de defeito na estrutura do nanotubo, como buracos na parede e extremidades abertas dos tubos. (figura 7). Além disso, é possível incorporar inúmeros grupos funcionais e até mesmo moléculas inteiras, como complexos organometálicos, nanopartículas, ácidos nucleicos de forma a ampliar as possibilidades de utilização destes materiais[60, 67].

A funcionalização da superfície dos CNTs amplia enormemente sua versatilidade, pois além de facilitar sua processabilidade e obter diferentes propriedades, estas estruturas podem ser utilizadas de forma a facilitar a interação com outros materiais como polímeros, moléculas orgânicas e biológicas, compostos inorgânicos, fármacos, e até vírus e bactérias[60, 67]. A incorporação de grupos funcionais específicos nos CNTs como grupos carboxílicos ($-COO^-$), permite a utilização dos CNTs como blocos de construção aniônicos em filmes automontados, obtendo-se nanocompósitos poliméricos. A construção de dispositivos sensores mais eficientes é favorecida pela compatibilidade de tamanho dos CNTs com moléculas biológicas. Dessa forma, podem-se obter melhores propriedades sensoras por meio da combinação das propriedades de reconhecimento ou catálise das biomoléculas com as propriedades condutoras ou semicondutoras dos CNTs.

2.3 Polímeros Condutores

Polímeros condutores fazem parte de uma classe de polímeros que possuem propriedades elétricas de condução semelhantes aos metais e semicondutores inorgânicos. Descobertos acidentalmente em 1976, quando um dos alunos do professor Shirakawa, numa tentativa de síntese do poliacetileno, utilizou cerca de 1000 vezes mais a quantidade de catalisador requerida na reação, obtendo-se então como produto um filme polimérico negro. Mais tarde em 1977, Shirakawa, McDiarmid e Heeger, ganhadores do prêmio Nobel em Química no ano 2000, conseguiram aumentar a condutividade do filme de poliacetileno em 10^9 vezes através da oxidação com Iodo[73].

Diferentemente dos polímeros convencionais, isolantes por natureza, os polímeros condutores possuem em sua cadeia ligações duplas conjugadas, ou seja, ligações duplas e simples, alternadas. Por uso de agentes oxidantes e redutores, cargas positivas ou negativas são inseridas dentro da cadeia, permitindo o processo de condução. Este processo, também chamado de dopagem, em analogia à dopagem realizada em semicondutores inorgânicos, também é responsável pela formação do íon polimérico, dando o caráter de polieletrólito a esses polímeros [74]. Em virtude dos primeiros polímeros condutores apresentarem altos valores de condutividade, como o poliacetileno, problemas de estabilidade química e térmica e dificuldades no processamento destes materiais levaram a busca por novos tipos de polímeros condutores.

2.3.1 Polianilina

A polianilina [74] é um tipo de polímero condutor obtido a partir da polimerização da anilina e que tem despertado um grande interesse nos últimos anos. A PANI apresenta várias vantagens como alta estabilidade química, boa processabilidade facilidade de síntese e dopagem, baixo custo, propriedades eletrônicas bem definidas, efeito

eletrocromico e condutividade moderadamente alta. Sua estrutura química na forma não dopada pode ser vista na figura 8:

Figura 8. Estrutura química da PANI (forma não dopada) [75].

A síntese da PANI usualmente é realizada por via química ou eletroquímica, obtendo-se um produto na forma de pó ou filme, respectivamente. A via química é realizada pela polimerização da anilina destilada utilizando agentes oxidantes como $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2O_2 , Cr_2O_4 ou KClO_3 em meio reacional ácido. Este método tem a vantagem de produzir uma grande quantidade de material, de modo que as propriedades do produto são altamente dependentes das condições empregadas no processo [76]. A síntese eletroquímica, por outro lado, tem um rendimento mais baixo que a síntese química, mas possibilita um controle melhor das propriedades do produto. Ela é realizada através da oxidação anódica da anilina sobre um eletrodo de trabalho, sem a necessidade de agentes oxidantes [74, 76].

A figura 8 mostra os principais estados de oxidação da PANI, sendo que n representa o grau de polimerização e y o grau de oxidação, que varia de 1, completamente reduzido, até 0 para o polímero completamente oxidado. Diferentes graus de oxidação determinam diferentes formas da PANI, que podem ser vistas na figura 9: leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina, com valores de y iguais a 1; 0,75 ; 0,5 ; 0,25 e 0 respectivamente. A forma base esmeraldina pode reagir com ácidos protônicos (ácidos de Bronsted) resultando na forma condutora da polianilina, (sal de esmeraldina), com a formação de segmentos semiquinônicos (radicais cátions). Nesse caso tem-se a vantagem de se modular reversivelmente as propriedades condutoras da polianilina em reações redox através do uso de sistemas ácido-base[74, 77].

Figura 9. Formas de oxidação da PANI [76].

Devido às qualidades já mencionadas, a PANI encontra aplicações em diversos campos, desde a microeletrônica, baterias, dispositivos fotoiônicos, eletrocromicos e sensores [78-80]. Sendo a PANI um polieletrólito com propriedades de condução elétrica, torna-se um excelente candidato a ser utilizado em biossensores enzimáticos, onde seu caráter polimérico proporciona uma ancoragem mais eficiente para a enzima, além de servir como um eficiente meio condutor na transferência dos elétrons da reação enzimática, permitindo maior eficiência de detecção [81].

2.4 Quitosana

Quitina e Quitosana (QUIT) são dois poliaminossacarídeos naturais, sendo um deles, a quitina, um dos recursos biológicos mais abundantes existentes. A quitina é um dos principais constituintes das conchas de crustáceos e está presente em quantidades menores no exoesqueleto de insetos e nas paredes celulares dos fungos. Tornando os

resíduos produzidos pela indústria pesqueira de frutos do mar numa importante fonte de obtenção desta macromolécula [82, 83]. A quitina é um copolímero linear cuja estrutura primária é formada por um dissacarídeo com unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN), unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (figura 10a). Desempenhando um papel biológico de suporte e defesa nos organismos em que ocorrem, a quitina exerce a mesma função da celulose (figura 10c) nos vegetais, com uma estrutura química semelhante, tendo como principal diferença, o grupo hidroxila (-OH) no carbono 2 do anel de glicopiranosose na celulose e o grupo acetamida (-NHCOCH₃) na quitina [82]. Com a grande predominância de unidades GlcNAc, a quitina possui baixa solubilidade em meios aquosos, dificultando sua utilização de modo que funcionalizações químicas são empregadas como forma de aumentar sua solubilidade.

A quitosana (QUIT) é o principal derivado da quitina [82, 83], sendo um copolímero obtido a partir da reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. Sendo constituído assim como a quitina, por unidades GlcNAc e GlcN, sendo que esta última ocorre em maior quantidade, no mínimo 50-60% (figura 10b). Desta forma, a QUIT pode se solubilizar em meios aquosos moderadamente ácidos (pH < 5,0), e nessa condição exibe o comportamento de polieletrólito catiônico devido à presença de cargas positivas em suas cadeias, resultantes da protonação dos grupos amino das unidades GlcN [84, 85].

É importante notar que quitina e QUIT não são entidades químicas únicas, mas variam em composição, dependendo do tipo e origem do animal e processo de extração e síntese. Devido à diferença na quantidade de unidades GlcNAc e GlcN nas cadeias de quitina e quitosana, esses polímeros apresentam solubilidades muito diferentes, determinando fortemente suas aplicações. Modificações químicas nesta macromolécula também podem ser realizadas pela alta reatividade dos grupos amino e hidroxilas da cadeia, aumentando também sua versatilidade para outras aplicações.

(A) Quitina

(B) Quitosana

(C) Celulose

Figura 10. Estrutura química idealizada quitina (a) quitosana (b)[86] e celulose (c)[87].

A quitina e QUIT são materiais com propriedades biológicas únicas, deste modo apresentando biocompatibilidade, biodegradabilidade, toxicidade quase nula, inércia fisiológica, uma notável afinidade com várias proteínas, hemostático, fungistático, propriedades antitumoral e antiolesterêmico[83, 88]. O fato de QUIT ser um polieletrólito linear com alta densidade de carga positiva e com a capacidade de formar géis e filmes com grande facilidade torna-a um material apropriado para fabricação de filmes automontados [89].

Sua utilização em sensores enzimáticos é interessante devido ao fato da QUIT ser um material hidrofílico de origem natural com grande afinidade por enzimas. Além disso, é um material poroso que promove a difusão do substrato e facilita a imobilização enzimática pela presença de agrupamentos aminas disponíveis para reações químicas via ligações covalentes, através da utilização de agentes reticulantes [90].

2.5 Biossensores

Segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), um “biossensor eletroquímico é um dispositivo integrado capaz de fornecer informações quantitativas ou semi-quantitativas específicas utilizando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que é mantido em contato direto com o elemento de transdução eletroquímica”. Há ainda definições do tipo “um biossensor é um dispositivo de análise que incorpora uma combinação deliberada e íntima de um determinado elemento biológico (que cria um evento de reconhecimento) e um elemento físico (o que transduz o evento de reconhecimento)”. Ainda que não haja uma definição oficial abrangente, de maneira geral, um biossensor pode ser considerado um dispositivo que combina 2 partes: um elemento biológico e um elemento sensor. O elemento biológico reconhece especificamente o analito e o elemento sensor traduz a interação elemento biológico-analito num sinal mensurável. A principal razão para o uso do elemento biológico é que ele pode ser altamente específico ao analito de interesse, evitando interferência direta de outras substâncias na detecção [91, 92]. Desta forma podem ser utilizados como elementos biológicos: antígenos, anticorpos, ácidos nucleicos, enzimas ou até mesmo microrganismos, como bactérias ou fungos. Quanto ao transdutor, este pode ser baseado em sinais eletroquímicos (potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, ou baseados em carga iônica ou efeito de campo), elétricos, ópticos, térmico, acústicos, de massa, íons, entre outros [91,92]. A figura 11 ilustra de forma esquemática as partes de um biossensor.

Figura 11. Diagrama mostrando as partes de um biossensor: a) analito e o meio b) elemento biológico c) transdutor d) sinal elétrico.

Sendo assim, a especificidade e sensibilidade do elemento biológico junto ao analito combinado à versatilidade dos processadores, é que determinam a característica mais importante dos biossensores, que é a sua seletividade, ou seja, a habilidade do sensor em discriminar o analito dentre outras substâncias.

A figura 12 ilustra os diferentes tipos de elementos sensores e biológicos, que podem ser combinados, possibilitando obter inúmeros tipos de biossensores e proporcionando uma vasta gama de aplicações. A combinação destes elementos, no entanto, deve levar em conta as necessidades da aplicação do biossensor, além de certas características desejáveis como a seletividade, a sensibilidade, a estabilidade e a reprodutibilidade, para exercerem da melhor forma possível suas funções.

Figura 12. Elementos sensores e biológicos dos biossensores.

Biossensores eletroquímicos são os tipos mais comuns de biossensores estudados, onde os componentes biológicos são imobilizados na superfície de um eletrodo e a resposta ao analito é obtida na forma de um sinal elétrico. O princípio de funcionamento nesta classe de biossensores é de que em que muitas reações químicas há o envolvimento de íons ou elétrons, ocasionando mudanças nas propriedades elétricas na solução. Estas mudanças, caso detectadas, podem ser utilizadas como parâmetro de detecção. Com isto, podemos classificar estes parâmetros baseados na natureza elétrica da medida, dentre elas: condutimétricas, potenciométricas e amperométricas, a saber:

Condutimétricos – O parâmetro de medida é a condutividade elétrica da solução, quando as reações eletroquímicas produzem/consomem elétrons ou íons ocasionando mudanças na condutividade/resistividade da solução. É uma técnica fácil de ser aplicada e possui uma boa sensibilidade. No entanto é também uma técnica sensível a pequenas mudanças na temperatura sendo necessário um controle contínuo da temperatura do meio[93].

