

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Química
Bacharelado em Química Industrial

NORTOM MUNHOZ ALVES

**PLATAFORMA ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE GLICOSE
BASEADO NA TECNOLOGIA DE FILMES**

Porto Alegre

2021

NORTOM MUNHOZ ALVES

**PLATAFORMA ELETROQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE GLICOSE
BASEADO NA TECNOLOGIA DE FILMES**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em química industrial do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Leliz T. Arenas

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Alves, Nortom

Plataforma eletroquímica para detecção de glicose baseado na tecnologia de filmes / Nortom Alves. -- 2021.

49 f.

Orientadora: Leliz Ticona Arenas.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Biossensor. 2. Glicose. 3. Filmes. I. Ticona Arenas, Leliz, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, professora e amiga Leliz, por todo o empenho e colaboração para a produção deste trabalho. À minha mãe Cleonice e meu pai Carlos por sempre terem mostrado o caminho e a importância dos estudos. Agradeço também a meus tios e tias pelo incentivo e apoio durante a jornada de graduação. Aos meus amigos, por todas conversas e ideias sobre a vida. Por último, mas não menos importante, agradeço à minha avó Geny por sempre entender minhas dificuldades e promover o meu bem-estar.

“Nenhum problema pode ser resolvido
pelo mesmo estado de consciência que
o criou”

(Albert Einstein)

RESUMO

Os biossensores a base de glicose oxidase são de grande importância para monitorar a glicose no sangue, além de auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças como a diabetes. Neste trabalho foi desenvolvida uma plataforma com um material condutor a base de sílica, titânia e carbono grafite para servir como matriz de imobilização de nanopartículas de ouro e enzima glicose oxidase. Tanto a síntese do material condutor quanto a forma de imobilização foram realizadas pelo método sol-gel, sendo que a técnica de spin-coating foi empregada para formação de filmes na superfície das plataformas feitas a partir do material matriz. Além disso, um silsesquioxano iônico foi obtido para estabilização das nanopartículas de ouro. O material condutor foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura e isotermas de adsorção e dessorção de N₂ com a finalidade de conhecer a sua morfologia e textura. As nanopartículas foram submetidas à espectroscopia no UV-visível e microscopia eletrônica de transmissão para confirmar sua estabilização. Por último, foram realizados testes eletroquímicos como a voltametria cíclica e cronoamperometria para verificar a atividade da enzima na plataforma. Os resultados obtidos permitem dizer que: o material condutor apresenta mesoporos, e uma superfície com poucas rugosidades; as nanopartículas de ouro foram estabilizadas com sucesso no tamanho aproximado de 10 nm de diâmetro; o biossensor apresenta boa sensibilidade, tendo como limite de detecção e quantificação 0,508 mmol L⁻¹ e 1,69 mmol L⁻¹ respectivamente.

Palavras-chave: Biossensor; Glicose; Glicose oxidase; sol-gel, Filmes; Nanopartículas de ouro

ABSTRACT

The biosensors based on glucose oxidase are of great importance for monitoring the glucose in blood, besides helping in diagnostic and treatment of diseases like diabetes. In this work was developed a platform with a conductor material made of silica, titania and graphite carbon to be used as base for immobilization of gold nanoparticles and glucose oxidase enzyme. Both the synthesis of an conductor material and the form of immobilization were realized by sol-gel process, the spin-coating technique was used for the formation of films on the surface of platforms made of the base material. Furthermore, a silsesquioxane ionic was obtain for the stabilization of gold nanoparticles. The conductor material was characterized by scanning electron microscopy and adsorption and desorption of N₂ with the goal of know the morphology and texture. The nanoparticles were submitted to UV-Vis espectroscopy and transmission electron microscopy to confirm the stabilization. Lastly the electrochemistry tests like cyclic voltammetry and chronoamperometry were realized to verify the enzyme activity on the platform. The obtained results allow to say that: the gold nanoparticles were successful stabilized at the size of about 10 nm of diameter; the biosensor shows good sensibility, with an limit of detection and quantification of 0,508 mmol L⁻¹ e 1,69 mmol L⁻¹ respectively.

Keywords: Biosensor; Glucose; Glucose oxidase; Sol-gel; Films; Gold nanoparticles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de um biossensor.....	14
Figura 2: Esquema representando o funcionamento de biossensores eletroquímicos amperométricos de (A) primeira, (B) segunda e (C) terceira geração.....	15
Figura 3: Reação de redução do cofator FAD presente na GOX.....	16
Figura 4: Representação gráfica do mercado de biossensores em milhões de dólares, dados de fontes comerciais primárias e secundárias.....	16
Figura 5: Fotos de aplicação do medidor de glicose (A) e tiras de detecção de glicose (B) ambos da marca G-Tech.....	17
Figura 6: Esquema representando a reação da GOX.....	19
Figura 7: Esquema representando formas de imobilização enzimática.....	20
Figura 8: Representação esquemática das 4 etapas da técnica de spin coating. (i) Deposição, (ii) Aceleração, (iii) Fluido se espalha em velocidade constante, (iv) Evaporação de solventes voláteis em velocidade constante.....	22
Figura 9: Imagem da Taça de Lycurgus.....	23
Figura 10: Esquema da reação sol-gel pelo gel coloidal (a) e gel polimérico (b).....	24
Figura 11: Esquema da reação sol-gel para o TEOS.....	26
Figura 12: Representação de uma célula eletroquímica contendo (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo auxiliar.....	28
Figura 13: Voltamogramas cíclicos para sistemas reversíveis (A), não reversíveis (B) e quase reversíveis (C).....	29
Figura 14: a) Pastilhador e b) Prensa hidráulica utilizada para fazer as pastilhas condutoras.....	31
Figura 15: Representação simplificada das reações de síntese do R2DABCO.	32
Figura 16: Equipamento Spinner assy WS-650Mz-23NPPB.....	34
Figura 17: Gráfico de UV-visível para a solução de nanopartículas de ouro.....	36
Figura 18: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps com magnificação de 300.000X.....	36
Figura 19: Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio do material condutor SiO ₂ /TiO ₂ /C-Grafite.....	37
Figura 20: Distribuição de tamanho de poros do material condutor.....	37

Figura 21: Imagens obtidas com MEV a 20,000X do material condutor SiO ₂ /TiO ₂ /C-Grafite.....	38
Figura 22: Imagens obtidas com MEV da pastilha do material condutor SiO ₂ /TiO ₂ /C-Grafite com AuNps a a) 10000X e b) 30000X.....	38
Figura 23: Voltamogramas cíclicos de 5 eletrodos das plataformas de SiO ₂ /TiO ₂ /C-grafite na presença de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,001 mol L ⁻¹ e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	39
Figura 24: Voltametria cíclica dos eletrodos com e sem AuNps na presença de ferricianeto de potássio/ferrrocianeto de potássio 1,0 mmolL ⁻¹ e 0,1 molL ⁻¹ KCl.	40
Figura 25: Voltametria cíclica do eletrodo SiO ₂ /TiO ₂ /C-Grafite/AuNps/GOx com e sem glicose na solução eletrolítica, tampão fosfato pH 7,0, KCl 0,1 mol L ⁻¹ e velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹	40
Figura 26: Representação da reação de redução e oxidação do peróxido de hidrogênio sobre potenciais aplicados ao eletrodo.....	41
Figura 27: Cronoamperograma do eletrodo SiO ₂ /TiO ₂ /Grafite/AuNps/GOx com adições de glicose na solução eletrolítica em solução PBS pH 7.....	42
Figura 28: Relação linear e quadrática da concentração de glicose na solução eletrolítica em função da corrente.....	42
Figura 29: Equação de Lineweaver-Burk.....	43
Figura 30: Gráfico de Lineweaver-Burk de 1/I _{ss} vs 1/[glicose]. R: 0,987.....	43
Figura 31: Equação de Lineweaver-Burk obtida através dos dados de cronoamperometria.....	44

LISTA DE ABREVIACOES

ECC – Eletrodo de carbono cerâmico

ER – Eletrodo de referênci

ET – Eletrodo de trabalho

EA – Eletrodo Auxiliar

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nps – Nanopartículas

AuNps – Nanopartículas de ouro

SOL – Suspensão de partículas coloidais estáveis em um líquido

GOx – Glicose Oxidase

FAD – Flavina Adenina Dinucleotídeo

TEOS – Tetraetilortossilicato

TIPOT – Tetraisopropóxido de titânio

CPTMS – 3-cloropropiltrimetoxisilano

DMF – N,N-dimetilformamida

I_{pa} – Corrente de pico anódica

I_{pc} – Corrente de pico catódica

K_m – Constante de Michaelis-Menten

I_{ss} – Corrente do estado estacionário

I_{max} – Corrente máxima

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	11
2.	Revisão Bibliográfica.....	12
2.1.	Biossensores.....	12
2.1.1.	Funcionamento e classificação dos biossensores.....	13
2.1.2.	Biossensores eletroquímicos de glicose.....	15
2.1.3.	Biossensores eletroquímicos e a economia.....	16
2.2	Enzima Glicose Oxidase.....	17
2.3	Imobilização enzimática.....	19
2.4	Filmes.....	20
2.4.1	Spin-coating.....	21
2.5	Nanopartículas metálicas.....	22
2.6	Suportes.....	23
2.6.1	Sol-Gel.....	24
2.6.2	Eletrodo de carbono cerâmico.....	26
2.7	Técnicas eletroquímicas.....	27
2.7.1	Voltametria cíclica.....	28
2.7.2	Cronoamperometria.....	29
3.	Objetivos.....	29
3.1	Objetivos específicos.....	29
4.	Desenvolvimento experimental.....	30
4.1.	Obtenção do compósito condutor sílica/titânia/carbono grafite, SiO ₂ /TiO ₂ /C-grafite.....	30
4.2.	Síntese do estabilizante de nanopartículas de ouro (AuNps).....	31
4.3.	Preparação das AuNps.....	32
4.4.	Preparo da solução hidrolisada coloidal “sol” TEOS/GOx.....	32
4.5.	Formação de filmes utilizando a técnica <i>Spin-Coating</i>	33
4.6.	Técnicas de caracterização.....	34
4.6.1.	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).....	34
4.6.2.	Espectroscopia no ultravioleta-visível.....	34
4.6.3.	Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio N ₂	35
4.6.4.	Medidas eletroquímicas.....	35
5.	Resultados e discussão.....	35
6.	Custo experimental.....	44
7.	Conclusão.....	45
8.	Referências.....	46

1. Introdução

As técnicas de detecção já são utilizadas em setores industriais, na agricultura, no meio ambiente, na pesquisa acadêmica e também em hospitais. Elas são utilizadas como forma de garantir que determinado substrato, seja alimento, bebida, solos, água ou sangue esteja dentro dos parâmetros desejados e sem a presença de contaminantes. Os cuidados com a saúde trazem consigo muitos avanços tecnológicos, sendo um campo de estudos com muita demanda e desafios, no qual são desenvolvidas diversas formas de síntese de fármacos e testes para diagnósticos de doenças ou parâmetros fisiológicos de seres vivos. Alguns desses diagnósticos são feitos em centros especializados e outros na própria residência do paciente. Os biossensores comerciais entram nesse contexto, sendo uma forma rápida e precisa para informar as condições de diagnóstico. Os biossensores são ferramentas analíticas que possibilitam a medição direta de um analito, normalmente são empregadas enzimas imobilizadas nestes dispositivos e as suas características variam de acordo com a espécie a ser detectada.

Entre os tipos de biossensores, os eletroquímicos têm ganhado muita atenção por serem simples e de fácil manipulação, sendo possível miniaturizá-los para a fabricação de equipamentos portáteis. Estes dispositivos têm como desafio a imobilização das enzimas, pois muitas vezes a disponibilidade do sítio ativo fica obstruída ou então a enzima sofre lixiviação ou desnaturação. Uma das formas mais atraentes para promover a melhor imobilização e eficiência é pelo método sol-gel na forma de filmes sobre um substrato condutor, que desta forma garante a distribuição homogênea da enzima. Tal método também é utilizado na obtenção de suportes condutores carbono-cerâmicos a base de sílica, que reúnem características ideais para o uso em biossensores eletroquímicos, sendo elas a estrutura rígida e a resistência química. Além disso, tem sido relatado que a aplicação da nanotecnologia em biossensores colabora para aumentar a velocidade e a sensibilidade de detecção, as nanopartículas metálicas são um exemplo, podendo ser incorporadas pelo mesmo método de imobilização de enzimas. Tais nanopartículas apresentam boa compatibilidade biológica e propriedades físico-químicas únicas.

Esses dispositivos têm sido muito utilizados na medicina para ajudar no tratamento de pacientes que possuem diabetes, caracterizada por apresentar

quantidades superiores a $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de glicose em jejum (SÁ, 2014). A incidência dessa doença tem aumentado, estima-se que a diabetes do tipo 2 aumente de 177 milhões casos registrados em 2000 para 366 milhões de casos em 2030, sendo que 90% de todos os casos de diabetes são desse tipo. A doença traz consigo complicações como insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira, doença cardiovascular, entre outras. Portanto, a detecção de glicose em pacientes é de grande importância para que sejam diagnosticados e tratados para evitar consequências nocivas.

Neste trabalho, foi desenvolvido um método simples, prático e barato de desenvolver um biossensor eletroquímico de glicose, através da imobilização de enzimas e nanopartículas metálicas na forma de filmes em um compósito condutor a base de sílica/titânia/grafite obtida pelo método sol-gel, possibilitando a detecção em solução aquosa através de eletrodos auto suportados com propriedades diferenciadas, como atividade catalítica e sensibilidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biossensores

Os biossensores são dispositivos capazes de detectar um analito em um meio, seja uma espécie química ou biológica, através da reação química que envolve transferência de elétrons, podendo gerar resultados quantitativos e qualitativos. Ele é capaz de transformar uma informação química em um sinal analítico que pode ser usado na determinação da concentração de um componente. Alguns parâmetros a serem levados em consideração na utilização ou produção desses dispositivos são destacados na tabela 1. O primeiro a ser desenvolvido foi por Clark e Lyons em 1962, quando combinaram a enzima glicose oxidase (GOx) com uma membrana permeável, em eletrodos de Platina (CLARK JR; LYONS, 1962). Tal dispositivo era capaz de detectar o consumo de oxigênio em potenciais de redução, sendo possível quantificar a variação da concentração de oxigênio, que era proporcional à concentração de glicose.