Potenciométricos – Neste tipo de sensor o parâmetro de medida é o potencial de num eletrodo pelo acúmulo de cargas pelo aumento da densidade de cargas na superfície do eletrodo. A medida do potencial ocorre com pouca ou nenhuma adição de corrente elétrica utilizando geralmente dois eletrodos, um referencia e um indicador (sensível a medida). A medida do potencial obtido é descrito pela atividade do analito na amostra seguindo a equação de Nerst (Equação 3).

$$E = E_0 - (RT / nF) \ln a_i \quad (\text{Equação 3})$$

Onde E_0 é o potencial padrão para $a_i = 1 \text{ mol/L}$ (atividade iônica), R é a constante dos gases ($8,3143 \text{ V.coul.deg}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), F é a constante de Faraday ($9687 \text{ coul.eg}^{-1}$), T a temperatura em K, n o número de elétrons envolvidos na reação.

Sensores potenciométricos tem sido muito utilizados em biossensores enzimáticos medindo-se as pequenas variações de pH resultantes de prótons consumidos ou produzido nas reações enzimáticas[93].

Amperométricos - Dentre os sensores eletroquímicos, os biossensores amperométricos são os mais comuns, e se baseiam na medida de corrente em função do tempo, quando o eletrodo é mantido a um potencial constante [93] .

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver um biossensor enzimático utilizando como plataforma filmes automontados de nanotubos de carbono contendo diferentes polieletrólitos;

3.2 Objetivos Específicos

-Fabricar filmes contendo nanotubos de carbono em conjunto com polieletrólitos polianilina e quitosana utilizando a técnica de automontagem;

- Estudar as interações entre os componentes e a morfologia dos filmes para várias bicamadas a fim de avaliar a melhor resposta do sensor;

- Otimizar o número de bicamadas com a melhor resposta sensora a fim de imobilizar a enzima Glicose Oxidase (Gox) e observar a resposta do biossensor;

- Produzir e avaliar biossensores de glicose contendo Gox imobilizadas sobre as plataformas contendo CNTs.

4 Materiais e Métodos

Os reagentes descritos abaixo foram adquiridos comercialmente:

-Poliestireno Sulfonado (PSS) (Sigma-Aldrich)

-Quitosana (QUIT) (Polymar) (GA=14)

-Nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) funcionalizados com ácido carboxílico (-COOH), (Cheaptube);

-Glicose oxidase (GOx), 24 U/mg obtida a partir do fungo *Aspergillus niger*, (Sigma-Aldrich) número G7141-250KU;

- D-Glucose (Sigma-Aldrich);

-Anilina (Sigma-Aldrich);

-Persulfato de amônio ((NH₄)S₂O₈) (Sigma-Aldrich);

A Polianilina (PANI) foi sintetizada por via química, conforme descrito a seguir:

4.1 Síntese Química da Polianilina (PANI)

A síntese química da polianilina foi realizada em três etapas:

Na primeira etapa, purificou-se a anilina por destilação, obtendo-se anilina incolor, em seguida mantida a baixa temperatura e protegida da luz.

Na segunda etapa são preparadas duas soluções, A e B, para realização da reação de polimerização. Na solução A, 11,52 g de persulfato de amônio ((NH₄)S₂O₈) são solubilizados em 200 mL de solução HCl 1 mol/L. Na solução B, 20 mL de anilina destilada foram adicionados a 300 mL de solução HCl 1 mol/L. Ambas soluções são colocadas em banho de gelo até estabilizarem na temperatura de 0 °C. Na etapa de polimerização, a solução A é cuidadosamente adicionada à solução B, mantendo-se agitação magnética constante por duas horas em banho de gelo a temperatura de 0 °C. Após o término da reação de polimerização, o produto obtido é filtrado em funil de Büchner, e lavado com acetona até a obtenção de um filtrado incolor.

Na terceira etapa é realizada a desdopagem: após a lavagem com acetona o produto é colocado em 1 L de solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) 0,1 mol/L e deixado sob agitação magnética por 16 horas. Até o final do período o pH do sistema deverá estar em 10. O produto final é novamente lavado com acetona e seco em estufa a vácuo por 24 horas.

4.2.Fabricação dos filmes automontados

4.2.1 Substratos

Os filmes automontados foram depositados sobre substratos apropriados para cada tipo de medida. Para medidas de espectroscopia no UV-visível foram utilizados lâminas de quartzo e vidro. Para as medidas de espalhamento Raman foram utilizadas lâminas de vidro recobertas com uma metalização de cromo e ouro (Cr/Au). Para as medidas de FTIR por transmissão foram utilizados substratos de silício. As medidas de voltametria e amperometria foram realizadas com substratos de vidro recobertos com óxido de estanho dopado com índio (*indium tin oxide*, ITO). As medidas elétricas foram conduzidas utilizando eletrodos interdigitados com ouro, com espaçamento entre as trilhas de 10 μm . Os substratos de silício, quartzo e vidro foram previamente limpos, imergindo-os inicialmente numa solução 0,2 mol/L de KMnO_4 por 12 horas e em seguida colocados numa solução de peróxido de hidrogênio 10% v/v para oxidação e remoção dos compostos orgânicos na superfície. As lâminas são então lavadas com água ultrapura e secas com nitrogênio.

4.2.2 Preparação dos filmes automontados

Os filmes automontados foram fabricados pela deposição alternada de camadas catiônicas e aniônicas, formando bicamadas. As camadas catiônicas foram constituídas de PANI ou QUIT e as camadas aniônicas de PSS ou CNT, obtendo-se então os seguintes sistemas: (PANI/PSS), (PANI/CNT), (QUIT/CNT). As soluções aquosas de PANI e de PSS foram preparadas com concentração de 0,5 g/L em pH 4,0 corrigidas com HCl. A solução de QUIT foi preparada com concentração de 0,5 g/L em tampão acetato em pH

4,0. A suspensão de CNTs foi preparada e mantida em ultrassom de bancada por 30 minutos, com concentração de 1 g/L e pH 4,0 corrigido com HCl.

O crescimento dos filmes foi realizado utilizando como solução de lavagem os respectivos solventes de cada solução (todos em pH 4,0) mantendo-se assim, o mesmo potencial hidrogeniônico. Os tempos de imersão para cada camada foram de 5 minutos para a PANI, PSS e CNT, e de 10 minutos para a QUIT [94].

4.3.Caracterização dos filmes automontados

4.3.1 Espectroscopia UV-Vis

Espectroscopia UV-Vis foi utilizada para caracterizar e monitorar o crescimento dos filmes automontados através da absorbância em função do número de bicamadas depositadas, ou seja, da quantidade de material depositado a cada camada. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis da marca Hitachi modelo U-2009.

4.3.2 Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) permite medir variações muito pequenas de massa (na ordem de nanogramas), acompanhando a mudança na frequência de ressonância de um disco de cristal de quartzo piezelétrico. Neste disco, que contém uma pequena camada de um fino filme metálico, é acoplado um oscilador, que por sua vez aplica um campo elétrico causando a vibração do cristal, estabilizando numa determinada frequência de ressonância. Quando um material é depositado ou adsorvido sobre a superfície do cristal, a frequência de ressonância tende a diminuir [95]. Como as medidas obtidas pela QCM se referem às variações de frequência, e não de massa, utiliza-se a equação de Sauerbrey (Equação 4) para obter uma relação de massa em função da frequência [96]:

$$\Delta F = \frac{-2\Delta m F^2}{A(\mu\rho)^{1/2}} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde ΔF é a variação da frequência de ressonância, F , a frequência de ressonância fundamental do cristal, Δm , a variação de massa na superfície do eletrodo, μ , o módulo de cisalhamento do cristal, ρ , a densidade do cristal e A , a área geométrica do eletrodo.

Há restrições para o uso desta equação, como a deposição de filmes muito espessos, geralmente cerca de 2% acima da espessura do cristal de quartzo, na qual as frequências induzem a grandes erros na interpretação massa. Além disso, mudanças na tensão mecânica do cristal ou alterações na viscosidade do meio ou do filme, também podem induzir a erros. Assim, para sistemas com estas características são necessários experimentos mais sofisticados envolvendo medidas de impedância eletroacústica, na qual se utiliza um modelo de circuito equivalente para reproduzir todas as características do filme e do meio.

Neste trabalho utilizou-se uma microbalança modelo QCM 200 da SRS com sistema de injeção acoplado, e cristal de quartzo corte AT, cuja frequência de ressonância fundamental é 5 MHz, revestido com um filme de ouro em ambos os lados. As bicamadas foram formadas, injetando as soluções de catiônicas e aniônicas, esperando os respectivos tempos de adsorção. Entre cada deposição a solução de lavagem era injetada dentro do sistema e mantida durante 5 minutos.

4.3.3 Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Análises de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas para caracterizar os materiais utilizados através dos modos de vibração específicos dos grupos químicos funcionais de cada material, além de possibilitar observar possíveis interações nos filmes. Foi utilizado um espectrofotômetro de FTIR Nexus Nicolet 470.

Foram adquiridos os espectros no modo transmitância dos filmes automontados e dos filmes *cast* dos materiais precursores.

4.3.4 micro-Espectroscopia e Mapeamento micro-Raman

As análises de micro-espectroscopia Raman foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Carlos José Leopoldo Constantino, do Departamento de Física, Química e Biologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Unesp (FCT-UNESP), em Presidente Prudente utilizando um espectrômetro micro Raman Renishaw com laser de excitação de 633nm. O espectrômetro é equipado com microscópio óptico Leica que permite focalizar o laser em áreas de $1\mu\text{m}^2$, dessa forma, podendo-se obter espectros de regiões pontuais do filme.

Para as imagens de mapeamento Raman (*mapping*), foram adquiridos vários espectros com resolução 1 espectro/4 μm numa linha de 100 μm do filme, revelando através da sua sobreposição, a composição química e a homogeneidade do filme ao longo da linha.

4.3.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Micrografias de AFM dos filmes automontados foram obtidas com uma, três e cinco bicamadas utilizando microscópio SPM Multimode – Nanoscope III da Digital Instruments, coletadas em modo *tapping* de operação. Obtendo-se dessa forma, valores de rugosidade e morfologia dos filmes.

4.3.6 Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET)

A Microscopia de Transmissão de Elétrons (MET) utiliza feixe de elétrons focalizados sobre a amostra com ajuda de lentes eletromagnéticas. Os elétrons atravessam a amostra, projetando a informação sobre seu volume na forma de uma imagem. O contraste das imagens (claro e escuro) pode ter três origens: i) diferença de espessura, densidade ou coeficiente de absorção de elétrons, relacionadas à seção de choque do espalhamento elástico dos elétrons, ii) difração pela estrutura cristalina e iii) pela modulação eletrônica, tendo comportamento ondulatório quando é refratado pelo material.

As soluções das amostras foram depositadas em uma grade comercial de cobre revestida de carbono, com posterior evaporação do solvente. O equipamento utilizado foi o CM 120 da Philips, pertencente ao Centro de Caracterização de Materiais (CCDM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

4.3.7 Caracterização Elétrica DC

Medidas elétricas DC foram realizadas em filmes depositados sobre eletrodos interdigitados contendo várias bicamadas, e utilizando uma fonte Keithley 2612A. Foram usados eletrodos com trilhas em ouro com espaçamento de 10 μm , e as medidas realizadas aplicando uma tensão de -1.5V a 1.5V, em atmosfera ambiente.

4.3.8 Voltametria Cíclica e Cronoamperometria

Medidas de voltametria cíclica foram realizadas com intuito de caracterizar e estudar as propriedades eletroquímicas dos filmes. Foi utilizando um potenciostato /galvanostato, EG&G PARC modelo M280 acoplado a um microcomputador utilizando célula eletroquímica com eletrodo de Ag/AgCl como referência e eletrodo de Platina (Pt) como contra-eletrodo.

5 Resultados e Discussão

5.1 Espectroscopia UV-Vis

Uma das propriedades mais interessantes da PANI é de alterar com facilidade sua coloração durante o estágio de dopagem. A adição de portadores de carga durante a dopagem modifica a estrutura dos cromóforos da cadeia polimérica, de modo que a espectroscopia UV-Vis pode ser utilizada para caracterizar seu estado de oxidação. A figura 13 mostra o espectro UV-Vis da solução de PANI, empregada na construção dos filmes. Podem ser observadas duas bandas intensas, em 315 nm e 620 nm. A primeira é referente das transições π - π^* dos segmentos benzênicos, a segunda à transferência de carga dos segmentos dos anéis benzênicos para os quinônicos. Estas duas bandas são características da PANI na forma base esmeraldina.

Figura 13. Espectro UV-Vis da solução PANI pH=4,0.

Nas figuras 14 e 15 são mostrados os espectros de absorção UV-Vis dos filmes automontados de várias bicamadas dos sistemas PANI/CNTs e PANI/PSS. No *Inset* de cada figura, estão representadas a absorção máxima em função do número de bicamadas. Pode se observar que em ambos os espectros ocorrem deslocamentos nas bandas comparados com o espectro da solução. A banda de transição π - π^* dos segmentos benzênicos se desloca nos dois casos para 330 nm enquanto a banda referente aos segmentos quinônicos se desloca de 620 nm para valores de 640 nm e 650 nm nos

sistemas PANI/CNT e PANI/PSS, respectivamente. Estes deslocamentos para região do azul do espectro são semelhantes aos encontrados na literatura[97], e são indicativos da interação da PANI com as camadas aniônicas nos filmes automontados.

Figura 14. Espectro de absorção do filme LbL de PANI/CNT, crescimento em 640 nm (inset).

Figura 15. Espectro de absorção do filme LbL de PANI/PSS, crescimento em 650 nm (inset).

As absorbâncias máximas de cada sistema, figuras 14 e 15, mostram que a quantidade de material adsorvida em cada bicamada é constante em ambos os sistemas, pois a intensidade da absorbância aumenta linearmente com o número de bicamadas. Este mesmo comportamento foi comprovado mais adiante, para ambos os sistemas, por meio de medidas eletroquímicas (item 5.8.4).

5.2 Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

A figura 16 mostra a o incremento de massa de CNTs adsorvidos em função do número de bicamadas para o sistema QUIT/CNT, obtidos por QCM. As frequências de ressonância na adsorção das camadas de CNTs foram convertidas em massa, utilizando a equação 1.

Figura 16 quantidade de massa depositada em função do número de bicamadas para o sistema QUIT/CNT obtidas por QCM

A figura 16 mostra que a massa de CNT aumenta de maneira assintótica com o número de bicamadas, diferentemente do crescimento linear observado nos sistemas PANI/CNT e PANI/PSS. Esta deposição é mais acentuada para as primeiras bicamadas, diminuindo progressivamente até estabilizar-se após a quinta bicamada. Nas bicamadas

posteriores, a massa dos CNTs se mantém praticamente inalterada. Este mesmo comportamento foi observado nos trabalhos de Siqueira Jr *et al*, em filmes automontados de dendrímeros e ftalocianinas[98].

5.3 Espectroscopia FTIR e Raman

Os espectros de FTIR e Raman foram organizados de modo que os filmes automontados pudessem ser comparados com os filmes *cast* dos seus materiais precursores, mostrando as interações promovidas pela nanoestruturação. As técnicas FTIR e Raman são técnicas vibracionais que permitem identificar e determinar estruturalmente grupos funcionais, e assim obter informações a respeito da força das ligações químicas, interações intermoleculares, conformação e propriedades eletrônicas. Ambas as técnicas são baseadas em fenômenos físicos distintos e, portanto, funcionam de maneira complementar. As figuras 17, 18 e 19 mostram os espectros FTIR e Raman dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT, respectivamente.

Os espectros FTIR do sistema PANI/CNT (figura 17a), tanto para o filme automontado contendo 30 bicamadas, quanto o filme *cast*, confirmam os resultados da espectroscopia UV-Vis mostrando a presença de bandas características da PANI na forma base esmeraldina. Para o filme PANI *cast* foram identificados bandas de deformação axial no anel quinóide (1594 cm^{-1}) e no anel benzoide (1508 cm^{-1}), deformação C-N axial (1305 cm^{-1}) e angular (1168 cm^{-1}), deformação axial N=Q=N (1146 cm^{-1}), deformação C-H dentro do plano (1113 cm^{-1}) e bandas de deformação axial C-Cl em (614 cm^{-1})[99-101].

Para os CNTs (figura 17a) são observados bandas em 1728 cm^{-1} e 1196 cm^{-1} correspondentes respectivamente, à deformação axial C=O e C-O do agrupamento do ácido carboxílico, e à banda em 1578 cm^{-1} (C=C) correspondente ao modo de vibração fônnon-ativo dos CNTs [102]. Nesta figura também é possível observar que a presença dos CNTs no filme automontado não alterou a posição das bandas em relação à PANI, mas resultou no aparecimento de uma banda em 1728 cm^{-1} associado ao estiramento C=O do ácido carboxílico, confirmando a presença dos CNTs funcionalizados. Verifica-se também que há um aumento na intensidade da banda relativa em 1146 cm^{-1} , associado a

um aumento no grau de oxidação da PANI, provavelmente devido a presença de agrupamentos ácidos nos nanotubos. Outra observação importante é que se verifica um pequeno aumento na intensidade da banda quinóide em relação à banda benzóide, revelando um aumento na quantidade de grupos quinóides, indicando um aumento na dopagem da PANI.

Figura 17. Espectros a) FTIR e b) Raman do sistema PANI/CNT ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$).

A espectroscopia Raman ressonante para o sistema PANI/CNT (figura 17b) corrobora os resultados de FTIR. Utilizando o laser de excitação em 633 nm para a PANI, obtém-se a condição de ressonância dos segmentos quinônicos observando-se somente as bandas características desses segmentos. Desta forma, as principais linhas Raman para o filme *cast* da PANI localizadas em 1594, 1474, 1219 e 1165 cm^{-1} , e correspondem respectivamente, à deformação axial C=C, C=N, C-N e a deformação angular C-H do anel quinônico[99].

Os CNTs[103, 104] (figura 17b), apresentam três bandas características. A primeira numa região de alta frequência em 1594/1573 cm^{-1} (banda G) originada dos modos de vibração tangencial dos carbonos sp^2 na parede dos nanotubos. Uma segunda banda em 1327 cm^{-1} , (banda D), originada dos defeitos na paredes dos CNTs relacionada a presença de carbono amorfo, finalmente a banda RBM (Radial Breathing Mode) na região de baixa frequência em 168 cm^{-1} . Essa banda determina a distribuição dos diâmetros dos CNTs, oferecendo informações a respeito da forma de agrupamento destes, sendo também utilizada como assinatura da presença dos nanotubos, uma vez que esta banda está associada ao modo de vibração radial e, portanto, sua intensidade é proporcional ao diâmetro. A banda G do espectro mostra preferencialmente o perfil de CNTs semicondutores em virtude da diferença na intensidade das bandas G^+ (1594 cm^{-1}) e G^- (1570 cm^{-1}) e ao perfil mais estreito da banda G^- . A razão das intensidades entre as bandas G e D mostra que os CNTs apresentam elevada pureza com pequena quantidade de carbono amorfo presente.

Os espectros Raman dos filmes automontados PANI/CNT (figura 17b) contendo 10 bicamadas mostram as bandas da PANI juntamente com as bandas G, D e RBM dos CNTs, evidenciando a presença de ambos os materiais nos filmes. O aumento na relação entre picos das bandas G (1594/1571 cm^{-1}), e o deslocamento da banda D de 1327 para 1334 cm^{-1} sugere a ocorrência de mudanças nas propriedades de transporte dos elétrons e fônons na parede dos nanotubos, o que indica a interação da PANI com os CNTs. Também é possível observar uma diminuição na intensidade relativa das bandas da PANI em 1474, 1219 e em 1163 cm^{-1} , mostrando que houve interação entre os anéis quinoides e a superfície dos CNTs, provavelmente com formação de interações π -stacking. A banda RBM não aparenta mudanças em relação ao espectro dos filmes *cast* dos CNTs, mantendo a mesma distribuição de diâmetros dos espectros dos filmes *cast* [105].

Para os espectros FTIR do sistema PANI/PSS (figura 18a), além das atribuições das bandas da PANI já apresentadas anteriormente (figura 15a), o espectro do PSS (figura 18a) apresenta bandas em 1010 e 1043 cm^{-1} , atribuídas a deformação simétrica dos grupos $-\text{SO}_3\text{H}$; em 1185 cm^{-1} , pela deformação assimétrica dos grupos $-\text{SO}_3\text{H}$, e em 1127 cm^{-1} atribuída ao deformação ânion sulfônico ligado ao anel aromático[106, 107].

Para o filme automontado de PANI/PSS (figura 18a) contendo 30 bicamadas, pode-se observar a presença de todas as bandas da PANI sem deslocamento significativo na posição. A presença do PSS no filme é confirmada pelo aparecimento de duas bandas em 1010 e 1035 cm^{-1} , atribuídas aos modos de vibração simétrico do grupo sulfônico. Além disso, pode-se observar que esta mesma banda em 1035 cm^{-1} sofre um deslocamento em relação ao filme *cast* PSS (1043 cm^{-1}), demonstrando haver uma forte interação com a PANI, provavelmente através dos grupos quinóides. Também é possível observar um aumento na intensidade relativa na banda em 1143 cm^{-1} associado ao aumento no número de oxidação da PANI.

Figura 18. Espectros a) FTIR e b) Raman do sistema PANI/PSS ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$).

Na figura 18b são mostrados os espectros Raman ressonante para o sistema PANI/PSS. O PSS não possui resposta frente à radiação de excitação em 633 nm. Para o filme automontado com 10 bicamadas, observa-se um deslocamento na banda de deformação axial C-N do anel semi-quinóide de 1325 para 1335 cm^{-1} , demonstrando mais uma vez, a interação dos grupos quinônicos com os agrupamentos sulfônicos do PSS. Isto fica mais evidente quando se observa os aumentos nas intensidades relativas das bandas associadas aos seguimentos quinônicos em 1594, 1335 e em 1165 cm^{-1} .

A figura 19a mostra o espectro FTIR do sistema QUIT/CNT. As principais bandas do filme cast da QUIT são: deformação axial O-H e N-H em 3376 cm^{-1} , deformação axial C-H em 2982 cm^{-1} , deformação angular N-H em 1580 cm^{-1} , deformação angular CH_2/CH_3 em 1422 cm^{-1} , deformação axial C-N (Amida III) em 1310 cm^{-1} e deformação axial C-O em 1045 e 1017 cm^{-1} . A ausência de uma banda em torno de 1650 cm^{-1} típica de grupamentos Amida I da quitina, e a existência de uma banda intensa em 1580 cm^{-1} sugere que a QUIT utilizada possui um alto grau de desacetilação, com o predomínio de grupos amina na cadeia [108-110].