Tabela 1: Descrição das características ideais de um biossensor.

Características	Descrição
Tempo de análise	Análises rápidas com respostas para o analito alvo em “tempo real”
Sensibilidade	Alta sensibilidade permite a detecção de baixas concentrações de analito alvo e baixas análises falso-negativas

Seletividade	A análise específica permite a discriminação entre o analito alvo e outras espécies relacionadas e minimiza análises falso-negativas
Reprodutibilidade	A análise deve ser altamente reprodutível, a fim de fornecer uma análise confiável e de fácil calibração.
Precisão	O dispositivo deve ser altamente preciso, ou seja, resultados falso-positivos e falso-negativos são minimizados.
Robustez	O biossensor deve ser insensível às condições ambientais (temperatura, pH, interferências eletrônicas, e outros)
Custo unitário e operacional	Baixo custo unitário e operacional para reagentes e outros materiais, permitindo uma aplicação mais ampla do sistema de biossensores.
Tamanho e peso	Possibilidade de miniaturização
Regeneração	A capacidade de regeneração da superfície de ligação, permitindo múltiplas medições pelo mesmo elemento é ideal, embora plataformas de uso único é suficiente
Deteção de multianálitos	Um biossensor que pode detectar vários analitos simultaneamente é altamente desejável
Interface com o usuário	Idealmente, são desejados sistemas altamente automatizados, ou que exigem pouco conhecimento e habilidades do operador.

Fonte: ALVES, 2014.

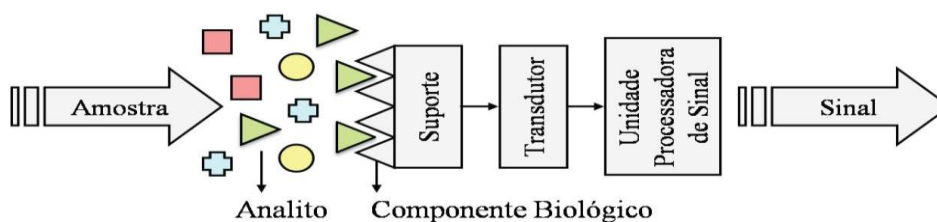
2.1.1. Funcionamento e classificação dos biossensores

Essencialmente os biossensores são constituídos de três partes principais (Figura 1): a primeira é o elemento de reconhecimento biológico - que podem ser enzimas, proteínas com alta atividade catalítica e boa seletividade, anticorpos, proteínas com excelente seletividade similares a enzimas, micróbios, formas de vidas microscópicas que baseiam as medidas no seu metabolismo e apresentam boa estabilidade, ou ácidos nucleicos, que de acordo com a pureza e comprimento influenciam o desempenho do biossensor. É onde o analito alvo interage e é reconhecido seletivamente, gerando um sinal elétrico proporcional em magnitude e/ou frequência à sua concentração. A segunda parte, o transdutor, converte o estímulo gerado em um sinal mensurável (HIGSON, 2009). O amplificador é a terceira parte, onde o sinal convertido é processado de uma forma que seja possível ler e interpretar as informações desejadas.

O transdutor pode ser classificado de diferentes formas: eletroquímico, em que envolve uma reação eletroquímica na superfície do transdutor entre bio-

receptores ou biomarcadores e analitos detectáveis produzindo um sinal eletroquímico. As moléculas de bioreceptor reagem especificamente com analitos alvo que, para serem detectadas, geram um sinal elétrico correspondente em termos de voltagem, corrente, impedância, capacitância, etc (MALHOTRA, 2018). Óptico, constituído de sondas de fibras óticas com o elemento de reconhecimento biológico (normalmente enzimas), tem duas fibras, uma para emissão de luz e outra para detecção da mudança da densidade óptica do meio. Piezoelétricos são transdutores que têm seu funcionamento baseado na frequência de oscilação emitida por um cristal. O elemento biológico (enzima, micróbio, anticorpos, DNA) que está na sua superfície interage com o analito e promove um estímulo elétrico, podendo ocorrer também alteração de massa devido à incorporação da substância, alterando então a frequência detectada. Termométrico/calorimétrico são transdutores que envolvem a emissão ou absorção de radiação eletromagnética na forma de calor que é emitida durante a reação de interação. A escolha do tipo de transdutor vai depender do material biológico que interage com o analito (FURTADO, 2008).

Figura 1: Representação esquemática de um biossensor.

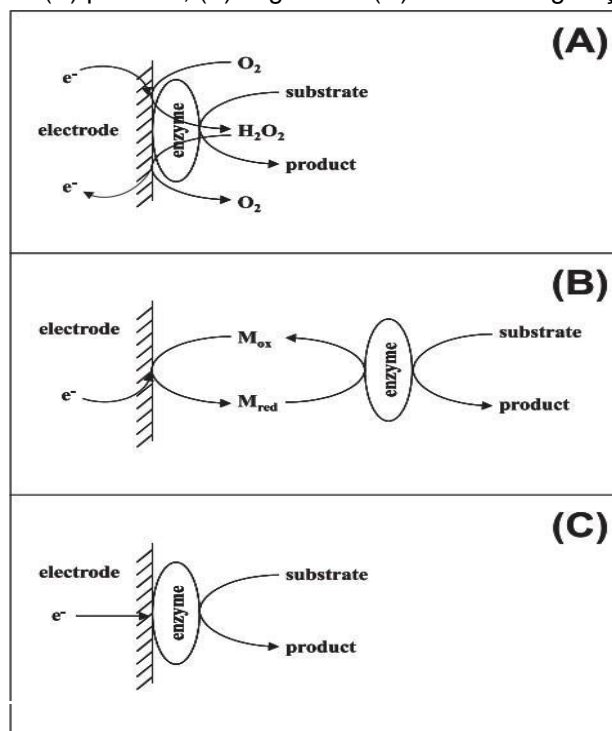


Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2016

Os biossensores eletroquímicos amperométricos são aqueles que têm como princípio de funcionamento a medida da corrente elétrica. Enquanto o potencial varia dentro de uma faixa específica, eles foram sendo aprimorados com o avanço da tecnologia. Existem três formas de distinguir o modo de operação e produção deles. Os de primeira geração são os que têm suas medidas em função de um substrato natural ou de um produto de uma reação enzimática, os de segunda geração utilizam agentes mediadores como transportadores de elétrons para que a reação ocorra, e os de terceira geração são aqueles que utilizam a transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo (Figura 2).

Figura 2: Esquema representando o funcionamento de biossensores eletroquímicos amperométricos de

(A) primeira, (B) segunda e (C) terceira geração

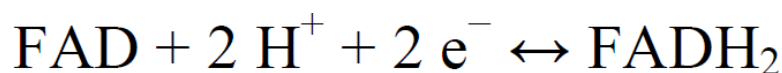


Fonte: Adaptado de FREIRE, 2003

2.1.2. Biossensores eletroquímicos de glicose

Principalmente utilizado na área da saúde, esse tipo de biossensor é de extrema importância no monitoramento dos níveis de glicose em pacientes portadores de doenças como a diabetes. Para que seja possível a detecção da glicose nesses equipamentos sem a interferência de compostos presentes no sangue, como ácido ascórbico e ácido úrico, é necessária a utilização de um baixo potencial, caso contrário os interferentes reagiriam em paralelo com o analito. Para isso são utilizadas moléculas mediadoras e/ou imobilização das enzimas (MASCAGNI, 2017). A alteração na corrente elétrica é causada pelo transporte de elétrons provenientes da reação de oxidação da glicose causada pela enzima GOx, a qual possui em sua estrutura o cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) que é reduzido a FADH₂ conforme a reação da Figura 3. As enzimas imobilizadas em substratos contendo nanomateriais como grafeno, nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas a condução elétrica é maior (TELLECHEA, 2012). Unindo as características de imobilização e transporte direto de elétrons foi obtido um biossensor de terceira geração.

Figura 3: Reação de redução do cofator FAD presente na GOx.

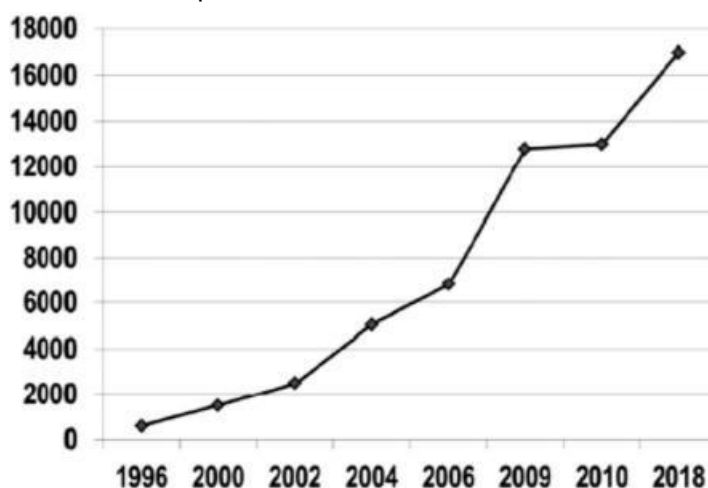


Fonte: Elaborado pelo autor

2.1.3. Biossensores eletroquímicos e a economia

Um biossensor de sucesso e com alta eficiência deve se ajustar aos seguintes parâmetros: ser simples, ter rápida detecção, de fácil operação, com custo competitivo, ter um tamanho pequeno que possibilite a automação e ser adequado para suportar diferentes elementos de reconhecimento biológico. No mundo, é estimado que o investimento anual em pesquisa e desenvolvimento de biossensores chegue a US \$300 milhões, possibilitando a publicação de artigos científicos e a criação de patentes. Na figura 4 vemos a receita em milhões de dólares ao longo dos anos referente à comercialização de biossensores.

Figura 4: Representação gráfica do mercado de biossensores em milhões de dólares, dados de fontes comerciais primárias e secundárias.



Fonte: Adaptado de MALHOTRA; ALI, 2018

Em 2015, aproximadamente 71% da receita foi proveniente dos biossensores eletroquímicos, que engloba os biossensores de glicose, que no mesmo ano contribuíram com o valor de US \$15,3 bilhões, sendo os mais amplamente vendidos (MALHOTRA; ALI, 2018). Eles são comercializados com o nome popular de medidor de glicose, estando disponíveis tanto o aparelho eletrônico quanto as tiras (Figura 5). O equipamento é portátil e simples de utilizar, sendo ele que faz a transdução e o processamento do sinal elétrico, transformando-o em um valor legível e condizente com o nível de glicose sanguíneo. As tiras são onde ocorre a reação eletroquímica que envolve a glicose.

Esses dispositivos e tiras podem ser encontrados facilmente em lojas online e farmácias com uma média de preço de R\$ 56,72 para o aparato

eletrônico, sendo que existem diversas marcas, enquanto que para as tiras, que devem ser compatíveis com a parte eletrônica, o preço médio é de R\$ 1,19. Os preços variam em função da qualidade do produto, por exemplo, algumas tiras possibilitam uma segunda leitura caso seja depositado em menos de 30 segundos após a primeira. Outra questão é o tempo de avaliação, podendo ser de 5 até 10 segundos. A composição das tiras é fornecida por poucos fornecedores, indicando a presença de enzimas GOx e um mediador.

Figura 5: Fotos de aplicação do medidor de glicose (A) e tiras de detecção de glicose (B) ambos da marca G-Tech.



Fonte: Website Magazine Luiza (2021)

2.2 Enzima Glicose Oxidase

As enzimas são, em sua maioria, proteínas, atuam com grande potencial, sendo catalisadores bioquímicos. Podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada (Tabela 2). No geral, a velocidade reacional de uma degradação usando enzimas, em comparação a agentes químicos é muito maior, assim como sua seletividade. Atuam em faixas específicas de pH e temperatura, e caso esses parâmetros sejam alterados correm o risco de sofrerem desnaturação e perderem sua atividade catalítica (MASCAGNI, 2017).

Tabela 2: Classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação catalisada.

Classe nº	Nome da classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoreductases	Transferência de elétrons (íons híbrido ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferências de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas

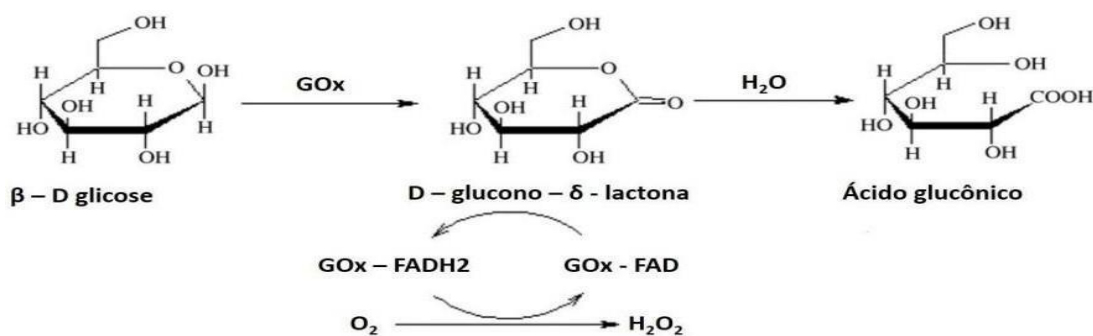
		ou aneis ou adição de grupos a ligações duplas
5	Isomerases	Tranferência de grupos dentro de uma mesma molécula
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-O, C-S e C- N por reações de condensação acopladas à hidrólise de ATP ou cofatores similares

Fonte: Adaptado de NELSON, 2015.

Neste trabalho, temos interesse especificamente nas enzimas de classe 1, oxirredutases, em que se encaixam as enzimas Gox, que são responsáveis por catalisar as reações de oxidação da β -D-glicose em D-glicono- δ -lactona, que posteriormente hidrolisa em ácido glicônico gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essa reação pode ser dividida em duas partes: a primeira etapa é a redução da GOX, em que ocorre a oxidação da β -D-glicose para D-glicono- δ -lactona, reduzindo FAD a FADH2 processo. A segunda parte é a etapa de oxidação, em que a GOx reoxida pelo oxigênio para produzir H_2O_2 (REIS, 2016) (Figura 6). Elas são encontradas naturalmente em uma série de fungos como *Talaromyces flavus*, *Pleurotus ostreatus*, vários do gênero *Penicillium* e alguns insetos. Industrialmente é considerada muito importante, abrange áreas como indústria farmacêutica e de alimentos, sendo usada para controlar o teor alcoólico de vinhos, por exemplo, diminuindo a glicose para que não seja fermentada. Além disso, essa enzima possui atividades antioxidante, conservante e estabilizante em alimentos, contribuindo para a diminuição de oxigênio ativo e, assim como no caso dos vinhos, diminuindo a glicose presente em alimentos para que não ocorram reações indesejadas, como no caso de alimentos que possam sofrer reação de Maillard.

Por último, e mais importante para este estudo, essa enzima tem a capacidade de ser utilizada como forma de detectar glicose em soluções aquosas como o sangue humano, em bebidas e amostras sólidas diluídas (SOUSA, 2017). Possui ponto isoelétrico em pH 4,2 e sua atividade ótima ocorre na faixa de pH entre 3,5 e 6,5. Em questão de temperatura, tem instabilidade notada a partir de 40°C e em temperaturas maiores corre o risco de sofrer desnaturação.

Figura 6: Esquema representando a reação da GOX.



Fonte: Adaptado de SOUSA, 2017

2.3 Imobilização enzimática

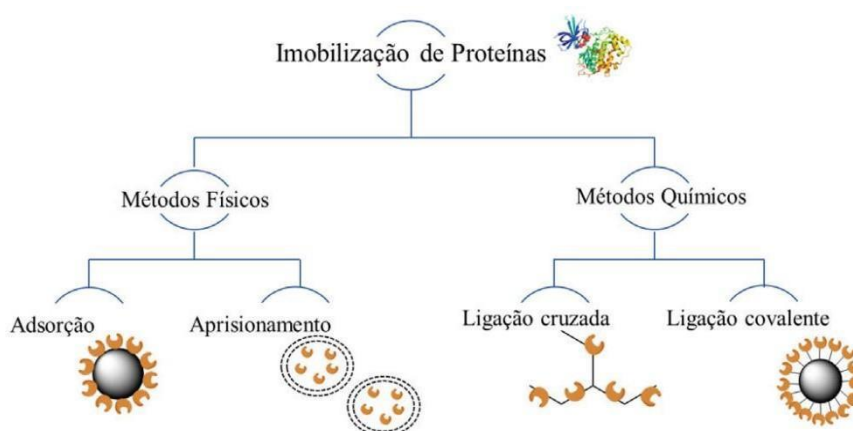
O método de imobilização de enzima é um fator crucial para determinar a sua atividade e desempenhar boa atividade catalítica. Esse termo é utilizado para descrever a retenção de uma biomolécula, técnica que é utilizada desde o século XX nas pesquisas acadêmicas e na indústria almejando diminuir situações adversas como má solubilidade, variações de pH e temperatura, além de possibilitar o reuso, ainda que a atividade catalítica seja reduzida (MESQUITA, 2018). Existem quatro formas principais de fazer a imobilização (Figura 7): adsorção, aprisionamento/encapsulamento, ligação cruzada e ligação covalente. (SANTOS, 2012). De acordo com o apresentado por Mesquita (2018) as quatro formas podem ser assim caracterizadas:

- Adsorção: Uma das primeiras técnicas reportadas, considerada uma das mais simples e rápidas. É um método reversível e sua interação entre enzima e substrato é baseada em forças de Van der Waals, interação hidrofóbica e ligações de hidrogênio, apresenta a desvantagem de dessorção caso sejam variados a temperatura, pH ou força iônica;
- Aprisionamento/encapsulamento: nesse método a enzima é confinada irreversivelmente em uma reticulação polimérica na superfície do suporte, impedindo que ela entre em contato direto com o meio reacional, garantindo maior estabilidade. É um método simples e eficiente, porém, a transferência de massa para o sítio ativo da enzima se torna limitada, além disso, a porosidade do material usado deve ser levada em consideração, pois caso seja muito maior que o tamanho da enzima causará a sua perda;
- Ligação cruzada: nesse tipo de imobilização a enzima forma uma rede rígida e reticulada, é irreversível e as enzimas formam uma estrutura tridimensional complexa. O agente de reticulação possui ao menos duas extremidades reativas

para que possa se ligar nas enzimas. Essa reticulação torna o tempo de resposta do biossensor um pouco mais elevado, além de ser pouco reprodutível, apresentar baixa estabilidade e ter chance de perder a enzima no processo.

- **Ligação covalente:** é um dos métodos mais utilizados, tem como base a formação de ligação através de grupos funcionais da superfície do suporte aos grupos funcionais de resíduos de aminoácidos da enzima. A atividade da enzima vai depender do tamanho, forma, composição do suporte e condições da reação. São utilizados agentes espaçadores para que a enzima tenha só uma ligação ao suporte e fique livre com seu sítio ativo disponível.

Figura 7: Esquema representando formas de imobilização enzimática.



Fonte: Adaptado de FURLANI, 2020.

2.4 Filmes

Em constante estudo e aprimoração, os filmes finos são alvo de pesquisa científico-tecnológica que envolvem áreas como química, biologia, física e engenharias. Eles podem ser condutores, semicondutores ou não condutores, além disso, existe a possibilidade de serem modificados através da dopagem. As principais aplicações incluem áreas de estudo da óptica, medicina, e principalmente em eletrônica, alguns exemplos: displays, circuitos eletrônicos, biomateriais, lentes, revestimento de objetos, células solares. O termo filme significa que a matéria está distribuída de forma planar, em que sua espessura é muitas vezes menor que as outras dimensões. Os filmes finos envolvem o estudo dos materiais e suas características, podendo sua estrutura variar de poucos nanômetros até milímetros, sendo classificados de acordo com a espessura em: nanométricos (0,1 – 100 nm), micrométricos (0,1 – 100 μ m) e milimétricos (0,1 – 100 mm) (ZARPELON, 2014). É importante ressaltar que por apresentarem duas interfaces tão próximas uma da outra, as características e

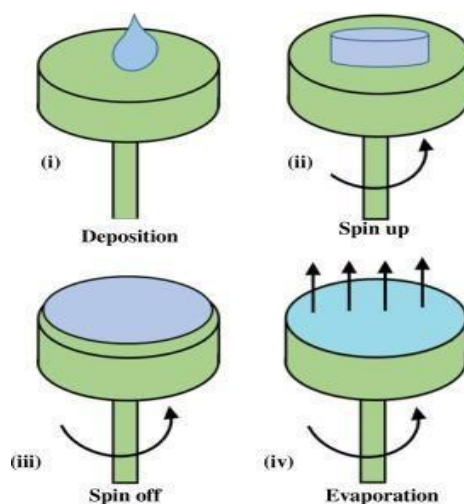
fenômenos que definem o mesmo material em uma espessura maior podem ser diferentes de quanto há a formação de um filme fino, pois a relação superfície e volume é alterada (ECKERTOVA, 2012).

Uma das características relevantes para este estudo é em relação à aderência do filme ao material de suporte, caso não haja contato o suficiente, haverá interferência do sinal eletrônico transmitido e conseqüentemente erro na leitura de dados (DOMINGUES, 2013). Além disso, a forma que o filme fino é formado também influencia nas propriedades. Essa aderência pode ser de dois tipos principais: reação do filme com a superfície do substrato ou formação do filme por deposição sem reação. A segunda forma tem maior relevância para este trabalho, pois engloba a técnica de deposição a partir de líquidos, a qual foi utilizada. Neste processo a espécie, em forma líquida, é gotejada e centrifugada sobre o substrato (TATSCH, 2000).

2.4.1 Spin-coating

Essa técnica tem como fundamento a deposição de um líquido sobre um substrato sob condição de rotação, ocorrendo o espalhamento do líquido na sua superfície através da força rotacional. Parâmetros como rotações por minuto, tempo de rotação e volume de líquido são modificados conforme desejado para que o filme fino seja formado com características específicas. Há quatro estágios envolvidos nessa técnica (Figura 8): deposição do fluido, aceleração do substrato, remoção de excesso do fluido e evaporação das espécies voláteis enquanto rotaciona em velocidade constante (TYONA, 2013).

Figura 8: Representação esquemática das 4 etapas da técnica de spin coating.



Fonte: YILBAS, 2019

2.5 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas (Nps) metálicas são agregados de átomos de um elemento metálico, como ouro, prata e cobre, que possuem tamanho definido para aplicação nanotecnológica. Assim como nos filmes finos, as propriedades das Nps são diferentes do material na sua forma massiva, também denominado de “bulk” (SANTOS 2015). As nanopartículas de ouro (AuNps) apresentam boa compatibilidade com materiais biológicos, boa resistência mecânica e alta condutividade elétrica, tornando-as ótimas para a produção de biossensores. Além disso, as Nps aumentam a sensibilidade do sensor ou biossensor através da transferência direta de elétrons entre o centro ativo da enzima e o eletrodo, sem a necessidade da utilização de uma espécie química mediadora (JANEGITZ, 2012). Apesar de serem utilizadas em tecnologias avançadas, as Nps metálicas vêm sendo identificadas em diversos artefatos históricos da humanidade (Figura 9).

Figura 9: Imagem da Taça de Lycurgus



Fonte: Página Ovni Hoje (2017)

As AuNps apresentam baixa toxicidade, ampla faixa útil de potencial eletroquímico, baixa reatividade e biocompatibilidade, exibem uma coloração vermelho escuro quando estabilizadas e são as que apresentam maior estabilidade após adição de um agente químico estabilizante. Elas são muito utilizadas em áreas de desenvolvimento de nanoeletrônica, sensores, ótica e catálise (JANEGITZ, 2012). Na área biotecnológica, as AuNps têm mostrado grande motivação de estudo, tendo aplicações em sistemas de entrega de fármacos e detecção de imagem para diagnósticos de doenças. Além disso, podem ser utilizadas em cosméticos promovendo o anti-envelhecimento na pele e maior brilho em batons e cabelos através de shampoos.

Uma característica interessante das Nps de Ouro, também de Prata e Cobre é a ressonância de elétrons de condução na superfície, causada pela incidência da luz eletromagnética, que faz a coloração que vemos mudar de acordo com o tamanho da partícula e sua forma, ou seja, somente Nps que absorvem na região do UV-Visível (CASANOVA, 2010). Particularmente, os biossensores utilizando as AuNps têm grande relevância pelas características apresentadas. Elas serão sintetizadas e discutidas nesse estudo através da imobilização na forma de filmes finos em um substrato condutor.

2.6 Suportes

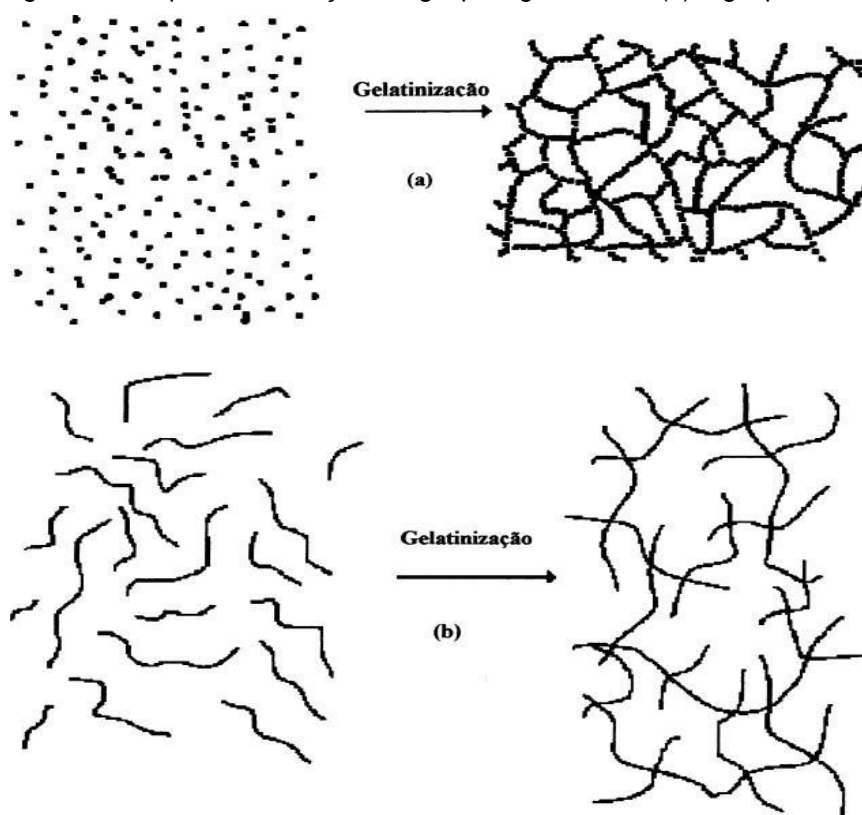
Alguns compósitos são utilizados como base para imobilização de materiais biológicos e químicos. Em se tratando de casos em que são utilizados como biossensores eletroquímicos, esses materiais devem possuir a característica de condução eletrônica, assim como aspectos morfológicos específicos, tais como porosidade para facilitar a transferência de massa e

funcionalidade da superfície para imobilização dos transdutores. A sílica, polímeros, quitosana e carbono cerâmico são alguns exemplos de materiais utilizados para obtenção desses suportes, muitas vezes, para a obtenção de propriedades ampliadas e/ou modificadas é utilizada a técnica de dopagem, na qual são adicionados outros elementos ao material matriz (BENVENUTTI, et al., 2009).

2.6.1 Sol-Gel

Tal método é baseado na polimerização de uma suspensão de partículas coloidais estáveis em um líquido (sol), para a formação de uma estrutura rígida de colóides (gel coloidal) ou para a formação de cadeias poliméricas (gel polimérico), que retém a fase líquida no interior de sua estrutura tridimensional (ALFAYA, 2002). Essa polimerização pode ocorrer de duas formas distintas (Figura 10). É considerada um método atrativo e versátil devido à possibilidade de controle de temperatura, pH, tipo de precursor, concentração e catalisador, possibilitando a formação de materiais com as mais diversas características e aplicações (MARONEZE, 2008).

Figura 10: Esquema da reação sol-gel pelo gel coloidal (a) e gel polimérico (b).