Para os CNTs (figura 17a e 19a) são observados bandas em 1728 cm^{-1} e 1196 cm^{-1} , correspondentes respectivamente, a deformação axial C=O e C-O do agrupamento

ácido carboxílico, e uma banda em 1578 cm^{-1} (C=C) correspondente ao modo fônon-ativo dos CNTs.

O espectro FTIR do filme QUIT/CNT (figura 18a) contendo 30 bicamadas mostra a presença de bandas da QUIT, com o surgimento de uma banda em 1744 cm^{-1} , confirmando a presença dos CNTs. Podem ser observados diversos deslocamentos em todo o espectro, indicando uma forte interação entre a QUIT e os CNTs, sendo os principais: deslocamentos de 3376 para 3400 cm^{-1} , referentes a mudanças nas ligações de hidrogênio intermoleculares C=O--H-N, deslocamento de 1728 para 1744 cm^{-1} da deformação axial C=O dos agrupamentos ácidos dos CNTs, e deslocamento de 1310 para 1368 cm^{-1} , indicando a formação de interações nos grupos acetamida na QUIT. Observa-se ainda a presença de pequenos deslocamentos na região de 1010 a 1080 cm^{-1} , atribuídos as mudanças nas bandas de deformação axial C-O. A interação mais evidente, no entanto é no deslocamento de 1578 para 1621 cm^{-1} , nas aminas da QUIT, devido a ocorrência de interações eletrostáticas com os grupos carboxílicos dos CNTs.

Figura 19. Espectros a) FTIR e b) Espectros Raman do sistema QUIT/CNT ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$).

O espectro Raman ressonante para o sistema QUIT/CNT com 10 bicamadas (figura 19b) mostra somente a presença de bandas características dos CNTs. A QUIT, a exemplo do PSS, não demonstra resposta no laser de excitação Raman ($\lambda_{\text{exc}} = 633 \text{ nm}$). A interação de ambos os materiais nos filmes pode ser observada pelo aumento na intensidade relativa entre os picos da banda G ($1594/1573 \text{ cm}^{-1}$) e a diminuição na intensidade da banda D. A banda RBM não apresenta deslocamentos, indicando que os CNTs estão dispostos da mesma forma que nos filmes *cast*.

5.4 Mapeamento Raman

No mapeamento Raman, ao invés de obter um espectro pontual sob determinada região, vários espectros são coletados (1 espectro a cada $4\mu\text{m}$) na superfície do filme, obtidos focalizando o feixe do laser por uma linha pré-determinada passando sobre a região desejada. Os espectros são então sobrepostos formando uma imagem

tridimensional onde é possível visualizar o perfil químico da amostra em cada ponto sobre a linha.

As figuras 20, 21 e 22 mostram, respectivamente, os mapeamentos Raman obtidos para os sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT, e suas respectivas imagens ópticas, indicando a linha de varredura do laser. Esta linha pode ser utilizada para visualizar através de cores, a intensidade de um pico específico. Neste caso, quanto maior a tendência para o branco, maior a intensidade do sinal. No *inset* de cada figura também são mostrados espectros Raman de diferentes regiões do filme acompanhadas de imagens ópticas (50x) da região analisada. Cabe lembrar que todas as medidas foram realizadas em substratos de vidro recobertos com ouro.

Para o sistema PANI/CNT contendo 5 bicamadas (figura 20), todas as imagens ópticas mostram a formação de um filme heterogêneo, com a presença de duas zonas de agregação distintas, uma em azul e outra mais escura (*inset*). O mapeamento Raman foi realizado inserindo a linha de mapeamento pelas regiões de ambos agregados. A superfície tridimensional formada confirma a heterogeneidade química e morfológica do filme, observada pela variação na intensidade do sinal em 1558 cm^{-1} ao longo da linha. Os espectros Raman dos agregados azuis e escuros (*inset*), mostram a presença de ambos os materiais com a presença das bandas G' (2600 cm^{-1}) e D (1300 cm^{-1}) dos CNTs e das bandas quinóides $C=C$ (1600 cm^{-1}), $C=N$ (1480 cm^{-1}), $C-N$ (1220 cm^{-1}) e $C-H$ (1100 cm^{-1}) da PANI. Conforme esperado, as intensidades relativas em cada agregado mostram o predomínio de bandas da PANI nos agregados azuis e CNTs nos agregados escuros.

Figura 20. Mapeamento Raman (PANI/CNT)₅ na linha de 100 µm (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).

O mapeamento do sistema PANI/PSS contendo 5 bicamadas (figura 21) mostra uma homogeneidade química na região analisada com uma pequena variação na intensidade dos picos dos espectros da imagem tridimensional. Isto pode ser confirmado pelas imagens ópticas e pelos espectros coletados em diferentes regiões do filme (*inset*), onde não se observam mudanças significativas no perfil das bandas da PANI.

Figura 21. Mapeamento Raman (PANI/PSS)₅ na linha de 100 µm (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).

A figura 22 mostra o mapeamento Raman do sistema QUIT/CNT com 5 bicamadas. Pode-se observar pela imagem óptica que o filme QUIT/CNT é bastante heterogêneo, mostrando a presença de agregados escuros. A variação de intensidade na banda de 1581 cm^{-1} na imagem tridimensional Raman confirma as mudanças no perfil químico da superfície dos filmes. Espectros Raman obtidos dentro e fora dos agregados (*inset*) mostram diferenças no perfil das bandas D (133 cm^{-1}), G (1580 cm^{-1}) e G' (2600 cm^{-1}) típicas dos CNTs. No espectro Raman fora dos agregados, observa-se um aumento acentuado na banda D, um alargamento na banda G, e uma diminuição na intensidade da banda G'. Uma vez que a banda D indica a presença de carbono amorfo, o aumento na sua intensidade indica a ocorrência de uma forte interação entre a QUIT e a parede dos CNTs, levando a um aumento na intensidade de vibração dos carbonos amorfos. Mudanças no perfil das bandas G e G' também evidenciam a influência da interação com a QUIT. O espectro dentro dos agregados, por outro lado, apresentam um perfil parecido com os obtidos nos filmes *cast* dos CNTs, indicando que nesta região os nanotubos estão dispostos da mesma maneira, ou seja, exercendo pouca interação com a QUIT.

Figura 22. Mapeamento Raman (QUIT/CNT)₅ na linha de $100 \text{ }\mu\text{m}$ (a) Espectros em diferentes regiões dos filmes (b).

5.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

O crescimento e a formação dos filmes automontados dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT foram estudados por microscopia AFM com área de $2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$, como mostrado na figura 23. A tabela 2 mostra os valores de rugosidade Rms (Rugosidade Média Quadrática) em nanômetros para 1, 3 e 5 bicamadas de cada sistema.

Figura 23. Imagens de AFM de 1, 3 e 5 bicamadas dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT.

As imagens de AFM dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT (figura 23) mostram a formação de estruturas globulares, que tendem a crescer formando aglomerados (locais com intensidade de cor mais clara) na medida em que se aumenta o número de bicamadas. Este efeito é mais pronunciado nos sistemas contendo PANI, onde se observa uma maior quantidade de material adsorvido na superfície do filme.

Tabela 2. Valores de Rugosidade Rms (nm) dos filmes automontados por bicamada.

	1 bicamada	3 bicamadas	5 bicamadas
PANI/CNT	12,5	24,7	25,5
PANI/PSS	9,35	14,6	12,95
QUIT/CNT	8,50	15,8	17,73

Os valores de rugosidade (Rms) em função do número de bicamadas (tabela 2) mostram que os filmes contendo PANI apresentam uma rugosidade muito maior que os filmes com QUIT, mostrando a tendência de formação de aglomerados nestes sistemas. A pouca variação da rugosidade da terceira para quinta bicamada nos sistemas PANI/CNT e QUIT/CNT, indicam que a presença dos CNTs tende a estabilizar o valor da rugosidade, variando pouco com o aumento das bicamadas. No sistema PANI/PSS observa-se uma pequena diminuição da rugosidade na quinta bicamada, o que pode estar relacionado à tendência dos aglomerados crescerem pela deposição subsequente de material, resultando na coalescência e na diminuição da altura entre os vales e picos.

O valor de rugosidade é um importante parâmetro utilizado em sensores, uma vez que um maior valor de rugosidade implica também num aumento na área superficial, de modo a facilitar a ancoragem de biomoléculas e aumenta a interação da superfície com o analito.

5.6 Microscopia de Transmissão Eletrônica (TEM)

Com objetivo de avaliar a morfologia dos filmes com PANI e QUIT, foram obtidas imagens de TEM, dos polieletrólitos na presença dos CNTs depositados na forma de filmes *cast*.

A figura 24 mostra as imagens de TEM obtidas em amostras preparadas a partir de suspensões da PANI e CNT, onde se observa que a PANI assume uma morfologia esférica, distribuída homogeneamente, com poucos aglomerados e envoltos aos filamentos dos CNTs. A figura 24b mostra com mais detalhes dos CNTs em meio as esferas de PANI.

Para verificar se a morfologia apresentada pela PANI teve influência dos CNTs, foi realizada uma imagem da PANI (*inset* figura 24a), mostrando que na solução empregada para a automontagem, a PANI se apresenta na forma de nanopartículas com diâmetros variando de 10 a 45nm, como mostra o histograma da figura 25.

Figura 24. Imagens de TEM PANI/CNT escala 100nm a) 50nm b). *inset*: nanopartículas de PANI escala 100nm.

Figura 25. Histograma com a contagem de 100 nanopartículas de PANI.

As figuras 26a e 26b mostram as imagens de TEM para a suspensão de QUIT e CNT. Nas imagens podemos observar que diferentemente da PANI, a QUIT se apresenta homogeneamente por toda superfície (área clara), evidenciando a sua tendência em formar um filme, enquanto CNTs (áreas escuras) se apresentam espalhados na forma de feixes. A imagem com maior ampliação (figura 26b) mostra que a QUIT recobre totalmente o feixe de CNT, na qual se observa que a QUIT apresenta uma estrutura porosa.

Figura 26. Imagens TEM filmes *cast* QUIT/CNT, escala 500 nm a) 100 nm b).

5.7 Medidas Elétricas *dc*

As figuras 27 a, b e c mostram, respectivamente, as curvas corrente x tensão ($I \times V$) para filmes com várias bicamadas dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT. A curva 27d mostra a variação da resistência em função do número de bicamadas.

Figura 27. Curvas $I \times V$ dos filmes automontados PANI/CNT a) PANI/PSS b) e QUIT/CNT c) , Variação da Resistência por bicamada nos filmes d).

As curvas $I \times V$ mostram que os sistemas contendo CNTs (figuras 27a e 27c), apresentam o comportamento típico de condutores ôhmicos, mostrando uma variação linear da corrente em função da tensão aplicada. Diferentemente do que ocorre com o sistema PANI/PSS (figura 27b), na qual se observa um comportamento não ôhmico, mostrando uma linearidade somente na faixa de tensão de -0,5 V a 0,5 V.

Para todas as curvas $I \times V$ observa-se um aumento gradual da inclinação da curva com o aumento das bicamadas, indicando que a deposição das bicamadas aumenta a condutividade nos eletrodos interdigitados. Isto fica mais evidente quando se observa o

gráfico da resistência em função do número de bicamadas (figura 27d). Para o sistema PANI/PSS verifica-se uma queda na resistência até a terceira bicamada, até $250\text{k}\Omega$, alterando pouco seu valor nas bicamadas subsequentes. Para os sistemas PANI/CNT e QUIT/CNT observa-se um decaimento contínuo da resistência até a sétima bicamada, estabilizando seu valor próximo a $70\ \Omega$. A incorporação dos CNTs tanto na PANI quanto na QUIT, diminuiu a resistência dos filmes em 5 ordens de grandeza, sendo mais pronunciada para o sistema PANI/CNT, do que para o sistema QUIT/CNT como se observa na figura 27d. Estes valores mostram o potencial destes filmes na aplicação de dispositivos eletrônicos.