Fonte: Adaptado de ALFAYA, 2002

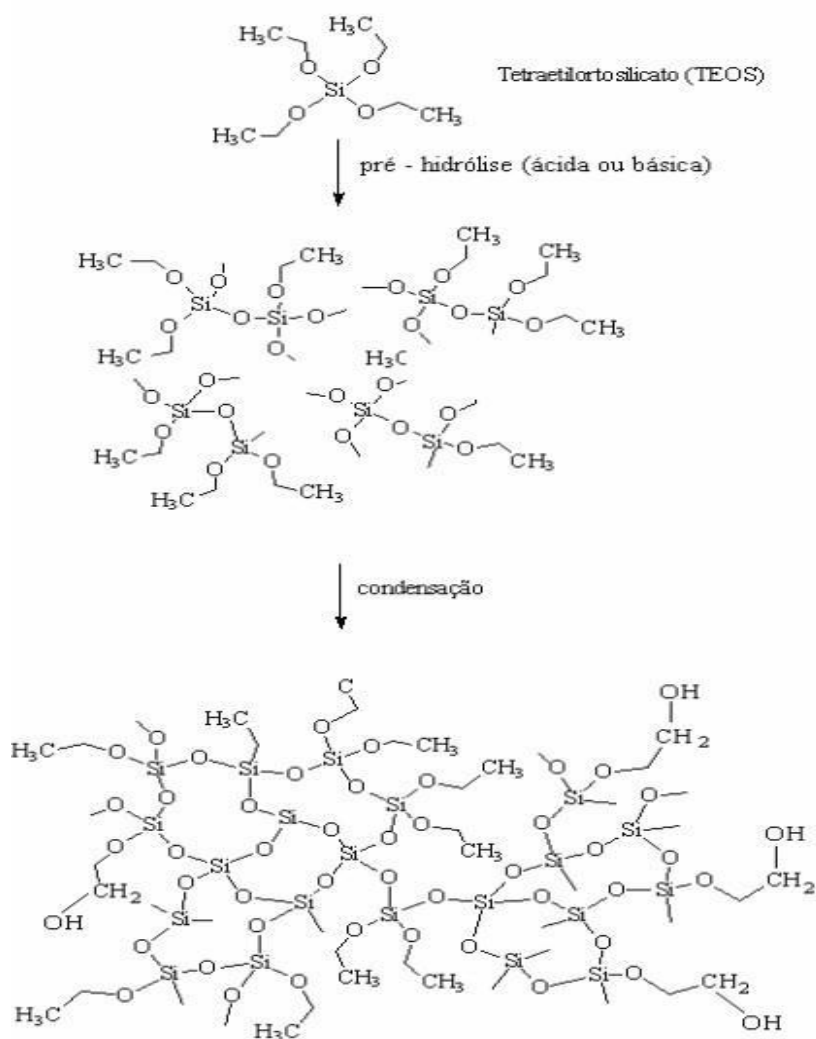
Os alcóxidos inorgânicos são os precursores mais utilizados nesse método. A reação que dá origem ao gel pode ser catalisada em meio ácido ou básico, ocasionando a hidrólise do alcóxido, formando grupos ativos, e a posterior formação da estrutura condensada (Figura 11). É importante ressaltar

que ambas as reações de hidrólise e condensação ocorrem de forma simultânea no meio reacional.

No presente trabalho, foram utilizados os reagentes chamados Tetraetilortosilicato (TEOS) e Tetraisopropóxido de Titânio (TIPO) como reagentes para a formação de um óxido misto, apresentando como vantagem a união da resistência mecânica e da estabilidade térmica da sílica proveniente do TEOS com as propriedades semicondutoras e reativas da titânia proveniente do TIPO. Envolve o processo de hidrólise e condensação de um alcóxido metálico, portanto, um cuidado extra deve ser tomado quanto à possibilidade de precipitação, que é causada pela diferença de eletronegatividade do átomo central.

Para a formação de um óxido misto mais homogêneo possível, é preciso realizar a catálise ácida, na qual o próton é atacado pelos oxigênios ligados ao átomo central. A catálise básica promoveria uma hidrólise através do ataque ao átomo central, visto que o íon catalisador é o hidróxido e acabaria hidrolisando preferencialmente o que for menos eletronegativo, pois estaria com menos densidade eletrônica. No caso, ocorreria a hidrólise preferencial do TIPO devido à sua maior eletropositividade em relação ao TEOS. Outra forma mais branda de garantir a homogeneidade é fazendo uma pré-hidrólise do reagente menos reativo (TEOS), e só após um período determinado adicionar o mais reativo (TIPO) (MARONEZE, et al. 2008), que foi a forma utilizada neste estudo.

Figura 11: Esquema da reação sol-gel para o TEOS.



Fonte: Adaptado de MARAFON, 2008.

Apesar de apresentar alta área específica, presença de poros na sua estrutura, boa resistência térmica e mecânica, os materiais a base de sílica não são bons condutores de eletricidade. A presença de um óxido metálico na sua estrutura, como a titânia, atuando como um mediador que facilita a transferência de elétrons e potencializa a reatividade devido à capacidade de interação com espécies ácidas, não é suficiente para que o material seja um bom condutor elétrico. Para isso, o óxido misto de $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ necessita da adição de alguma espécie com boa condução elétrica, um exemplo é a adição de carbono grafite dando origem a um eletrodo de carbono cerâmico (ECC) com grande potencial para produção de sensores eletroquímicos (LARANJO, 2016).

2.6.2 Eletrodo de carbono cerâmico

Quando a uma matriz de sílica obtida pelo método sol-gel é adicionado

algum tipo de carbono, seja ele em forma de grafite, nanotubos, carbono vítreo etc, essa matriz passa a ser chamada de eletrodo de carbono cerâmico, proporcionando um aumento na sensibilidade do eletrodo devido à maior condução elétrica. Com o ECC é possível obter uma boa reprodutibilidade e estabilidade, em comparação aos eletrodos de pasta de carbono, os quais apresentam desvantagens devido à utilização do óleo mineral, que se dosado de forma errada promove uma resistência elevada e prejudica a análise (CIÓRCERO, 2019). Existem alguns fatores durante a síntese que podem definir as propriedades desses ECCs. Levando em consideração a análise a ser feita, o precursor pode ser hidrofílico ou hidrofóbico. A maioria dos trabalhos publicados é de precursores hidrofóbicos, os quais dificultam a interação da superfície do eletrodo com o eletrólito, ocasionando uma maior sensibilidade e diminuição da corrente de fundo. Já os precursores hidrofílicos proporcionam um processo de adsorção eletroquímica reversível através do sistema redox, além de apresentar boa condutividade.

Outra forma de alterar as propriedades do ECC é em relação à forma alotrópica do carbono utilizado, assim como a proporção entre o precursor, o carbono e o catalisador. A proporção varia de acordo com os tipos de carbono e precursor, devendo ser avaliada individualmente. Quanto ao catalisador, foi observado que quando utilizado na forma ácida ($\text{pH} < 7$) e com pouca água, a tendência é formar um sólido denso com poros pequenos, com catalisadores básicos ($\text{pH} > 7$) e maior teor de água o contrário é notado, forma-se um sólido mais poroso (SKEIKA, 2009).

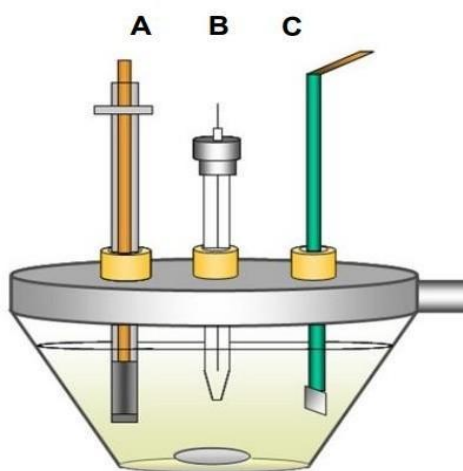
2.7 Técnicas eletroquímicas

São de extrema importância para análises envolvendo sensores químicos, apresentando uma ampla faixa de concentração para trabalho e estado físico da amostra. As técnicas eletroquímicas utilizadas para análises envolvem os fenômenos que ocorrem entre a superfície do eletrodo e a solução, ou então é avaliado o comportamento dos fenômenos da própria célula. A aplicação de maior interesse para o desenvolvimento deste trabalho se dá justamente na interação do eletrodo com a solução, ou seja, de forma interfacial. Esse método envolve a passagem de corrente através do eletrodo devido à aplicação de um potencial fixo ou intervalo de potencial (MARTINS, 2019).

As células eletroquímicas são um dos dispositivos utilizados nessas análises, elas são definidas por um aparato composto por dois ou mais eletrodos, que garantem a reação eletroquímica e medida de um dos parâmetros. Tratando

especificamente das células utilizadas neste trabalho, temos um recipiente contendo um eletrólito, ao qual está presente também o analito, um eletrodo de referência (ER) com potencial constante nas condições estudadas, o qual terá suas medidas comparadas ao eletrodo de trabalho. O eletrodo de trabalho (ET) é o que detectará de fato o analito através da aplicação de um potencial, nele encontra-se a modificação da matriz condutora e/ou superfície. Por último, temos o eletrodo auxiliar (EA), devido ao seu uso não são detectadas mudanças de potencial no eletrodo de referência, que poderiam ser causadas pelas reações eletroquímicas no eletrodo de trabalho (Figura 12) (LIMA, 2011).

Figura 12: Representação de uma célula eletroquímica contendo (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo de referência e (C) eletrodo auxiliar.

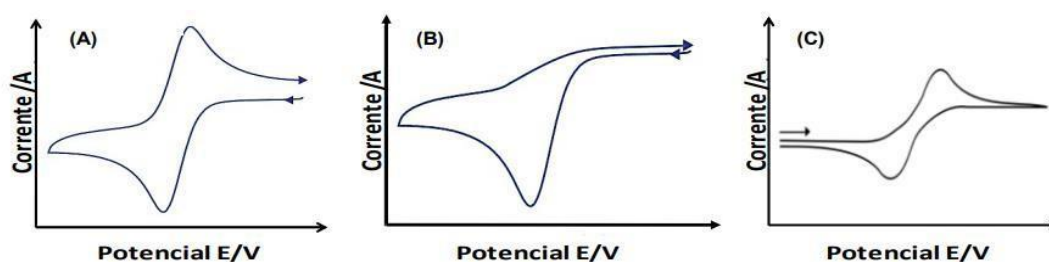


Fonte: Adaptado de ZAMARCHI, 2019.

2.7.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica que utiliza como equipamento eletrônico um potenciostato. Ocorre quando é medida a corrente através de um ET, enquanto é variado o potencial. Com o tempo, a magnitude da corrente resultante é proporcional às informações do analito em solução. Nesse sistema, é possível escolher a velocidade da varredura e também a faixa da aplicação do potencial. É o método mais aplicado na detecção qualitativa de reações eletroquímicas, como determinação de potencial de oxidação e acompanhamento de reações (LIMA, 2011). Com os resultados desse método, é possível plotar um gráfico relacionando a corrente medida com o potencial aplicado. Esse gráfico chama-se voltamograma e dependendo do formato apresentado e das informações nele contidas conseguimos dizer qual reversibilidade do eletrodo (Figura 13).

Figura 13: Voltamogramas cíclicos para sistemas reversíveis (A), não reversíveis (B) e quase reversíveis (C).



Fonte: Adaptado de ZAMARCHI, et al. 2019

Quando a varredura começa em direção ao potencial positivo, é presumido que a espécie do sistema redox esteja na sua forma reduzida, portando a parte superior do voltamograma é referente à oxidação, e a de baixo à redução. Quando os picos de corrente anódica e catódica tiverem sua razão próxima de 1 e a diferença do potencial dos picos for próxima de $0,059/n$ V, em que n é o número de elétrons envolvidos nas semi-reações, significa que o processo redox é reversível. Caso as condições saiam desse padrão é um indicativo que a transferência de elétrons é lenta no eletrodo (LARANJO, 2016).

2.7.2 Cronoamperometria

É uma técnica bastante utilizada na eletrodeposição de metais que utiliza, assim como a voltametria cíclica, o potenciostato e uma célula eletrolítica. Consiste na passagem de potência constante através do ET para detectar qual a corrente gerada com o passar do tempo. O que acontece na superfície de um eletrodo submetido a esta análise é a oxidação ou redução do analito, assim que for submetido à certa potência. Caso a concentração do analito seja relacionada linearmente com a corrente detectada, esse sensor pode ser denominado sensor amperométrico (SILVA, 2008). Os resultados de variação da corrente em função do tempo são registrados em um cronoamperograma.

3. Objetivos

- Desenvolver uma plataforma eletroquímica para detecção de glicose em solução aquosa.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver uma metodologia reprodutível pela técnica sol-gel

para a obtenção de um compósito condutor a base de sílica, titânia e carbono grafite;

- Obter e estabilizar nanopartículas de ouro em solução, desenvolver um método simples para imobilização de nanopartículas de ouro sobre o compósito sílica/titânia/grafite;
- Desenvolver uma metodologia para imobilização da enzima glicose oxidase sobre o compósito na forma de filmes utilizando o método sol-gel e a técnica *spin-coating*;
- Realização de testes eletroquímicos das plataformas para avaliar a possibilidade de aplicação como biossensor de glicose;
- Elaborar os custos de produção em laboratório dos dispositivos obtidos e comparar com as tiras detectoras de glicose já comercializadas.

4. Desenvolvimento experimental

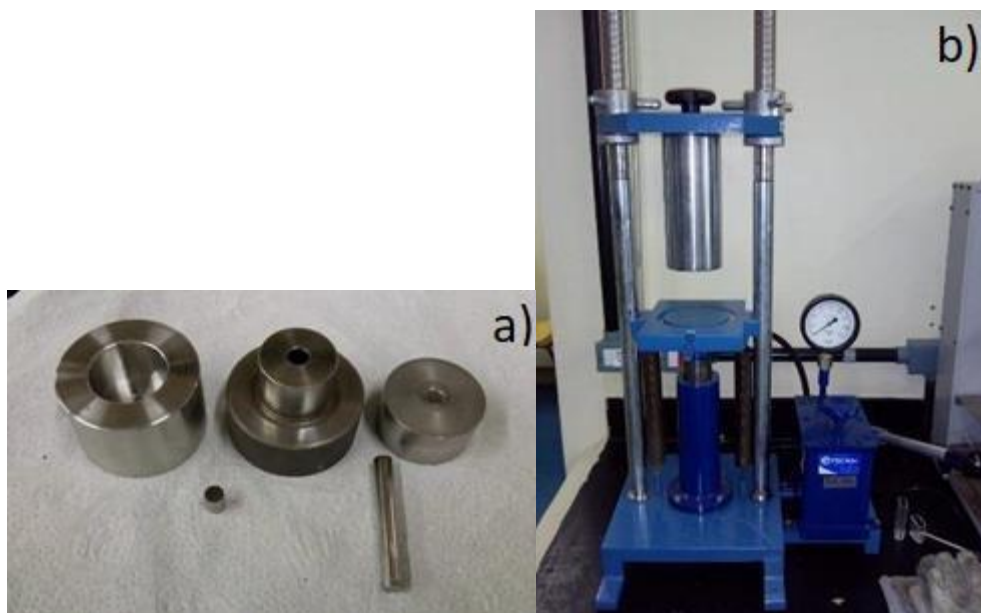
4.1. Obtenção do compósito condutor sílica/titânia/carbono grafite, $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{C}$ -grafite

Para a síntese do substrato condutor, foram necessários os seguintes equipamentos: sistema de refluxo (condensador), agitador magnético e um sistema de aquecimento por banho de óleo (aquecedor e agitador são o mesmo equipamento). Na primeira etapa, ocorreu a hidrólise em meio ácido do precursor de sílica com etanol como solvente. Em um balão de três bocas acoplado ao sistema, foi adicionado 12,0 mL de etanol 99,5%, 5,0 mL de TEOS 98%, 1,6 mL de água destilada e 1,0 mL de HCl 37%. O sistema foi mantido a 80°C por 2 horas até que todo o TEOS fosse hidrolisado e a solução se tornasse homogênea. Na segunda etapa, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e transferida a um béquer, ao qual foi adicionado, sob agitação magnética, 2,0 mL de TIPOT, 1,0 g de grafite em pó e 5 gotas de ácido fluorídrico como catalisador. Em uma última etapa, após homogeneização da solução através da hidrólise de todos compostos, o mesmo béquer foi acoplado em um sistema de ultrassom para promover a geleificação. Após a formação do gel, a amostra ficou por 2 dias em uma chapa de aquecimento a 50°C para todo o solvente secar e formar um sólido escuro.

O sólido resultante foi triturado na pedra de ágata e lavado duas vezes com etanol, duas vezes com água e novamente duas vezes com etanol. Após a lavagem, o material foi seco de duas formas, a primeira foi em um forno durante

1 hora em temperatura de 100°C, a segunda forma foi em uma bomba de vácuo com aquecimento na temperatura de 120°C por mais 1 hora, resultando em aproximadamente 7,0 g. De posse do compósito matriz foram produzidas pastilhas de 6 mm de diâmetro e aproximadamente 1mm de espessura, utilizando a prensa e o pastilhador (Figura 14), para o qual foi pesado aproximadamente 25 mg do material e prensado com 1,5 toneladas por 3 minutos.

Figura 14: a) Pastilhador e b) Prensa hidráulica utilizada para fazer as pastilhas condutoras



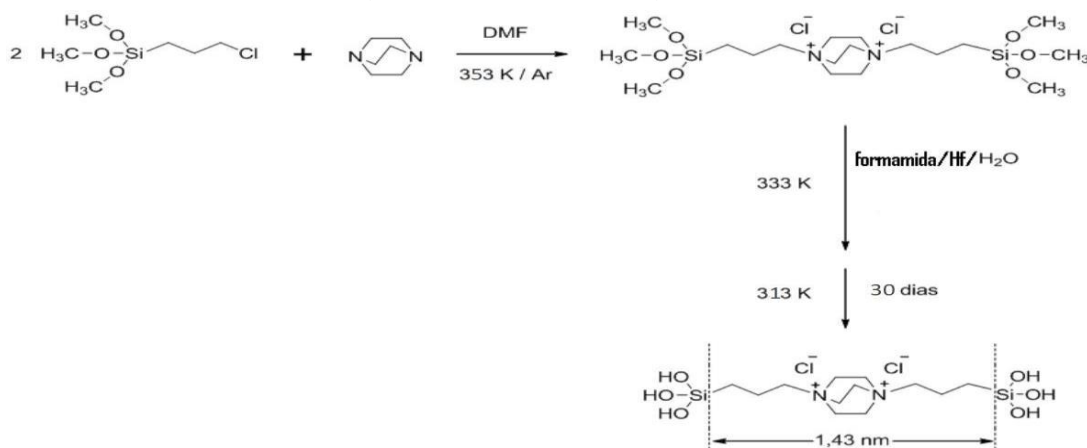
Fonte: Fotos do autor

4.2. Síntese do estabilizante de nanopartículas de ouro (AuNps)

O silsesquioxano, contendo o grupo 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano conhecido como DABCO de duas pontas (R_2 DABCO) (Figura 15), é um estabilizante de nanopartículas metálicas utilizado com frequência em laboratórios de pesquisa (SCHNEID, 2018). Para sua síntese foi montado um sistema de refluxo de água (condensador), atmosfera inerte de Argônio, agitação magnética e aquecimento. Foram adicionados em um balão de três bocas acoplado ao sistema 0,897 g do reagente 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano (DABCO), e posteriormente adicionados 20,0 mL de DMF (N,N-dimetilformamida), e por último 3,0 mL de 3- cloropropiltrimetoxisilano (CPTMS), ambos com auxílio de seringa na adição. O sistema foi deixado nessas condições por 72 horas na temperatura de 80°C, até que se formasse um sólido branco precipitado. O sólido precipitado foi removido do balão, foi lavado com metanol e filtrado a vácuo. Posteriormente foi seco em estufa por 90 minutos a 80°C.

Para a obtenção do produto silsesquioxano R₂DABCO, foram dissolvidas 3,054g do sólido branco em 25 mL de Formamida, 0,65 mL de água e 5 gotas de HF. A dissolução foi feita com agitação e temperatura de 60°C. Após a completa dissolução, foi deixado gelificar em placa de petri por aproximadamente 30 dias na chapa de aquecimento a 40°C. Em uma última etapa o R₂DABCO foi moído em pedra de ágata, pesado e armazenado no dessecador, tendo 3,0 g finais.

Figura 15: Representação simplificada das reações de síntese do R₂DABCO.



Fonte: Adaptado de MACHADO, 2014

4.3. Preparação das AuNps

De posse do estabilizante silsesquioxano R₂DABCO, 0,2 g foram dissolvidas em 12,0 mL de água em agitação e temperatura de 60°C. Após a homogeneização e o resfriamento, foram adicionados 2,0 mL de ácido cloroáurico (HAuCl₄) em concentração de 0,15 mmol L⁻¹ e 10,0 mL de solução 0,02 mol L⁻¹ de borohidreto de sódio (NaBH₄), que é necessário preparar na hora para que sua característica redutora seja aproveitada ao máximo. A solução resultante adquiriu uma coloração vermelho escuro, e foi deixada descansar por 24 horas para que as AuNps fossem estabilizadas.

4.4. Preparo da solução hidrolisada coloidal “sol” TEOS/GOx

Nessa parte, a temperatura e o pH da solução foram devidamente monitorados, pois a GOx pode sofrer desnaturação em temperaturas acima de 40°C. Em relação ao pH, caso seja levado a condições extremas também pode desnaturar, porém o maior cuidado foi devido à faixa de pH em que apresenta a melhor atividade, que é no intervalo de 3,5 < pH < 6,5. Em agitação e temperatura ambiente, foi hidrolisado 6,0 mL de TEOS com 1,2 mL de solução HCl 0,01 mol L⁻¹. Após a hidrólise o pH foi levado até 6,5 com adição de gotas de solução de

NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e as medidas foram feitas com fitas de pH. Dessa solução de TEOS hidrolisado foi pipetado 1,0 mL em um béquer pequeno em banho de gelo com posterior adição de 0,6 mL de solução aquosa da enzima na concentração de 10 mg mL^{-1} .

4.5. Formação de filmes utilizando a técnica *Spin-Coating*

Para formar os filmes finos de AuNps e Gox, foi utilizada a técnica de *spin-coating* empregando equipamento Spinner assy WS-650Mz-23NPPB (Figura 16). Inicialmente, foram colocadas as pastilhas $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{C}$ -grafite no equipamento, utilizando suporte para substratos pequenos em que a pastilha se encaixa perfeitamente. Após fixação da pastilha e ambientação da atmosfera inerte do equipamento, 1 gota da solução de AuNps foi pipetada com uma pipeta pasteur sobre a superfície da pastilha, e foi iniciado o processo de rotação a 1500 rotações por minuto (RPM) durante 3 minutos, sendo que uma segunda gota foi adicionada na metade do tempo. As pastilhas com as AuNps foram deixadas para secar a temperatura ambiente durante 24h.

Para a formação do filme fino de enzimas sobre as pastilhas o mesmo procedimento para as AuNps foi utilizado, porém a solução de TEOS/GOx foi preparada no mesmo dia em que a formação de filmes foi feita para garantir maior atividade das enzimas antes que elas fossem degradadas. Nesse caso, as pastilhas foram deixadas para secar durante 24 horas na geladeira.

Devido à fragilidade das pastilhas $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{C}$ -grafite frente a fixação a vácuo do equipamento, o manuseio foi realizado com muito cuidado para evitar a quebra das pastilhas. As pastilhas foram coladas com super bonder gel em um tubo de vidro de 6 mm de diâmetro e aproximadamente de 15 cm de comprimento. Esse conjunto foi utilizado como eletrodo para as medidas eletroquímicas, cuidando da vedação total para que não entrasse água, ou então derramasse o carbono grafite utilizado no seu interior em forma de pó para promover maior contato físico durante os testes de laboratório.

Figura 16: Equipamento Spinner assy WS-650Mz-23NPPB.



Fonte: Foto do autor

4.6. Técnicas de caracterização

4.6.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET)

A MEV foi utilizada para visualizar a morfologia dos materiais, ou seja, analisar as características da superfície do material. O equipamento utilizado foi JEOL JSM 6060 usando 20kV. A técnica permite um aumento muito significativo na imagem, devido a isto as amostras na forma de pó foram dispersas em quantidades pequenas sobre uma fita condutora de cobre sobre uma base de alumínio. As amostras passaram, então, por uma etapa de metalização, em que uma camada de ouro é posta no material. No caso da análise da pastilha contendo o filme fino de AuNps, a metalização ocorreu com grafite. Já a MET possibilita a obtenção de imagens da própria solução de AuNps. Foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM modelo 2010 em 80kV. Nesse equipamento, duas gotas da dispersão de nanopartículas foram colocadas em um porta-mostra de cobre revestido com carbono que foi então levado a secagem para posterior visualização.

4.6.2. Espectroscopia no ultravioleta-visível

Os espectros no UV-Vis da amostra da solução de AuNPS estabilizadas foram realizados em um espectrofotômetro Varian 50 Conc.

4.6.3. Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio N₂

Os métodos BET e BJH são técnicas baseadas na teoria matemática que tem como objetivo descrever a adsorção e dessorção de gás nitrogênio (N₂) na superfície de materiais, tendo como resultado dados que podem ser relacionados com as características dos poros e área superficial (BARDESTANI, et al. 2019). As amostras de aproximadamente 50 mg foram previamente tratadas a temperatura de 120 °C, sob vácuo durante 8h, para então serem submetidas à adsorção e dessorção de N₂, fornecendo dados para a obtenção de isotermas. Nessa etapa a temperatura utilizada foi do nitrogênio líquido (-196°C), o equipamento utilizado foi um Tristar Krypton 3020 Micromeritics. A área específica dos materiais foi calculada pelo método BET e a distribuição do tamanho de poros foi obtida usando-se o método BJH.

4.6.4. Medidas eletroquímicas

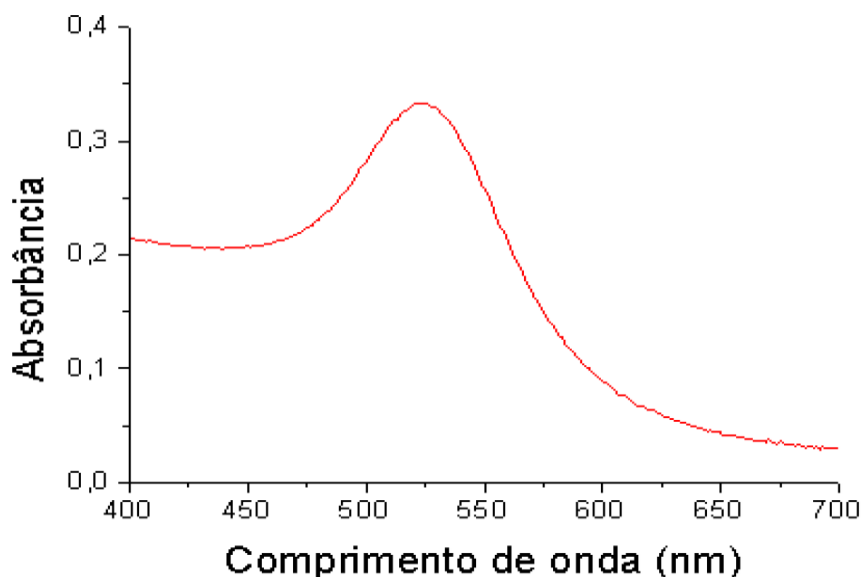
Duas técnicas foram aplicadas para obtenção dos resultados, a voltametria cíclica e a cronoamperometria. Ambas utilizam o equipamento eletrônico chamado potenciostato IVIUM em conjunto de um computador e célula eletroquímica com solução eletrolítica, contendo uma solução de prova a base de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio (K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]) na concentração de 1 mmol L⁻¹, cloreto de potássio (KCl) em 0,1 mol L⁻¹, na presença de tampão fosfato (PBS) de concentração 0,05 mol L⁻¹ em pH 7.0. Para a voltametria cíclica foi utilizado um potencial de varredura de -0,3 a 0,9 V e uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. Um voltamograma cíclico foi obtido para uma solução eletrolítica sem a solução de prova, porém com adição de solução de glicose 70 mmol L⁻¹ na faixa de potencial de -1,0 a 0,6V na velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, enquanto que para a cronoamperometria o potencial foi fixado em -0,4 V com adições da solução de glicose na solução eletrolítica até obtenção final de concentração de glicose ser 9,7 mmol L⁻¹.