5.8 Medidas Eletroquímicas

5.8.1 Efeito da Adição dos CNTs nos Filmes Automontados

As figuras 28a e 28b mostram, respectivamente, os voltamogramas cíclicos (CV) dos filmes automontados com cinco bicamadas da PANI e QUIT, contendo como blocos aniônicos, PSS e CNTs. Os voltamogramas foram realizados com velocidade de varredura de 100 mV/s em tampão PBS pH 7.4 como eletrólito de suporte.

Figura 28. Perfil Voltamétrico indicando efeito da adição de CNTs para PANI a) e QUIT b), filmes com 5bicamadas solução PBS pH 7,4 velocidade de varredura 100 mV/s .

A figura 28a mostra os voltamogramas dos filmes de PANI contendo PSS e CNTs. Pode-se observar em ambos os casos um perfil voltamétrico semelhante, com a presença de um par redox bem definido, atribuído a PANI em 0,1 V e 0,01 V. A incorporação dos CNTs junto à PANI aumentou em duas vezes os valores de corrente dos picos catódicos e anódicos em relação ao PSS, o que pode estar relacionado com o aumento do número de sítios redox da PANI ou mesmo com o aumento da área superficial, em virtude da maior rugosidade dos filmes de PANI/CNT, como foi observado anteriormente nas imagens de AFM.

Na figura 28b, pode-se observar a presença de um par redox em 0,01 V e -0,10 V no voltamograma do filme QUIT/CNT, devido a presença dos grupos funcionais contendo oxigênios (grupos ácidos carboxílicos), que sofrem reações redox na superfície dos nanotubos de carbono [111, 112]. O filme de QUIT/PSS, conforme esperado, não mostra atividade redox, nem incremento de corrente, justificando a não utilização desse sistema nas medidas de detecção. Este par redox não é evidente nos eletrodos com PANI, devido a sobreposição do par redox da PANI.

Tanto a PANI quanto para a QUIT apresentaram melhor resposta com a adição dos CNTs, apresentando aumentos na corrente de pico catódica e anódica, sendo excelentes candidatos para serem utilizados como eletrodos modificados. O filme de PANI/PSS, apesar da menor resposta, será utilizado para comparar o efeito da PANI sem a adição dos CNTs.

5.8.2 Estabilidade e Efeito da Velocidade de Varredura

As figuras 29 a, 29b e 29c mostram respectivamente, os voltamogramas dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT, na qual os eletrodos modificados com 5 bicamadas foram submetidos a 20 ciclos com velocidade de varredura de 100 mV/s em tampão PBS, pH=7. Os voltamogramas não apresentaram decaimento da corrente em função do número de ciclos, indicando que os filmes automontados são estáveis e os componentes estão fortemente imobilizados na superfície do eletrodo.

Figura 30. Estabilidade dos eletrodos (PANI/CNT)₅ a) (PANI/PSS)₅ b) e (QUIT/CNT)₅, voltamogramas com 20 ciclos, velocidade de varredura 100 mV/s, eletrólito, tampão PBS pH=7,4.

Quando os eletrodos contendo PANI/CNT e PANI/PSS (figuras 30a e 30b, respectivamente) são submetidos a diferentes velocidades de varredura, pode-se observar que a corrente aumenta linearmente, indicando que a reação na superfície é limitada pela transferência de carga, e não por difusão, como esperado para eletrodos modificados (*inset* figuras 30a e 30b).

Figura 31. Voltamograma eletrodos (PANI/CNT)₅ a) (PANI/PSS)₅ em diferentes velocidades de varredura, no *Inset* pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura, eletrólito PBS 0,15mol/L pH 7,4

5.8.3 Cinética e Mecanismos de Transferência de Carga

Para verificar o comportamento eletroquímico frente a uma espécie eletroativa em solução, os eletrodos de PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT (figuras 31, 32 e 33) contendo 5 bicamadas foram submetidos a varreduras na presença hexacianoferrato de potássio (K_3FeCN_6) na concentração de 5 mmol/L em velocidades de varredura de 25 a 1000 mV/s, utilizando como eletrólito de suporte, ácido sulfúrico 0,1mol/L. Os voltamogramas da figura 31a mostram o perfil voltamétrico característico do par redox $FeCN_6^{3-}/FeCN_6^{4-}$, onde observa-se um aumento na intensidade das correntes de pico catódicas e anódicas variando linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (*inset* de cada figura), mostrando que a transferência de íons da solução até a superfície do eletrodo é limitada pelo transporte difusional de massa.

A participação dos CNTs no processo de transferência de carga pode ser averiguada nos eletrodos de PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT (figuras 31 e 33) onde o perfil voltamétrico do hexacianoferrato se mantém quase inalterado com as correntes catódicas e anódicas mantendo-se lineares, mesmo quando são empregadas altas velocidades de varredura (500 e 1000 mV/s). Diferentemente do eletrodo de PANI/PSS (figura 32), onde a linearidade é mantida quando são empregadas velocidades de até 250 mV/s, acima disto, observa-se que o perfil voltamétrico do hexacianoferrato se altera tornando-se mais largo (aumento na escala da corrente) indicando que a cinética de transferência de carga eletrodo-solução se torna tão lenta que ocorre acúmulo de carga na superfície do eletrodo, com o predomínio de um processo capacitivo.

Figura 32. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (PANI/CNT)₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H₂SO₄ 0,1 mol/L. Inset: correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Figura 33. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (PANI/PSS)₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H₂SO₄ 0,1mol/L. Inset: correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

Figura 34. Voltamogramas Cíclicos do eletrodo (QUIT/CNT)₅ em solução 5 mmol/L de hexacianoferrato de potássio. Eletrólito H₂SO₄ 0,1mol/L. *Inset:* correntes anódica e catódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura.

As medidas de CV em presença de hexacianoferrato de potássio também revelam importantes informações a respeito dos mecanismos nos processos envolvidos na superfície do eletrodo. Por exemplo, a reversibilidade do sistema indica que o sistema eletroquímico tem velocidade suficiente para alcançar o equilíbrio dinâmico de modo que as espécies possam estar prontas para serem oxidadas ou reduzidas. E ela pode ser estimada utilizando parâmetros de diferença de potencial (ΔE) entre o pico catódico e anódico e as correntes de pico I_{pa} e I_{pc} , e comparadas com um sistema reversível ideal ($\Delta E_p = 57 \text{ mV}/n$, onde n é o número de elétrons envolvidos e a razão entre o módulo das correntes I_{pa} e I_{pc} igual a unidade). Nos sistemas em estudo, todos os valores obtidos de ΔE_p foram maiores que 100 mV, assumindo a princípio, características de um sistema quasi-reversível.

Para o sistema PANI/PSS (figura 32), se observa que à medida que a velocidade de varredura aumenta, os voltamogramas inclinam-se em relação ao eixo do potencial, onde percebe-se uma crescente separação entre o pico catódico e anódico, resultando em aumentos nos valores de ΔE_p , indicando uma maior resistência à troca de carga na superfície do filme com uma cinética mais lenta. Nos sistemas contendo CNTs, os perfis dos voltamogramas praticamente não se alteram mesmo sob altas velocidades de

varredura e os aumentos nos valores de ΔE só começam a ser significativos a partir velocidades de varredura acima de 500 mV/s, mostrando que os CNTs atuam aumentando processo de transferência de carga.

Com relação a razão entre as correntes de pico catódica e anódica, os sistemas PANI/PSS e QUIT/CNT apresentaram valores próximos a 1, indicando cinéticas de reações redox com velocidades aproximadamente iguais (dentro do limite da linearidade das correntes). Somente o sistema PANI/CNT (*inset* fig. 31) apresentou uma razão maior que 1, o que indica a ocorrência de uma reação acoplada entre a PANI e os CNTs, fazendo com que os processos redox do hexacianoferrato durante a varredura catódica e anódica ocorram em velocidades diferentes. Os resultados indicam que reversibilidade dos sistemas decai na seguinte ordem: QUIT/CNT > PANI/CNT > PANI/PSS, mostrando que a presença dos CNTs promove uma melhor transferência eletrônica.

5.8.4 Monitoramento do Aumento do Número de Bicamadas dos filmes por CV

O crescimento dos filmes automontados dos sistemas PANI/CNT e PANI/PSS (figuras 34 e 35, respectivamente), também pôde ser acompanhado por medidas de CV. Utilizando um eletrodo de ITO como substrato, observa-se que as correntes anódicas e catódicas aumentam em função do número de bicamadas. Os gráficos em *insets* de cada figura mostram que corrente aumenta linearmente com número de bicamadas, indicando que a massa de PANI depositada em cada bicamada contribui efetivamente para resposta eletroativa do filme, comprovando também os resultados obtidos pelas medidas de crescimento no UV-Vis. Além disso, aqui fica evidente, que a adição dos CNTs, proporciona maiores valores de corrente dos picos anódicos e catódicos da PANI a cada bicamada, indicando um efeito sinérgico da PANI com os CNTs. No filme contendo PANI/PSS (figura 35) é possível observar a condução da PANI entre as camadas isolantes do PSS, mesmo para várias bicamadas. Este fato indica a interação entre ambos materiais tendo um transporte de carga consistindo no salto de elétrons entre as camadas, (*electron hopping mechanism*)[113].

Figura 35. Voltametria Cíclica dos eletrodos $(\text{PANI/CNT})_5$ para diferentes números de bicamadas no *Inset* : pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura , eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,4.

Figura 36. Voltamogramas Cíclicos dos eletrodos $(\text{PANI/PSS})_5$ em diferentes velocidades de varredura, no *Inset*: pico da corrente anódica em função da velocidade de varredura , eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,4

5.8.5 Resposta Eletroquímica à Oxidação do Peróxido de Hidrogênio

Para verificar a influência do potencial de trabalho na resposta catalítica ao peróxido de hidrogênio, eletrodos de ITO e dos sistemas em estudo contendo 5 bicamadas foram submetidos a medidas de cronoamperometria, programando-se uma rampa de potencial (figura 36), no intervalo de 0,0 a 0,7 V, com incrementos de potencial de 0,1 V em períodos de 300 s. Foram colocados na cela eletroquímica 1 mmol/L de peróxido de hidrogênio em tampão PBS 0,1 mol/L NaCl (pH 7,0). Todos os eletrodos modificados apresentaram aumento na resposta electrocatalítica para o peróxido de hidrogênio em relação ao substrato de ITO, com resposta na corrente com início em 0,5 V indo até 0,7 V. Observando os potenciais em 0,6 e 0,7 V a atividade catalítica dos sistemas decresce na sequência: QUIT/CNT > PANI/PSS > PANI/CNT > ITO. No entanto, para o eletrodo de PANI/PSS, observa-se um aumento repentino na corrente no instante da aplicação do potencial seguido de uma lenta estabilização da corrente desde potencial de 0,1 V até 0,7V, devido ao processo capacitivo e uma cinética mais lenta, conforme observado nos mecanismos de transferência de carga nos voltamogramas hexacianoferrato, no item 5.8.3.

Figura 37. Cronoamperogramas com variação no potencial de 01 V - 0,7 V na presença de 1 mmol/L peróxido de hidrogênio, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0.