5. Resultados e discussão

O teste de espectroscopia de UV-Vis possibilitou analisar o comprimento de onda que as nanopartículas estabilizadas com o silsesquixano R₂DABCO absorvem. Aproximadamente em 525 nm é a região em que a maioria das nanopartículas de ouro obtidas por métodos semelhantes absorvem, na região da cor verde e como cor complementar (observada) roxo-vermelho. Podemos

analisar pela Figura 17 que há uma estabilidade no tamanho das nanopartículas de aproximadamente 10 nm de diâmetro, pois só há absorção em um determinado comprimento de onda, indicando que o estabilizante (silsesquioxano) está corretamente estruturado com as AuNps (AMENDOLA, , et al., 2009; MAYYA, et al. 2003; SCHNEID, 2018).

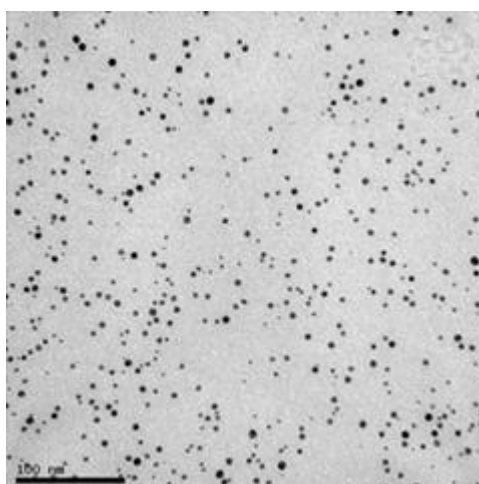
Figura 17: Gráfico de UV-visível para a solução de nanopartículas de ouro.



Fonte: Elaborado pelo autor

Pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, Figura 18, é possível observar que as nanopartículas possuem tamanho menor que 10 nm, apresentando tamanho regular e estabilidade.

Figura 18: Imagem de microscopia eletrônica de transmissão das AuNps com magnificação de 300.000X.

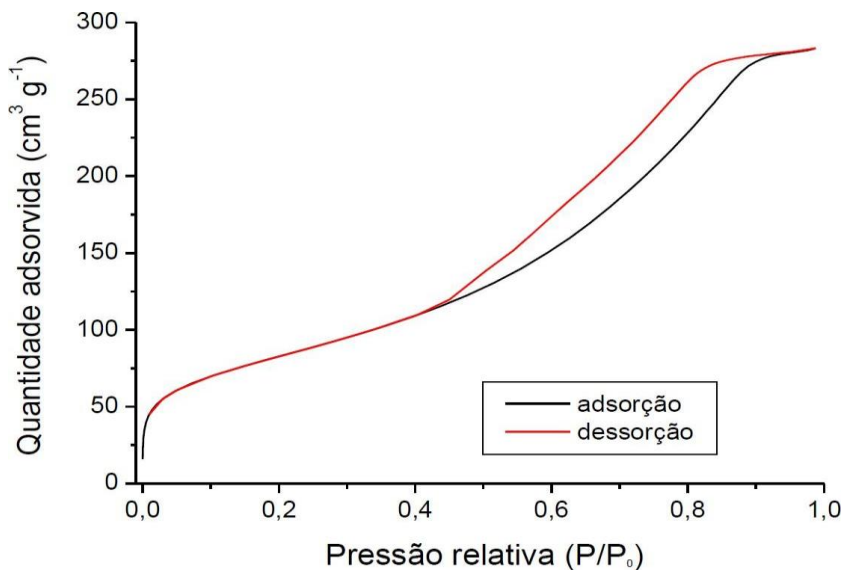


Fonte: Foto do autor

O material condutor SiO₂/TiO₂/Grafite apresentou uma área específica BET de 290 m²g⁻¹ e um volume de poro de 0,417 cm³g⁻¹. As isotermas de adsorção e dessorção do material obtidas na temperatura do N₂ líquido (Figura

19) evidenciam a presença de uma histerese e um aumento da quantidade de adsorção de nitrogênio em uma pressão relativa de P/P_0 acima de 0,4, sendo um comportamento típico de materiais mesoporosos (poros maiores que 2 nm).

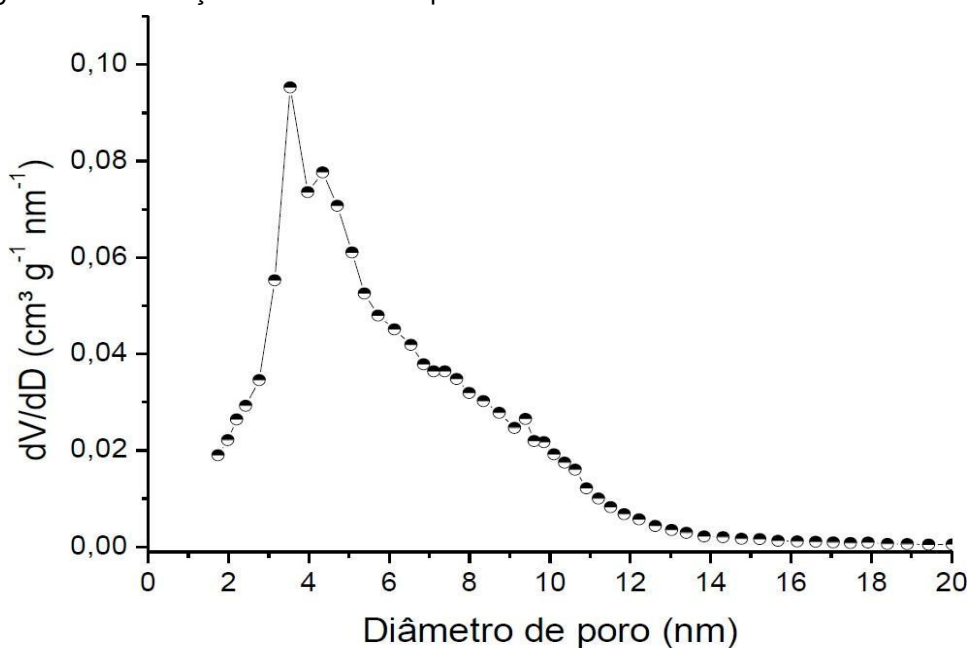
Figura 19: Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio do material condutor SiO₂/TiO₂/C-Grafite.



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 20 exibe o perfil da distribuição do diâmetro de poros obtidos pelo método BJH. Observa-se que o material apresenta região de poros entre 2 e 10 nm de diâmetro com um máximo em 3,5 nm.

Figura 20: Distribuição de tamanho de poros do material condutor

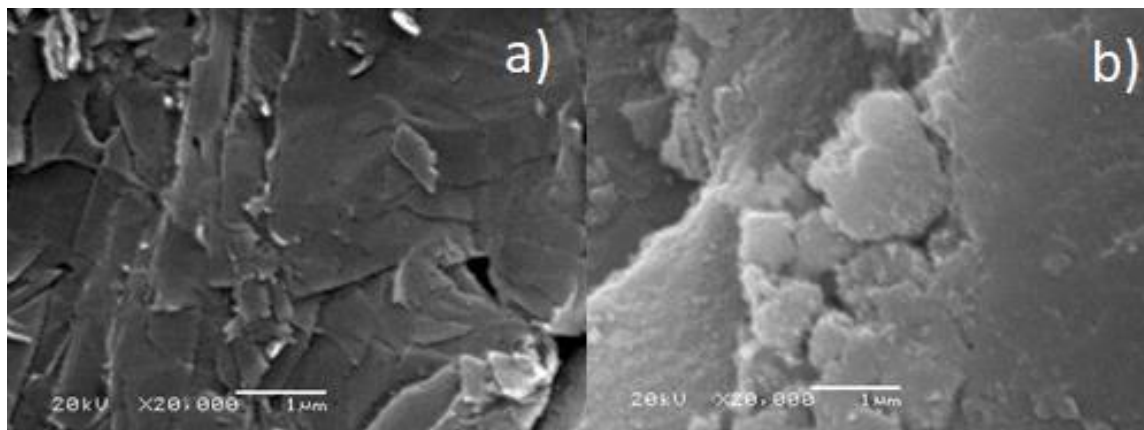


Fonte: Elaborado pelo autor

Mediante as imagens de MEV obtidas a 20,000X do compósito condutor (Figura 21) é possível observar nesta magnitude que o material apresenta a superfície compacta com presença de algumas zonas de rugosidade. Foi

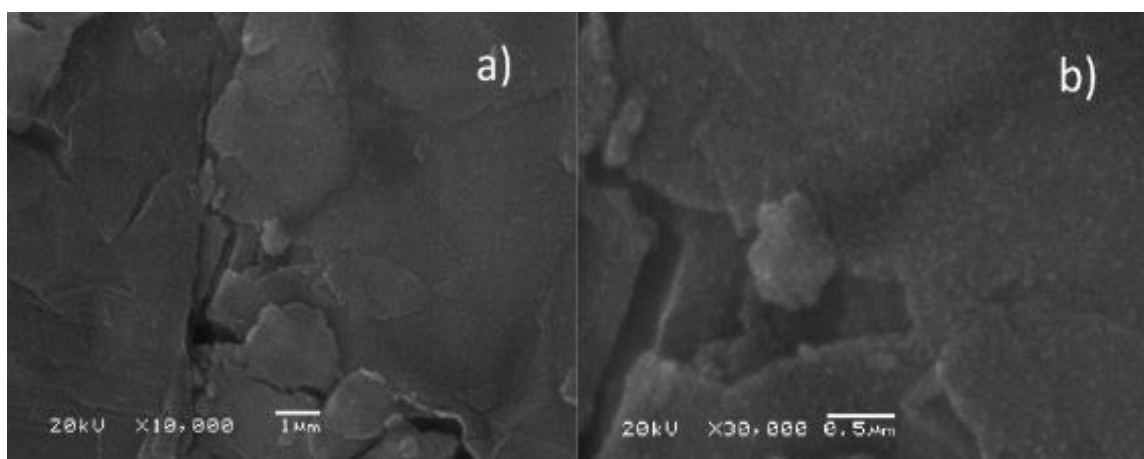
possível também analisar uma alteração na superfície da pastilha com a presença do filme fino de AuNps (Figura 22), a qual apresenta rugosidade mais acentuada evidenciada por pequenos pontos esbranquiçados nas imagens. Isso se caracteriza pela presença de nanopartículas dispersas na superfície.

Figura 21: Imagens obtidas com MEV a 20,000X do material condutor SiO₂/TiO₂/C-Grafite em a) uma região e em b) outra região.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 22: Imagens obtidas com MEV da pastilha do material condutor SiO₂/TiO₂/C-Grafite/AuNps a a) 10000X e b) 30000X.

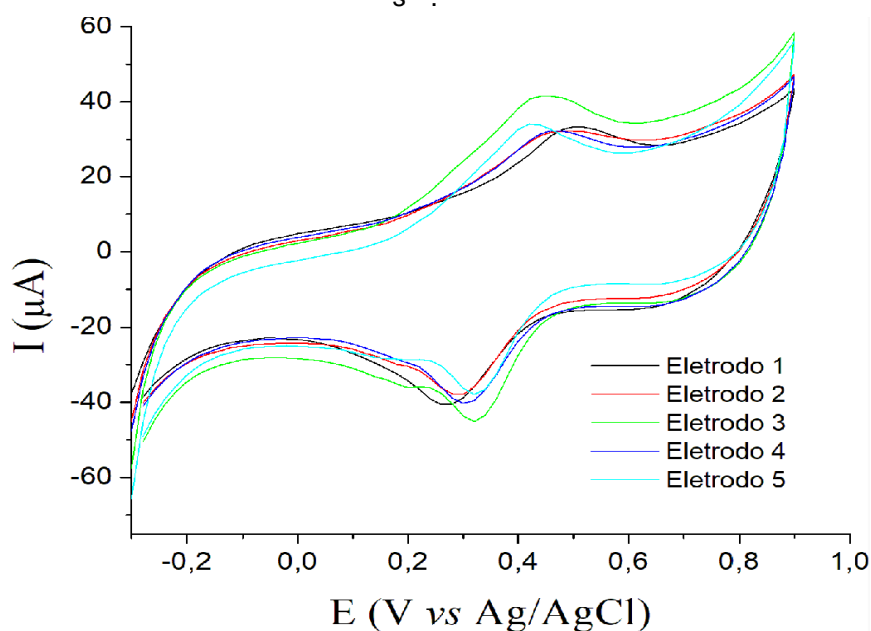


Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados de voltametria cíclica para os eletrodos contendo as plataformas de SiO₂/TiO₂/C-grafite e utilizando a solução K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆] com concentração 1,0 mmol L⁻¹ são mostrados na Figura 23. Em cada eletrodo é observado um par de picos anódico (I_{pa}) e

catódico (I_{pc}) com potencial médio $E_{1/2}$ aproximado de 0,32 V, atribuídos à oxidação e redução dos íons Fe^{+2}/Fe^{+3} , sendo que sua razão I_{pa}/I_{pc} foi de 0,83. Além disso, a separação dos picos foi aproximadamente de 0,20 V, o que caracteriza um processo quase reversível. Os cinco eletrodos testados possuem um comportamento similar indicando uma boa reprodutibilidade.

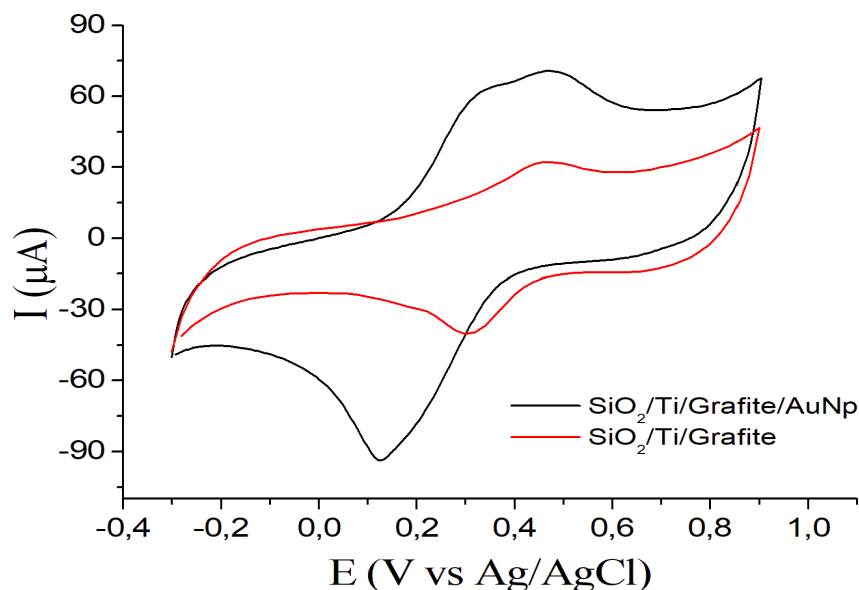
Figura 23: Voltamogramas cíclicos de 5 eletrodos das plataformas de $SiO_2/TiO_2/C$ -grafite na presença de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .



Fonte: Elaborado pelo autor

A Figura 24 mostra o voltamograma cíclico do eletrodo preparado com a plataforma $SiO_2/TiO_2/C$ -grafite e a plataforma onde foi depositado o filme de AuNps, $SiO_2/TiO_2/C$ -grafite/AuNps. Pode ser observado um aumento nas intensidades do pico anódico e catódico quando comparado com os eletrodos sem AuNps, o que é um indício de que a presença de filmes finos de AuNps promovem um aumento na corrente que passa pela plataforma, o que pode ser explicado pela maior área eletroativa. A separação do I_{pa} e I_{pc} foi de 0,18 V, menor que o eletrodo sem AuNps. Esse resultado é indicativo de que o eletrodo apresenta uma menor resistência à transferência de elétrons na interface eletrodo solução, e maior proximidade do valor de referência para melhor reversibilidade, que é $0,059/\text{número de elétrons na reação redox}$ (LARANJO, 2016).

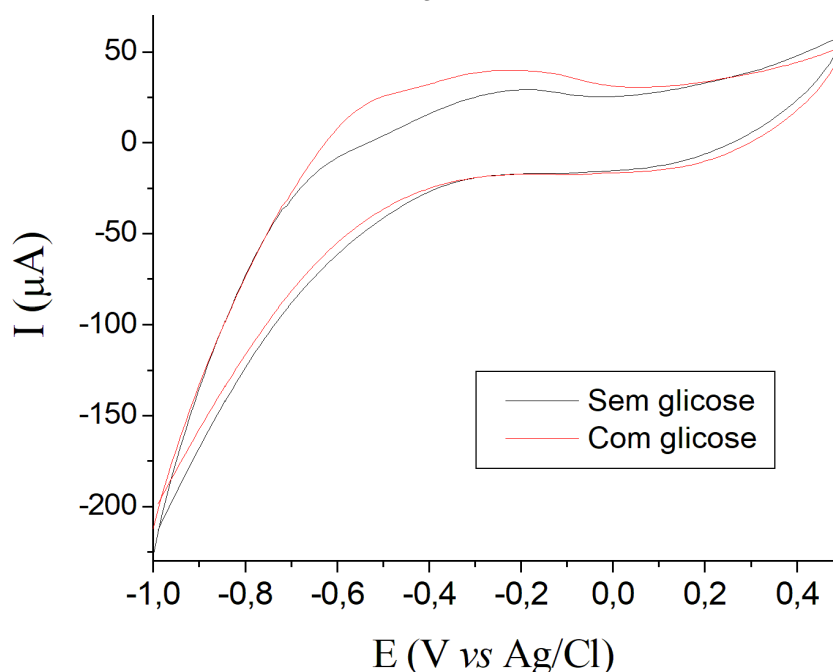
Figura 24: Voltametria cíclica dos eletrodos com e sem AuNps na presença de ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio $1,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e $0,1 \text{ molL}^{-1}$ KCl.



Fonte: Elaborado pelo autor

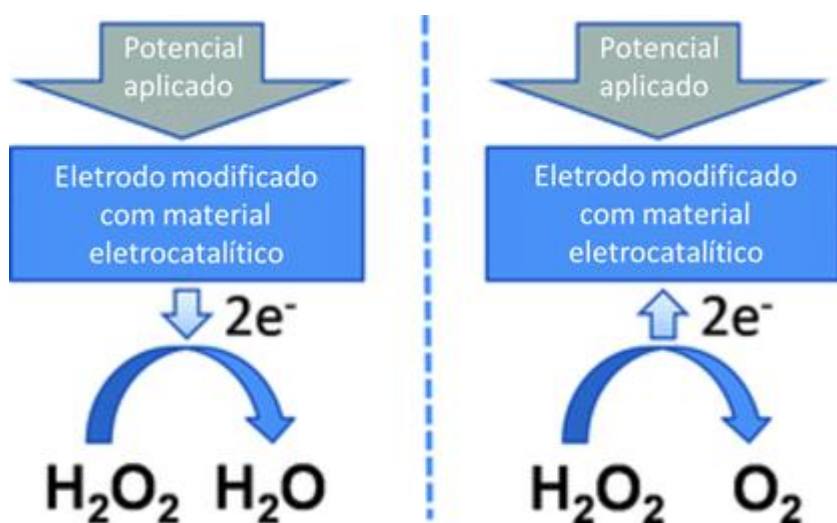
O resultado da voltametria cíclica do eletrodo onde foi imobilizado o filme de AuNps e o filme “sol” contendo Gox, no intervalo de potencial de $-1,0 \text{ V}$ até $0,6 \text{ V}$, em solução tampão PBS, é mostrado na Figura 25. É possível observar um pequeno aumento na I_{pa} na presença de glicose na solução eletrolítica. Esse pequeno aumento na corrente ocorre pela transferência de 2 elétrons na redução e oxidação do peróxido de hidrogênio (Figura 26), sendo que o peróxido de hidrogênio é um subproduto formado pela oxidação da glicose e esse resultado indica a atividade catalítica da enzima GOx.

Figura 25: Voltametria cíclica do eletrodo $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2/\text{C-Grafite}/\text{AuNps}/\text{GOx}$ com e sem glicose na solução eletrolítica, tampão fosfato pH 7,0, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e velocidade de varredura 20 mV s^{-1} .



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 26: Representação da reação de redução e oxidação do peróxido de hidrogênio sobre potenciais aplicados ao eletrodo.

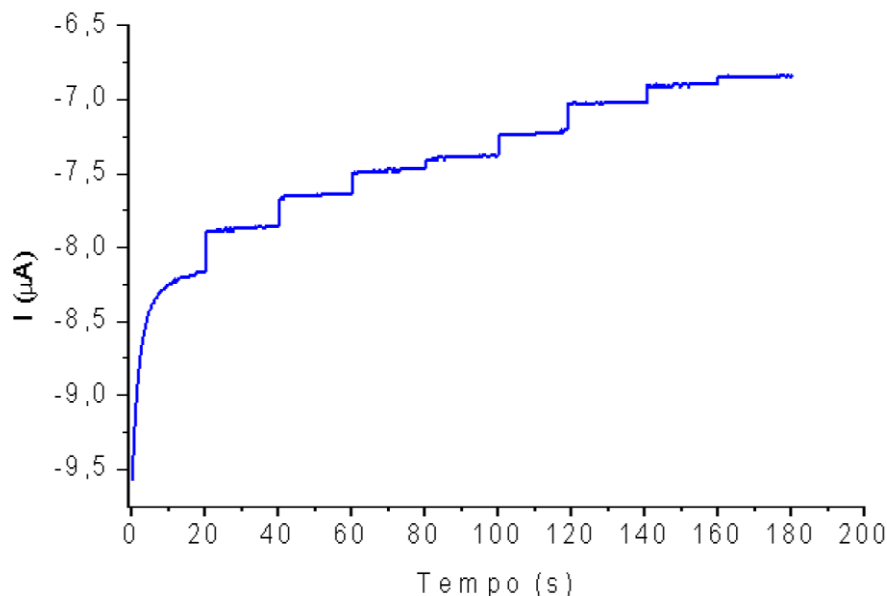


Fonte: CHEN, et al. 2012

Para o mesmo eletrodo $SiO_2/TiO_2/C/AuNps/Gox$, foi realizado o teste de cronoamperometria com adições crescentes de glicose até obter concentração de $9,7 \text{ mmol L}^{-1}$ no cronoamperograma (Figura 27). É evidente que a cada adição de glicose na solução gerou um aumento na corrente, indicando que a enzima estava imobilizada e ativa. A partir dessas adições de glicose com volumes e concentração conhecidos e medidas de corrente, foi possível obter uma relação linear entre a intensidade da corrente e a concentração da glicose no intervalo de 0 a $2,83 \text{ mmol L}^{-1}$ e uma equação quadrática na faixa de concentração de 0 a $9,7 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 28), que em condições similares poderia ser aplicada para determinar a concentração de glicose através da leitura da corrente que passa pelo eletrodo.

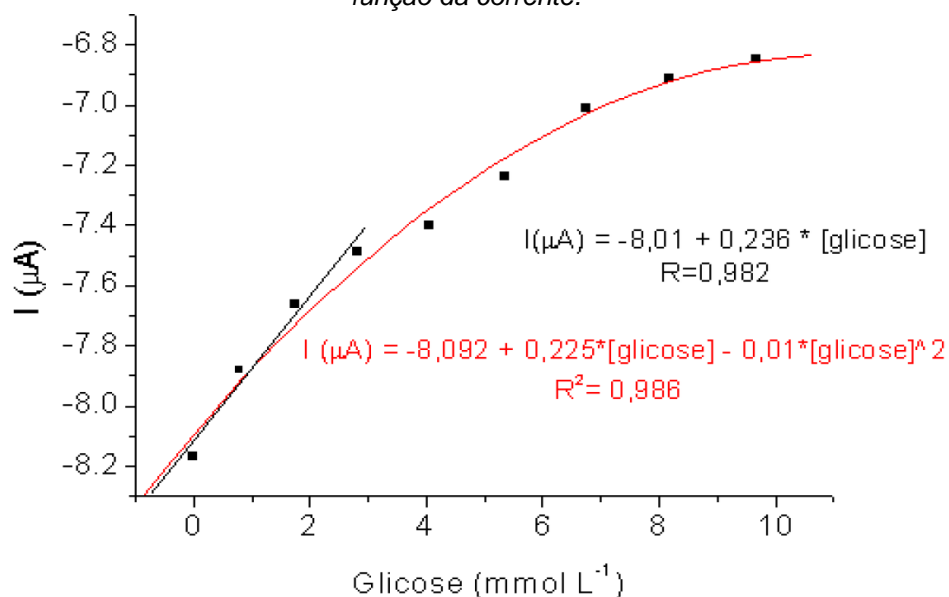
A sensibilidade foi determinada pelo coeficiente angular da reta que apresentou um valor de $0,236 \mu\text{A mmol}^{-1} \text{ L}$. O limite de detecção (LD) foi calculado utilizando a relação $LD = 3 \cdot SD_b / \text{sensibilidade}$, onde SD_b é o desvio padrão do branco com $n = 3$, o valor encontrado foi de $0,508 \text{ mmol L}^{-1}$, o limite de quantificação (LQ) foi obtido pela relação, $LQ = 10 \cdot SD_b / \text{sensibilidade}$, o valor obtido de LQ foi de $1,69 \text{ mmol L}^{-1}$. Os valores encontrados para os limites da plataforma são promissores indicativos de que pode ser aplicada como biossensor eletroquímico para detecção de glicose.

Figura 27: Cronoamperograma do eletrodo SiO₂/TiO₂/Grafite/AuNps/GOx com adições de glicose na solução eletrolítica em solução PBS pH 7.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 28: Relação linear e quadrática da concentração de glicose na solução eletrolítica em função da corrente.



Fonte: Elaborado pelo autor

Conforme observado no cronoamperograma (Figura 27), quando a concentração de glicose chega próximo de 9,7 mmol L⁻¹ o aumento da corrente não sofre alteração considerável, ou seja, há a tendência de atingir um patamar. Esse comportamento é típico de sistemas com cinética regida por Michaelis-Menten, sendo este um sistema enzimático em que a concentração da glicose tem efeito na taxa da reação que a enzima realiza. Nesse, existe uma constante que associa a afinidade do substrato com a enzima, chamada de constante de Michaelis-Menten (K_m), a qual pode ser calculada pela equação de Lineweaver-Burk (Figura 29) que relaciona a corrente e a concentração da glicose (CALDAS,

2014).

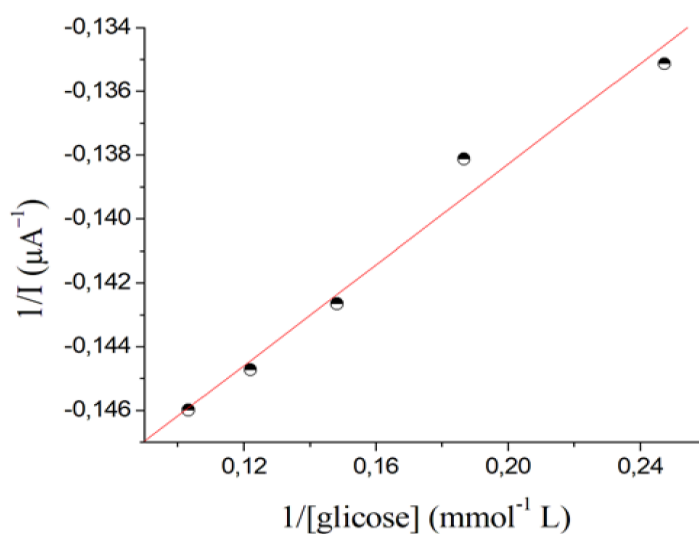
Figura 29: Equação de Lineweaver-Burk.

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M^{app}}{I_{max}} \frac{1}{[glicose]}$$

Fonte: CALDAS, 2014

Em que I_{ss} é a corrente do estado estacionário, ou seja, é a corrente que se mantém estável após a adição de glicose durante as medidas de cronoamperometria e I_{max} é a corrente máxima obtida no patamar atingido. Para o sistema estudado, a relação linear que corresponde a equação de Lineweaver-Burk foi encontrada nas primeiras 5 adições de glicose, sendo possível a construção de um gráfico de $1/I_{ss} \times 1/[glicose]$ (Figura 30) para a obtenção das constantes.