Observa-se que os eletrodos apresentaram uma maior resposta catalítica para o peróxido de hidrogênio no potencial de 0,7 V, sendo este um valor próximo aos encontrados na literatura. Sendo assim, utilizaremos este potencial como padrão na obtenção das medidas de sensibilidade ao peróxido dos eletrodos dos sistemas em estudo e mais adiante na construção do biossensor enzimático.

5.8.6 Influência do Número de Bicamadas na Sensibilidade ao Peróxido de Hidrogênio

As figuras 37a, 37b e 37c mostram as curvas analíticas com peróxido de hidrogênio para eletrodos dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT de várias bicamadas, respectivamente. As curvas foram obtidas em tampão PBS 0,15 mol/L NaCl (pH 7,0) e a sensibilidade foi obtida a partir do valor do coeficiente angular da porção linear da curva de calibração.

Figura 38. Curvas analíticas com peróxido de hidrogênio com diferentes números de bicamadas dos sistemas PANI/CNT a) PANI/PSS b) e QUIT/CNT c) e gráfico sensibilidade em função do número de bicamadas.

As curvas de calibração para todos os sistemas mostraram diferenças significativas na sensibilidade em função do número de bicamadas, onde todos os valores foram maiores do que o eletrodo de ITO não modificado. Isto comprova a viabilidade e a versatilidade da técnica de automontagem na construção de eletrodos modificados. A possibilidade de poder ajustar o número de bicamadas de modo a maximizar a sensibilidade fica mais evidente na figura 37d. Pode-se observar a tendência do efeito de bloqueio no eletrodo, onde a adição de bicamadas leva a sucessivos aumentos na espessura do filme, tornando mais lenta a difusão do peróxido até a superfície do eletrodo, dificultando a sua oxidação. Este efeito pode ser observado com mais clareza no eletrodo de PANI/PSS, onde a sensibilidade começa a decair logo após a primeira bicamada, mostrando que o efeito de barreira para o peróxido é muito mais acentuado que a transferência eletrônica da PANI.

Nos filmes de PANI/CNT e QUIT/CNT (figuras 37a e 37d) no entanto, observa-se que os valores da sensibilidade continuam a aumentar até a sétima e quinta bicamada, respectivamente, atingindo seus valores máximos, mostrando que a presença dos CNTs tende a aumentar a transferência eletrônica no eletrodo, e consequentemente o valor da sensibilidade, retardando o efeito de barreira. É também evidente a influência dos polieletrólitos e a sua interação com os CNTs, onde a sensibilidade máxima (5^a bicamada) alcançada pelo eletrodo de QUIT/CNT foi cerca de seis vezes maior do que a do eletrodo de PANI/CNT (7^a bicamada). Este resultado é aparentemente inesperado, visto que a PANI tende a apresentar comportamento condutor maior que a QUIT. Mas como foi verificado nas medidas de crescimento dos filmes, a deposição dos CNTs na QUIT aumenta exponencialmente até a quinta bicamada, enquanto que na PANI, a deposição ocorre de maneira linear, justificando o comportamento apresentado nos valores de sensibilidade obtidos no sistema QUIT/CNT. Contribui também, o fato das medidas serem realizadas em tampão pH 7,0 o que acarreta a diminuição na dopagem da PANI e resulta numa menor condutividade.

Baseando-se nos valores máximos de sensibilidade obtidos das curvas de calibração com peróxido de hidrogênio, foram selecionados para os sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT respectivamente, os eletrodos contendo 7, 5 e 1 bicamadas para serem utilizados na imobilização da enzima glicose oxidase (GOx), que tem suas propriedades biocatalíticas bem conhecidas e assim estudar a viabilidade destes eletrodos como plataforma em biossensores na detecção de glicose.

5.8.7 Estudo do Biossensor de Glicose

A enzima glicose oxidase (GOx)[114] EC 1.1.2.3.4 é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-Glucose a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e age utilizando oxigênio molecular comoceptor de elétrons. A reação ocorre em duas etapas, na primeira, a β -D-Glucose é oxidada pela GOx a glucolactona, sendo então automaticamente hidrolisada ao ácido glucônico. Neste mesmo processo, o cofator da GOx, a adenina flavina dinucleotídeo (FAD) é reduzido a $FADH_2$. Na segunda etapa, o $FADH_2$ é reoxidado pelo oxigênio a FAD, regenerando a GOx e liberando como subproduto da reação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ambos os passos são mostrados nas reações a seguir:

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) gerado como subproduto da reação enzimática, tem concentração proporcional a quantidade de glicose presente, de modo que sua oxidação no eletrodo pode ser utilizada na determinação indireta da concentração da glicose, seguindo a reação a seguir.

O passo seguinte após a escolha dos eletrodos para serem utilizados como biossensores, foi submetê-los a imobilização da enzima GOx. Para isto, foram colocados sobre o eletrodo 5uL de uma solução estoque de GOx (1mg GOx em 30 uL PBS 0,15 M pH 7.0). Logo em seguida foram adicionados 1,5 uL de uma solução 0,125% (v/v) de glutaraldeído (GA), com posterior secagem a temperatura ambiente. O GA é um agente reticulante bifuncional de entrecruzamento que reage preferencialmente com os nitrogênios das aminas, de modo que a utilização do GA promove a ligação dos resíduos dos aminoácidos do exterior da enzima com os nitrogênios da QUIT e PANI, fixando a GOx no eletrodo. Neste caso tomou-se o cuidado de utilizar a menor quantidade possível de GA, uma vez que a reação não é específica, e seu excesso no eletrodo pode fazer com que a reticulação ocorra no sítio ativo da enzima, inativando-a. As figuras 38, 39 e 40 mostram os cronoamperogramas com a corrente resposta a sucessivas adições de glicose, além de suas respectivas curvas de calibração obtidas para os eletrodos de (PANI/CNT)₇,

(PANI/PSS)₁ e (QUIT/CNT)₅, respectivamente. As medidas foram realizadas em tampão PBS 0,15M pH 7,0 .

Figura 39. Cronoamperogramas biossensor (PANI/CNT)₇ , inset curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.

Figura 40. Cronoamperograma biossensor (PANI/PSS)₁ , inset curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.

Figura 41. Cronoamperogramas biossensor (QUIT/CNT) ₅, *inset* curva de calibração, eletrólito PBS 0,15 mol/L pH 7,0 potencial 0,7 V vs Ag/AgCl.

As curvas de calibração com glucose nos três sistemas mostraram resposta à adição de glicose apresentando um intervalo linear de 200 $\mu\text{mol/L}$ a 1000 $\mu\text{mol/L}$ para a PANI/CNT e QUIT/CNT, sendo que para o eletrodo de PANI/PSS, este intervalo um pouco menor, de 200 $\mu\text{mol/L}$ a 800 $\mu\text{mol/L}$.

Os sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT apresentaram valores de sensibilidade de 190 $\text{nA}/\text{mmol.L}^{-1}$ e 36 $\text{nA}/\text{mmol.L}^{-1}$ e 220 $\text{nA}/\text{mmol.L}^{-1}$ respectivamente. Os limites de detecção (LD) também foram calculados (3 vezes o sinal-ruído divididos pela sensibilidade), tendo os valores seguindo a mesma ordem: 2,2 $\mu\text{mol/L}$; 67,5 $\mu\text{mol/L}$ e 8,5 $\mu\text{mol/L}$. Os sistemas contendo CNTs apresentaram maiores sensibilidades e menores LD, o que comprova o potencial deste material na melhora da resposta neste tipo de biossensor.

Era de se esperar, no entanto, que os valores da sensibilidade refletissem o desempenho obtido pelas curvas de calibração com peróxido, uma vez que o mesmo procedimento de imobilização foi realizado nos três eletrodos. Observa-se que os eletrodos de PANI/CNT e QUIT/CNT (figuras 38 e 40) apresentaram valores de sensibilidade bastante próximos no biossensor, enquanto que na calibração com peróxido para estes mesmos eletrodos, a diferença entre a sensibilidade foi cerca de seis vezes. Uma vez que a mesma quantidade de enzima foi colocada em cada eletrodo, e a saturação

ocorre com aproximadamente com adição de 1000 $\mu\text{mol/L}$. Para todos os casos, pode-se desprezar que as enzimas estejam inativadas de modo que a única razão para a queda na sensibilidade do eletrodo de QUIT/CNT, ou o aumento na sensibilidade do eletrodo PANI/CNT possa estar relacionado à interação da enzima com o filme automontado.

Para averiguar a interação da enzima com a camada do filme automontado, buscou-se analisar o comportamento enzimático dos sistemas em estudo. Pode-se observar que as curvas de calibração dos biossensores apresentaram um comportamento enzimático do tipo Michaelis-Menten. A parte linear da curva, onde a concentração é proporcional a corrente, a reação é dita de primeira ordem. À medida que a concentração aumenta, o incremento de corrente passa a ser cada vez mais lento, até ocorrer sua estabilização. Nesse momento, a ordem da reação passa a ser zero, indicando que todos os sítios ativos da enzima estão ocupados, de modo que a taxa de reação agora é constante, não importando mais o aumento na concentração de substrato.

Utilizamos a equação de Lineweaver-Burk (equação 4) para eletrodos modificados, pode obter o parâmetro K_m^{app} , uma constante que indica o desempenho catalítico da enzima no biossensor.

$$\frac{1}{i_{ss}} = \frac{1}{i_{\max}} + \frac{K_m^{app}}{i_{\max}} \times \frac{1}{C} \quad (\text{equação 4})$$

Onde i_{ss} é a corrente obtida na adição de glicose, $i_{\max}$ a corrente obtida após a saturação da curva. Observa-se pela equação, que para obter maiores valores de corrente em função da concentração, o valor de K_m^{app} deve ser o menor possível.

As figuras 41a, 41b e 41c mostram respectivamente, os gráficos de Lineweaver-Burk plotados os para os biossensores de (PANI/CNT)₇, (PANI/PSS)₁ e (QUIT/CNT)₅. Os valores de K_m^{app} para os eletrodos na mesma ordem foram, 1,10; 1,12 e 3,4 mmol/L. Estes valores indicam que a GOx está imobilizada de maneira mais adequada nos eletrodos de PANI/CNT e PANI/PSS, com seus sítios catalíticos mais expostos à catálise da glicose. Os valores quase idênticos mostram que a enzima atua com mesmo desempenho em ambos eletrodos. No caso do eletrodo de QUIT/CNT o maior valor de K_m^{app} mostra que o desempenho da enzima está sendo prejudicado, o que pode ser

ocasionado devido ao microambiente da QUIT com CNTs ou mais provavelmente, pela ação do GA que possui maior interação dos grupos amina da QUIT.

Figura 42. Curvas de Lineweaver-burk para os sistemas (PANI/CNT)₇ a) (PANI/PSS)₁ b) e (QUIT/CNT)₅ c).

6 Conclusões

Neste trabalho foram desenvolvidos e otimizados filmes automontados de CNTs contendo os polieletrólitos PANI ou QUIT, utilizando-os na aplicação em biossensores para detecção de glicose, através da imobilização da enzima GOx. Devido ao caráter condutor da PANI também foram incluídos estudos do filme PANI/PSS, com intuito de observar o efeito isolado da PANI.

A fabricação dos filmes automontados dos sistemas PANI/CNT, PANI/PSS e QUIT/CNT apresentaram padrões de crescimento das bicamadas bem definidos, sendo estes lineares no caso dos filmes contendo PANI, e exponencial no filme de QUIT. Este comportamento regular possibilita através do ajuste do número de bicamadas, obter um alto controle da quantidade de massa depositada.

A interação entre os materiais presentes nos filmes foram comprovadas pelas análises de FTIR e Raman, sendo as principais: a formação de interações do tipo π -stacking nos filmes PANI/CNT, interações entre os grupos quinóides e os grupos sulfônicos nos filmes de PANI/PSS, e interações entre os grupos amina e os grupos carboxílicos nos filmes QUIT/CNT. O mapeamento químico feito por medidas de Raman mostraram que os CNTs tendem a formar filmes mais heterogêneos. Além disso, caracterizações feitas por AFM mostraram que os filmes apresentaram morfologia globular com os filmes contendo PANI apresentando maiores valores de rugosidade.

As medidas elétricas (dc) em eletrodos interdigitados de ouro mostraram que a incorporação dos CNTs permitiu diminuir em cinco ordens de grandeza a resistividade do filme. Tal fato foi evidenciado também por medidas eletroquímicas, que demonstraram ainda que os filmes estudados apresentaram alta estabilidade eletroquímica. A presença dos CNTs aumentou a intensidade das correntes de pico em relação aos filmes somente com os polieletrólitos, demonstrando também maior reversibilidade. Estudos no potencial de trabalho e curvas de calibração ao peróxido de hidrogênio dos eletrodos com várias bicamadas puderam ser utilizadas na otimização do desempenho dos eletrodos. A imobilização da enzima GOx permitiu obter curvas de calibração para glicose com alta sensibilidade e baixos limites de detecção.

A performance dos sistemas estudados como biossensores revelou que os filmes de QUIT/CNT são melhores que os sistemas contendo PANI para detecção de peróxido. Após a imobilização da enzima, os sistemas que apresentaram maior sensibilidade e menor LD foram os filmes contendo CNT, contudo os filmes de PANI obtiveram melhor eficiência enzimática. Estes estudos comprovam a vantagem de se incorporar nanotubos de carbono em sistemas eletroativos automontados, uma vez que filmes mais estáveis e com maior atividade eletroquímica podem ser obtidos. Esse fato pode ser de grande relevância para futuros estudos nas áreas de nanocompósitos para aplicações analíticas.

7 Perspectivas e Sugestões de Trabalhos Futuros

Como continuação deste trabalho propõe-se as seguintes etapas:

- Realizar um estudo mais detalhado das condições de imobilização enzimática, como estudo de interferentes, efeito da concentração da enzima, método de imobilização da enzima, efeito do pH e efeito da temperatura.

- Realizar a deposição de um mediador, seja na forma de filmes automontados ou por deposição química.

- Estudar a utilização de outras enzimas, com o princípio bioquímico semelhante a GOx.

- Empregar estes eletrodos como sensores na detecção de outros compostos químicos, por exemplo, fenóis e nitratos.

- Empregar estes eletrodos em outros dispositivos de transdução, como em medidas de espectroscopia de impedância elétrica.

Referências

1. RURACK, K.; MARTINEZ-MANEZ, R. (2010). *The Supramolecular chemistry of organic – inorganic hybrid materials*. New York: John Wiley.
2. DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. (2006). *Nanotecnologia*. São Paulo: Artliber.
3. FISHBINE, G. (2002). *The Investor's guide to nanotechnology and micromachines*. New York: John Wiley.
4. AVELLANEDA, C.O.; AEGERTER, M.A.; PAWLICKA, A. (1998). Caracterização de filmes finos de Nb₂O₅ com propriedades eletrocromicas. *Química Nova*, São Paulo, v.21, n.3, p.365-367.
5. BLODGETT, K.B. (1934). Monomolecular films of fatty acids on glass. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v.56, n.2, p.495.
6. HAMMOND, P.T. (2004). Form and function in multilayer assembly: new applications at the nanoscale. *Advanced Materials*, New York, v.16, n.15, p.1271-1293, Aug.
7. LAKISS, L. et al. (2008). Copper-containing nanoporous films. *Superlattices and Microstructures*, Amsterdam, v.44, n.4/5, p.617-625.
8. DECHER, G. (2002). Polyelectrolyte multilayers: an overview. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, Washington, v.223, pt.1, p.U374, Meeting Abstract 016-Coll.
9. DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J. (1992). Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process .3. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films*, Amsterdam, v.210/211, pt.2, p.831-835.
10. LVOV, Y.; DECHER, G.; MOHWALD, H. (1993). Assembly, structural characterization, and thermal-behavior of layer-by-layer deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir*, Washington, v.9, n.2, p.481-486.
11. IJIMA, S.; (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, London, v.354, n. 6348, p.56-58.
12. TANS, S.J. et al. (1998). Electron-electron correlations in carbon nanotubes. *Nature*, London, v.394, n.6695, p.761-764.
13. ILER, R.K. (1966). Multilayers of colloidal particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v.21, n.6, p.569-594.

14. NETZER, L.S.; SAGIV, J. (1983). A New approach to construction of artificial monolayer assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v.105, n.3, p.674-676.
15. NETZER, L.I.; RADU, I.; SAGIV, J. (1983). Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers – why and how? I: from monolayer to multilayer, by adsorption. *Thin Solid Films*, Amsterdam, v.99, n.1/3, p.235-241.
16. DECHER, G. et al. (1997). Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, New York, v.277, n.5330, p.1232-1237.
17. http://www.nwo.nl/nwohome.nsf/pages/NWOA_6YPLCB_Eng. Acesso em: 22/02/2011.
18. MAJOR, R.C.; ZHU, X.Y. (2001). Two-step approach to the formation of organic monolayers on the silicon oxide surface. *Langmuir*, Washington, v.17, n.18, p.5576-5580.
19. ULMAN, A. (1991). Thermal-stability of langmuir-blodgett and self-assembled films - a possible scenario for order-disorder transitions. *Advanced Materials*, New York, v.3, n.6, p.298-303.
20. FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A.; KUBOTA, L.T. (2003). Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, São Paulo, v.26, p.381-389.
21. LVOV, Y.A. et al. (1995). Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption. *Journal of the American Chemical Society*, Washington, v.117, n.22, p.6117-6123.
22. BABA, A. et al. (2010). Electrochemical surface plasmon resonance and waveguide-enhanced glucose biosensing with N-alkylaminated polypyrrole/glucose oxidase multilayers. *Acs Applied Materials & Interfaces*, Washington, v.2, n.8, p.2347-2354, Aug.
23. DENG, C.Y. et al. (2010). A Sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode. *Biosensors & Bioelectronics*, Amsterdam, v.26, n.1, p.213-219.
24. ANTHA, S. et al. (2010). Renewable nanocomposite layer-by-layer assembled catalytic interfaces for biosensing applications. *Langmuir*, Washington, v.26, n.24, p.19114-19119.
25. YAO, H.Q.; CHANG, F.W.; HU, N.F (2010). PH-switchable bioelectrocatalysis based on layer-by-layer films assembled through specific boronic acid-diol recognition. *Electrochimica Acta*, Amsterdam, v.55, n.28, p.9185-9192.
26. BLACKLOCK, J. et al. (2010). DNA release dynamics from bio-reducible layer-by-layer films. *Langmuir*, Washington, v.26, n.11, p.8597-8605.

27. SUCCI, P.A. et al. (2006). Assembly of multilayer films incorporating a viral protein cage architecture. *Langmuir*, Washington, v.22, n.21, p.8891-8896.
28. WONG, S.Y. et al. (2010). Bactericidal and virucidal ultrathin films assembled layer by layer from polycationic N-alkylated polyethylenimines and polyanions. *Biomaterials*, Amsterdam, v.31, n.14, p.4079-4087.
29. KIEL, M. et al. (2010). Structural characterization of a spin-assisted colloid-polyelectrolyte assembly: stratified multilayer thin films. *Langmuir*, Washington, v.26, n.23, p.18499-18502.
30. LI, Y.L. et al. (2010). Electrochemiluminescence enhancement of cdte quantum dots by the addition of silver(i) ions. *Analytical Letters*, Abingdon, v.43, n.18, p.2837-2847.
31. ELZBIECIAK, M. et al. (2009). Characteristics of model polyelectrolyte multilayer films containing laponite clay nanoparticles. *Langmuir*, Washington, v.26, n.1, p.277-283.
32. YANG, Y.H.; MALEK, F.A.; GRUNLAN, J.C. (2010). Influence of deposition time on layer-by-layer growth of clay-based thin films. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, Washington, v.49, n.18, p.8501-8509.
33. DU, Y. et al. (2010). Layer-by-layer electrochemical biosensor with aptamer-appended active polyelectrolyte multilayer for sensitive protein determination. *Biosensors & Bioelectronics*, Amsterdam, v.25, n.8, p.1902-1907.
34. LIU, L.J. et al. (2008). Highly sensitive biosensor based on bionanomultilayer with water-soluble multiwall carbon nanotubes for determination of phenolics. *Biosensors & Bioelectronics*, Amsterdam, v.24, n.2, p.306-312.
35. PATRICIO, S. et al. (2010). Novel layer-by-layer interfacial [ni(salen)]-polyelectrolyte hybrid films. *Langmuir*, Washington, v.26, n.13, p.10842-10853,
36. HOOGEVEEN, N.G. et al. (1996). Formation and stability of multilayers of polyelectrolytes. *Langmuir*, Washington, v.12, n.15, p.3675-3681.
37. KELLOGG, G.J.M. et al. (1996). Neutron reflectivity investigations of self-assembled conjugated polyion multilayers. *Langmuir*, Washington, v.12, n.21, p.5109-5113.
38. DECHER, G.L.; YURI, L.; SCHMITT, J. (1994). Proof of multilayer structural organization in self-assembled polycation-polyanion molecular films. *Thin Solid Films*, Amsterdam, v.244, n.1/2, p.772-777.
39. LVOV, Y.M.D.; DECHER, G. (1994). Assembly of multilayer ordered films by alternating adsorption of oppositely charged macromolecules. *Kristallografiya*, v.39, n.4, p.696-716.

40. PARK, S.Y. et al. (2001). Anomalous adsorption of polyelectrolyte layers. *Macromolecules*, Washington, v.34, n.10, p.3384-3388.
41. STOCKTON, W.B.; RUBNER, M.F. (1994). Electrically conducting compatible blends of polyaniline poly(vinyl pyrrolidone). In: MATERIALS RESEARCH SOCIETY SYMPOSIUM, 1993, Boston. *Proceedings...* Pittsburgh: Materials Research society. v.328, p.257-262.
42. STOCKTON, W.B.; RUBNER, M.F. (1997). Molecular-level processing of conjugated polymers. 4: layer-by-layer manipulation of polyaniline via hydrogen-bonding interactions. *Macromolecules*, Washington, v.30, n.9, p.2717-2725.
43. ANZAI, J. et al. (1999). Layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s. *Langmuir*, Washington, v.15, n.1, p.221-226.
44. SHIMAZAKI, Y.M. et al. (1997). Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charge-transfer interaction. *Langmuir*, Washington, v.13, n.6, p.1385-1387.
45. LVOV, Y. ARIGA, K. ICHINOSE, I., KUNITAKE, T. (1995). Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *Journal of the American Chemical Society*. v.117, n.22, p. 6117-6123.
46. GUEDIDI, S. et al. (2010). Effect of enzyme location on activity and stability of trypsin and urease immobilized on porous membranes by using layer-by-layer self-assembly of polyelectrolyte. *Journal of Membrane Science*, Amsterdam, v.365, n.1/2, p.59-67.
47. ZENG, G.H. et al. (2010). Unconventional layer-by-layer assembly of graphene multilayer films for enzyme-based glucose and maltose biosensing. *Langmuir*, Washington, v.26, n.18, p.15022-15026.
48. CHEN, C. et al. (2009). The Biological behavior of endothelial progenitor cells on titanium surface immobilized by CD34 antibody. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MULTI-FUNCTIONAL MATERIALS AND STRUCTURES, 2., 2009, Qingdao. *Proceedings...* Laublsrutestr: transactions Technical publications. v.79/82, pt.1/2, p.707-710.
49. LIU, S.H. et al. (2010). The Nanofabrication of CD34 antibody-VEGF-heparin on titanium surface via layer-by-layer assembly for biofunctionalization. In: INTERNATIONAL NANO-ELECTRONICS CONFERENCE, 3., 2010, Hong kong. *Proceedings...* New York: IEEE. v.1/2, p.1357.
50. HAYNIE, D.T. (2009). *Multilayer film useful as drug delivery system, comprises two or more layers of polyelectrolytes with first polypeptide segment and second polypeptide segment*. New Haven: Artificial Cell Technologies.