Figura 30: Gráfico de Lineweaver-Burk de $1/I_{ss}$ vs $1/[glicose]$. R: 0,987



Fonte: Elaborado pelo autor

A equação encontrada por regressão linear (Figura 31) nos permite calcular os parâmetros desejados. A I_{max} obtida foi de 6,491 μA , que é desejável que seja a maior possível, enquanto que a K_M obtida foi de 508 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na qual o ideal é que seja a menor possível. O valor encontrado de K_M é bem menor do que o de alguns trabalhos já publicados, sendo possível afirmar que existe boa afinidade entre a enzima e o substrato estudados. (CALDAS, 2014; ŞENEL, et al. 2012, 2015; LI, 2012; WANG, et al. 2011; WU, et al. 2012).

Figura 31: Equação de Lineweaver-Burk obtida através dos dados de cronoamperometria.

$$\frac{1}{I(\mu A)} = 0,154 + 0,0789 \left[\frac{1}{\text{glicose}} \right]$$

Fonte: Elaborado pelo autor

6. Custo experimental

Para a síntese dessas plataformas foi utilizada uma série de reagentes e matéria-prima (Tabela 3), as quais tiveram suas quantidades proporcionais levadas em consideração para o cálculo do preço da síntese de cada plataforma com os filmes de AuNps e GOx. O reagente que mais pesou em todo o processo é, sem dúvidas, a enzima glicose oxidase. Quando calculado o preço de cada plataforma completa, levando em consideração a aquisição da menor quantidade de GOx no mercado, o valor seria de R\$1,34, enquanto que se fosse comprada a GOx na maior quantidade, ou seja, por um preço menor para cada unidade ativa da enzima, o valor da plataforma seria de R\$ 0,45. Mas levando em consideração o trabalho em laboratório, o mais viável é a obtenção de menores quantidades de GOx, por isso o valor estimado é pouco maior do que o valor médio de cada tira detectora de glicose comercializada. Porém caso fosse produzido em escala industrial, o preço de cada plataforma poderia ser ainda menor do que o estimado com uma quantidade grande de enzimas, visto que os demais reagentes não foram adquiridos em sua maior quantidade. Todos os preços considerados nesta estimativa foram obtidos pela Sigma-Aldrich.

Tabela 3: Relação de quantidades e valores usados para fazer a estimativa do preço de cada plataforma. a) Reagentes líquidos com suas características e b) reagentes sólidos.

a)

Volume (mL)	Reagente	Pureza	Densidade (g mL ⁻¹)	Preço 1L (R\$)	Preço por qtd de reagente (R\$)
5	TEOS	98%	0,94	615	3,08
2	TIPO	97%	0,937	576	1,15
12	Etanol	99,5%	0,789	719	8,63
1	HCl	37%	1,19	226	0,23
0,25	HF	48%	1,15	498	0,12
20	DMF	99,8%	0,944	575	11,50
3	CPTMS	97%	1,09	1634	4,90
25	Formamida	99,5%	1,13	546	13,65

b)

Massa (g)	Reagente	Preço (R\$)	Preço por qtd de reagente (R\$)
1,0000	Grafite (pó)	17,53 g ⁻¹	17,53
0,8970	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	377 100g ⁻¹	3,38
0,0001	HAuCl ₄	2498 g ⁻¹	0,25
0,0076	NaBH ₄	635 100g ⁻¹	0,05
0,0060	GOX	316 0,1g ⁻¹	18,96
		19156 25g ⁻¹	4,60

Fonte: Elaborado pelo autor

Para chegar nesses valores finais, primeiro foi calculado o preço da síntese das plataformas do material matriz. Somando os valores de TEOS, TIPOT, Grafite, Etanol, HCl e HF chegamos no valor de R\$30,74. Como a síntese rendeu 7,0g e cada plataforma tem 0,025g, um total de 280 plataformas poderiam ser feitas, portanto, R\$ 30,74 divididos por 280 resulta em R\$ 0,11 para cada plataforma. Em seguida, foi feito o cálculo para as duas gotas de AuNps e GOx, em que as duas gotas foram consideradas como tendo 0,1 mL. Somando os valores da Formamida, 1,4-Diazabicyclo [2.2.2]octane, HF, DMF e CPTMS resulta em R\$ 33,56 para a síntese de 3,0 g, sendo que foram utilizados somente 0,2g para a estabilização, por regra de três chegamos no valor de R\$ 2,24 para as 0,2g, que se somados ao valor do HAuCl₄ e NaBH₄ chegamos em R\$ 2,54 para o preparo de uma solução de 24 mL. Por regra de três o valor para 0,1 mL é de R\$ 0,01. Por último, o preço para a solução de GOx foi calculado de forma similar. O valor da GOx com o valor do TEOS (1,0 mL) resulta em R\$19,58 para o preparo de 1,6 mL, e novamente por regra de três chegou-se no valor de R\$1,22 para 0,1 mL. Finalmente, somando R\$0,11, R \$0,01 e R\$1,22 é obtido o valor para cada plataforma completa, R\$ 1,34.

7. Conclusão

Através de todos dados obtidos nesse estudo é possível dizer que o material condutor SiO₂/TiO₂/C-Grafite sintetizado apresenta área específica considerável e boa capacidade para produção de eletrodos com boa reversibilidade. Foram obtidas nanopartículas de ouro de aproximadamente 10 nm de diâmetro estabilizadas com o silsesquioxano R₂DABCO, as quais foram imobilizadas na forma de filmes utilizando a técnica de *spin-coating* na plataforma matriz. A área eletroativa dos eletrodos assim como a transferência de elétrons foi aumentada pela incorporação dos filmes de AuNps. Utilizando essa mesma técnica foi imobilizada a enzima glicose oxidase na superfície da plataforma contendo AuNps, assim a plataforma se mostrou sensível para detecção de glicose. Outra conclusão advinda desse estudo é que a imobilização com filmes

finos é um método simples e fácil e que fornece bons resultados, tanto para GOx quanto para AuNps. O preço médio de cada tira detectora de glicose comercializada atualmente é de R\$ 1,19 que é um valor mais barato em comparação com o custo de produção de cada pastilha em nível de laboratório, R\$ 1,34, sendo assim um método muito eficiente com alta sensibilidade.

Visando a continuação do trabalho seriam necessários mais testes de reprodutibilidade, principalmente na imobilização da enzima, assim como estabilidade em variações de temperatura e tempo. Além disso para aprimorar mais ainda a aplicabilidade do biossensor seria necessário detectar a glicose na presença de interferentes.

8. Referências

- ALFAYA, Antonio AS; KUBOTA, Lauro T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p.835-841, 2002.
- ALVES, Livia Maria et al. **Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato**. 2014.
- AMENDOLA, Vincenzo; MENEGHETTI, Moreno. Size evaluation of goldnanoparticles by UV- vis spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry**. v. 113, n. 11, p. 4277-4285, 2009.
- BARDESTANI, Raoof; PATIENCE, Gregory S.; KALIAGUINE, Serge. Experimental methods in chemical engineering: specific surface area and pore size distribution measurements—BET, BJH, and DFT. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 97, n. 11, p. 2781-2791, 2019.
- BENVENUTTI, Edilson V. et al. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química nova**, v. 32, p. 1926-1933, 2009.
- CALDAS, Elisângela Muncinelli. **Desenvolvimento de sílicas organo funcionalizadas para aplicação como sensores eletroquímicos**. 2014.
- CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CHEN, Wei et al. Recent advances in electrochemical sensing for hydrogen peroxide: a review. **Analyst**, v. 137, n. 1, p. 49-58, 2012.
- CIÓRCERO, Juliane Rutckeviski et al. **Eletrodos de carbono cerâmico modificados com óxidos de estanho e nióbio para aplicação como sensores eletroquímicos**. 2019.
- CLARK JR, Leland C.; LYONS, Champ. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-45, 1962.
- COSTA, Amine Farias et al. Carga do diabetes mellitus tipo 2 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, p. e00197915, 2017.

- DOMINGUES, Sergio Humberto. **Filmes finos, transparentes e condutores baseados em grafeno**. 2013.
- ECKERTOVA, Ludmila. Physics of thin films. **Springer Science & Business Media**, 2012.
- FREIRE, Renato S. et al. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 14, n. 2, p. 230-243, 2003.
- FURLANI, Izadora L. et al. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Química Nova**, v. 43, p. 463-473, 2020.
- FURTADO, Roselayne Ferro et al. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. **Embrapa Agroindústria Tropical-Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.
- HIGSON, S. **Química Analítica**. [s.l.] Grupo A Educação, 2009.
- JANEGITZ, Bruno Campos. **Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro**. 2012.
- LAGO, Rodrigo M.; SINGH, Premranjan P.; NESTO, Richard W. Diabetes and hypertension. **Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism**, v. 3, n. 10, p. 667-667, 2007
- LARANJO, Marina Teixeira. **Síntese caracterização de materiais à base de titânia e titânia/sílica para aplicação em células solares e sensores eletroquímicos**. 2016.
- LI, Yancai et al. Direct electrochemistry of glucose oxidase and its biosensing to glucose based on the Chit-MWCNTs–AuNRs modified gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 685, p. 86-90, 2012.
- MACHADO, Geraldo Beyer. **Preparação e aplicações dos silsesquioxanos dicarboxilatos de cadeia longa derivados do precursor dicatiônico bis (3-N-propiltrihidroxisilil)-1, 4 diazoniabicyclo**. 2014
- MALHOTRA, Bansi Dhar; ALI, Md Azahar. Nanomaterials in biosensors: fundamentals and applications. **Nanomaterials for Biosensors**, p. 1, 2018.
- MARAFON, Eduardo et al. **Material carbono ceramico condutor SiO₂/ZrO₂/C-grafite: síntese, caracterização e aplicações**. 2008.
- LIMA, Roberto Márcio Mota de. **Desenvolvimento De Protótipos Biossensores Eletroquímicos Para Avaliação De Níveis Glicêmicos E Sequências Nucleotídicas**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- MARONEZE, Camila Marchetti et al. **SiO₂/TiO₂/Grafite preparado pelo método sol-gel: um novo material carbono cerâmico eletricamente condutor**. 2008.
- MARTINS, Patrícia Alexandra Almeida Dias. **Instrumentação para biossensor eletroquímico utilizando voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica**. Universidade de Aveiro, 2019
- MASCAGNI, Daniela Branco Tavares. **Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido**. 2017.
- MAYYA, K. Subramanya; SCHOELER, Bjoern; CARUSO, Frank. Preparation and

- organization of nanoscale polyelectrolyte-coated gold nanoparticles. **Advanced Functional Materials**, v. 13, n. 3, p. 183-188, 2003.
- MESQUITA, Martha Vitória Norberto et al. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 2, p. 38, 2018.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 2015.
- NECTOUX, Aline da Silveira. **Desenvolvimento do sensor eletroquímico ACeI/TiO₂/Sb₂O₅/BQ e aplicação na determinação de ácido ascórbico na presença de interferentes**. 2009.
- NIX, William D. Mechanical properties of thin films. **Metallurgical transactions A**, v. 20, n. 11, p. 2217, 1989.
- OHRING, Milton. **Materials science of thin films**. Elsevier, 2001.
- REIS, Crisleine Zottis dos et al. **Bioalveamento enzimático de tecidos de malha de algodão**. 2016.
- SÁ, Rodrigo Cimino; ALVES, Silvio Rubens; DE ARAÚJO NAVAS, Edna Aparecida Ferraz. Diabetes mellitus: avaliação e controle através da glicemia em jejum e hemoglobina glicada. **Revista Univap**, v. 20, n. 35, p. 15-23, 2014.
- SANTOS, Cássio Eráclito Alves dos et al. **Síntese e caracterização de nanopartículas metálicas e suas aplicações em biologia**. 2015.
- SANTOS, Jaciara Cássia de Carvalho. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SCHNEID, Andressa da Cruz. **Estrutura e multifuncionalidades do silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1, 4-diazoniabicyclo [2.2. 2] octano**. 2018.
- ŞENEL, Mehmet; NERGIZ, Cevdet. Novel amperometric glucose biosensor based on covalent immobilization of glucose oxidase on poly (pyrrole propylic acid)/Au nanocomposite. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 4, p. 1118-1124, 2012
- ŞENEL, Mehmet. Simple method for preparing glucose biosensor based on in-situ polypyrrole cross-linked chitosan/glucose oxidase/gold bionanocomposite film. **Materials Science and Engineering: C**, v. 48, p. 287-293, 2015.
- SILVA, Andressa Alves da. **Síntese e estabilização de nanopartículas de ouro para fins biotecnológicos e cosméticos**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SILVA, Gilvaldo Gentil da. **Eletrodeposição de chumbo sobre Carbono Vítreo, em sistema Ácido, Alcalino e com a influência do Etileno Glicol**. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- SKEIKA, Tatiane et al. Eletrodos de carbono cerâmico: parâmetros de preparação, propriedades e aplicações como sensores eletroquímicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 125-136, 2009.
- SOUSA, Diego Rayan Teixeira de et al. **Produção de Glicose Oxidase (EC 1.1.3.4) por fungos isolados da Floresta Amazônica**. 2017.
- TATSCH, Peter J. Deposição de filmes finos. **V Oficina de Microeletrônica**, p. 22, 2000.

TELLECHEA, Edurne et al. Engineering the interface between glucose oxidase and nanoparticles. **Langmuir**, v. 28, n. 11, p. 5190-5200, 2012.

TYONA, M. D. A theoretical study on spin coating technique. **Advances in materials Research**, v. 2, n. 4, p. 195, 2013.

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

WU, Wei-Che; HUANG, Jian-Lung; TSAI, Yu-Chen. Direct electron transfer and biosensing of glucose oxidase immobilized at multiwalled carbon nanotube-alumina-coated silica modified electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 4, p. 983-987, 2012.

YILBAS, Bekir Sami; AL-SHARAFI, Abdullah; ALI, Haider. **Self-Cleaning of Surfaces and Water Droplet Mobility**. Cambridge, MA, USA:: Elsevier, 2019.

ZAMARCHI, Felipe et al. **Eletrodo de pasta de carbono modificado com polietilenoimina para detecção de ácido cafeico**. 2019.

ZARPELON, Fabiana. **Preparação, caracterização e aplicação de filmes finos de PAH/PAA com nanopartículas de prata no tratamento microbiológico de efluentes industriais para reuso**. 2014.