51. SHIH, C.H. (2010). Real-time electronic nose based pathogen detection for respiratory intensive care patients. *Sensors and Actuators B-Chemical*, Amsterdam, v.148, n.1, p.153-157, June.
52. TERRONES, M. (2004). Carbon nanotubes: synthesis and properties, electronic devices and others emerging applications. *International Materials Reviews*, London, v.49, n.6, p.325-377.
53. POPOV, V.N. (2004). Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, Amsterdam, v.43, n.3, p.61-102.
54. KREUPL, F., et al. (2002), Carbon nanotubes in interconnect applications. *Microelectronic Engineering*, v.64, n.1-4, p. 399-408.
55. IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*, London, v.363, n.6430, p.603-605.
56. THOSTENSON, E.T.; REN, Z.; CHOU, T.W. (2001). Advances in the science and technology of carbon nanotubes and their composites: a review. *Composites Science and Technology*, Amsterdam, v.61, n.13, p.1899-1912, Oct.
57. CHARLIER, J.C. (2002). Defects in carbon nanotubes. *Accounts of Chemical Research*, Washington, v.35, n.12, p.1063-1069.
58. BELIN, T.; EPRON, F. (2005). Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering B-Solid State Materials for Advanced Technology*, v.119, n.2, p.105-118.
59. SOUZA FILHO, A.G.; FAGAN, S.B. (2007). Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.7, p.1695-1703.
60. SOUSA, J.E.P. (2008). *Vacâncias em nanotubos de carbono: propriedades eletrônicas, estruturais e de transporte*. 196p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
61. JOURNET, C.; BERNIER, P. (1998). Production of carbon nanotubes. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, Berlin, v.67, n.1, p.1-9, July.
62. GUO, T. et al. (1995). Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v.243, n.1/2, p.49-54.
63. CHENG, H.M. et al. (1998). Bulk morphology and diameter distribution of single-walled carbon nanotubes synthesized by catalytic decomposition of hydrocarbons. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v.289, n.5/6, p.602-610.
64. LÓPEZ, B.P. (2009). *Carbon nanotubes for electrochemical (bio)sensing*. 213p. Thesis (PhD) - Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

65. KIM, J.S.; KIM, G.H.; KIM, C-II. (2006). Synthesis and purification of single-walled nanotubes by methane decomposition over iron- supported catalysts. *Journal of Vacuum Science and Technology*, Research Triangle Park, v.24, n.4, p.1314-1317.
66. HIRSCH, A. (2002). Functionalization of single-walled carbon nanotubes. *Angewandte Chemie - International Edition*, Weinheim, v.41, n.11, p.1853-1859.
67. O'CONNELL, M.J. et al. (2002). Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes. *Science*, New York, v.297, n.5581, p.593-596.
68. RICHARD, C. et al. (2003). Supramolecular self-assembly of lipid derivatives on carbon nanotubes. *Science*, New York, v.300, n.5620, p.775-778.
69. WANG, S. et al. (2003). Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nature Materials*, London, v.2, n.3, p.196-200.
70. DOHI, H. et al. (2006). Synthesis and spectroscopic characterization of single-wall carbon nanotubes wrapped by glycoconjugate polymer with bioactive sugars. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v.428, n.1/3, p.98-101.
71. ZHENG, M. et al. (2003). DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials*, London, v.2, n.5, p.338-342.
72. CHIANG, C.K. et al. (1977). Electrical conductivity in doped polyacetylene. *Physical Review Letters*, Woodbury, v.39, n.17, p.1098-1101.
73. MATTOSO, L.H. (1996). Polianilinas:síntese, estrutura e propriedades. *Química Nova*, São Paulo, v.19, n.4, p.388-399.
74. Izumi, C.M.S. (2006). *Caracterização espectroscópica da polianilina em diferentes ambientes químicos*. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química., Universidade de São Paulo, São Paulo.
75. GENIÈS, E.M. et al. (1990). Polyaniline: a historical survey. *Synthetic Metals*, Amsterdam, v.36, n.2, p.139-182.
76. BRITO, F.F. (2005). *Caracterização eletroquímica do compósito PSSO₃H/PAni para aplicação em células a combustível*. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
77. JOO, J.; EPSTEIN, A.J. (1994). Electromagnetic-radiation shielding by intrinsically conducting polymers. *Applied Physics Letters*, New York, v.65, n.18, p.2278-2280.
78. PAUL, E.W.; RICCO, A.J.; WRIGHTON, M.S. (1985). Resistance of polyaniline films as a function of electrochemical potential and the fabrication of polyaniline-based microelectronic devices. *Journal of Physical Chemistry*, Washington, v.89, n.8, p.1441-1447.

79. OYAMA, N. et al. (1995). Dimercaptan-polyaniline composite electrodes for lithium batteries with high-energy density. *Nature*, London, v.373, n.6515, p.598-600.
80. WEI, D.; IVASKA, A. (2006). Electrochemical biosensors based on polyaniline. *Chemia Analityczna*, Warsaw, v.51, n.6, p.839-852.
81. CAMPANA-FILHO, S.P. et al. (2007). Extração, estruturas e propriedades de α -e β -quitina. *Química Nova*, São Paulo, v.30, n.3, p.644-650.
82. ROBERTS, G.A.F. (1992). *Chitin chemistry*. London: Macmillan.
83. PERCOT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. (2003). Characterization of shrimp shell deproteinization. *Biomacromolecules*, Washington, v.4, n.5, p.1380-1385.
84. RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, Amsterdam, v.40, n.25, p.7029-7032.
85. PAVINATTO, A. (2009), *Efeito de características estruturais da quitosana sobre sua interação com filmes de langmuir como modelo de biomembrana*, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
86. DELEZUK, J.A.D.M. (2009) , *Desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade: estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura da reação*, Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
87. AGULLÓ, E. et al. (2004). *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú; Fondo Editorial.
88. ZHOU, J. et al. (2010). Layer by layer chitosan/alginate coatings on poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for antifouling protection and Folic acid binding to achieve selective cell targeting. *Journal of Colloid and Interface Science*, Amsterdam, v.345, n.2, p.241-247.
89. KIM, S.K.; RAJAPAKSE, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): a review. *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v.62, n.4, p.357-368.
90. EGGINS, B. (1996). *Biosensors: an introduction*. New York: Wiley-Teubner.
91. MOHANTY, S.P.; KOUKIANOS, E. (2001). *Biosensors: a tutorial review*. [S.l.:s.n.].
92. THÉVENOT, D.R.T., K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S., *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 16, n. 1/2, p. 121-131.

92. THÉVENOT, D.R. et al. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors & Bioelectronics*, Amsterdam, v.16, n.1/2, p.121-131.
93. RODRIGUES, C. R., (1998). *Desenvolvimento de Métodos Enzimáticos para a Determinação Quantitativa de Acetilcolina e de Paraoxon*. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
94. CASELI, L., et al. (2009). Controlled fabrication of gold nanoparticles biomediated by glucose oxidase immobilized on chitosan layer-by-layer films. *Materials Science and Engineering: C*, v.29 n.5, p. 1687-1690.
95. O' SULLIVAN, C.K. and GUILBAULT, G. G. (1999), Commercial quartz crystal microbalance –theory and applications. *Biosensors & Bioelectronics*, v.44, p. 663-670
96. BUTTRY, D.A. (1990). BARD, A.J.; RUBINSTEIN, I. (Ed.). *Electroanalytical chemistry: a series of advances*. New York: Marcel Dekker: New York. v.22
97. TANG, Y. et al. (2009). Enhancing electrochemical and electrocatalytic activities of polyaniline via co-doping with poly(styrene sulfonate) and gold. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Lausanne, v.639, n.(1/2), p.123-129.
98. SIQUEIRA JR, J.R. et al. (2008). Processing of electroactive nanostructured films incorporating carbon nanotubes and phthalocyanines for sensing. *Journal of Physical Chemistry C*, Washington, v.112, n.24, p.9050–9055,
99. QUILLARD, S., et al. (1994).Vibrational analysis of polyaniline: A comparative study of leucoemeraldine, emeraldine, and pernigraniline bases. *Physical Review B*,. v.50, n.17, p. 12496.
100. INOUE, M., NAVARRO, R.E., and INOUE, M.B. (1989). New soluble polyaniline: Synthesis, electrical properties and solution electronic spectrum. *Synthetic Metals*,. v.30, n.2, p. 199-207.
101. SALANECK, W.R., et al., (1985). Physical Characterization of Some Polyaniline, *Molecular Crystals and Liquid Crystals*,. v.121, p. 191 - 194.
102. CHEN, S., et al., (2005). A new approach to the functionalization of single-walled carbon nanotubes with both alkyl and carboxyl groups. *Chemical Physics Letters*, v.402, n.4-6, p. 312-317.
103. BURGHARD, M., (2005) Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes. *Surface Science Reports*, v. 58, n. 1/4, p. 1-109.
104. AREPALLI, S.F., S. W.; HOOKER, S.; MIGLER, K. (2008). Measurement Issues in Single Wall Carbon Nanotubes. *The National Institute of Standards and Technology* (NIST), v.19, n.960

105. ZENGİN, H. et al. (2002). Carbon nanotube doped polyaniline. *Advanced Materials*, New York, v.14, n.20, p.1480-1483.
106. MARTINS, C.R.; GIACOMMO, R.; DE PAOLI, M.A. (2003). Synthesis in pilot plant scale and physical properties of sulfonated polystyrene. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v.14, n.5, p.797-802.
107. LEE, H. et al. (2008). Preparation and characterization of core-shell polyaniline-polystyrene sulfonate@Fe₃O₄ nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, v.112, n.3 p. 805-809.
108. OSMAN, Z. and A.K. AROF. (2003). FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. *Electrochimica Acta*, v.48, n.8, p. 993-999.
109. BALAU, L., et al. (2004). Physico-chemical properties of Chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*, v.2, n.4, p. 638-647.
110. PAULINO, A.T., et al. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers*, v.64, n.1, p. 98-103.
111. ROSARIO-CASTRO, B.I., et al., (2010) Single-wall carbon nanotube chemical attachment at platinum electrodes. *Applied Surface Science*, v.257, n.2, p. 340-353.
112. KANNAN, R.. et al. (2011). Enhanced electrocatalytic performance of functionalized carbon nanotube electrodes for oxygen reduction in proton exchange membrane fuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v.13, p.10312-10317.
113. LAURENT, D.; SCHLENOFF, J.B. (1997). Multilayer assemblies of redox polyelectrolytes. *Langmuir*, Washington, v.13, n.6, p.1552-1557.
114. BANKAR, S.B. et al. (2009). Glucose oxidase - an overview. *Biotechnology Advances*, Amsterdam, v.27,n.4, p.489–501.