

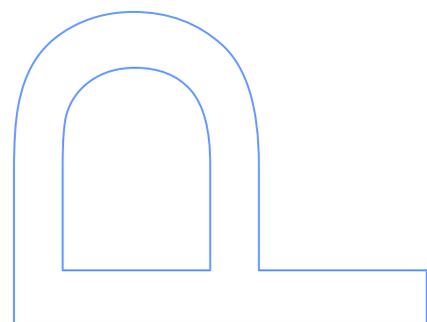
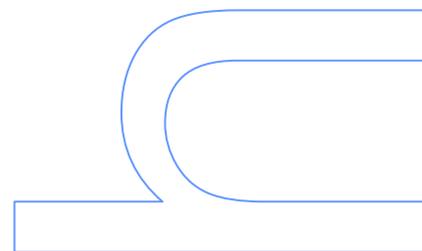
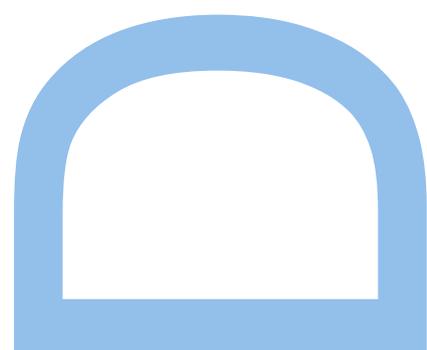
# Preparação e caracterização de biossensores enzimáticos

Inês Morais e Vasconcelos de Miranda

Doutoramento em Química  
Departamento de Química e Bioquímica  
Faculdade de Ciências – Universidade do Porto  
2017

## **Orientadores**

Carlos Manuel Melo Pereira  
António Fernando Sousa Silva





**Aos meus pais,**  
Sempre o primeiro apoio, e incentivo,  
em todo o meu percurso académico.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Carlos Pereira, pela orientação, pela presença e pela ajuda ao longo de todo o trabalho experimental e na escrita desta tese.

Ao Prof. António Fernando, pela orientação, pelo conselho sempre disponível ao longo do tempo.

A todos os meus colegas de laboratório, com quem partilhei o meu dia-a-dia durante quatro anos, que me acompanharam em todas as fases deste trabalho.

À Beta, à Renata, à Paula, ao Zé, ao João.

À Tânia, pela disponibilidade e trabalho partilhado.

Ao Nuno, pela inesgotável paciência para o suporte técnico e logístico.

Aos meus pais, à minha irmã, a toda a minha família e amigos, que me têm apoiado e ajudado ao longo de todos estes anos.

À FCT, pelo apoio financeiro, através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/75026/2010 e pelo financiamento do projeto bilateral SK-PT-0015-12.

I would like to thank to Prof. Dusan Velic and his students, from Comenius University of Bratislava, where I spent 2 months. Namely Marianna, my company not only at the laboratory but also around the city.



## **Resumo**

A monitorização dos processos bioquímicos – em áreas tão distintas como a Medicina ou a Indústria Alimentar ou Ambiental - é fundamental para a sua total compreensão. Desta forma, a quantificação de biomoléculas, nomeadamente de enzimas, ganha um papel revelante em diversas áreas de estudo onde a sua ação como biomarcador – indicador da normalidade de um processo biológico, de patogénese ou resposta farmacêutica - é comum.

Neste trabalho tentamos abordar diferentes métodos de construção de biossensores eletroquímicos – característicos pela sua análise rápida e de baixo-custo -, por modificação da sua superfície com diferentes polímeros e pela incorporação de nanomateriais ou biomoléculas, numa tentativa de melhorar a sua resposta analítica.

A polianilina e nanopartículas de ouro foram estudadas como materiais de eletrodo na construção de um biossensor eletroquímico para glucose em superfície de carbono vítreo.

Técnicas de impressão molecular de proteínas numa rede polimérica de ácido cafeico à superfície de SPE de carbono, foram também estudadas, permitindo construir dispositivos seletivamente sensíveis a glucose oxidase e amilase.

## **Abstract**

Biochemical processes monitorization – in such different areas as Medicine, Food Industry or Environmental – is vital to its full understanding. As so, biomolecules quantification, namely enzymes, has a fundamental role in many study fields where its action as biomarker – which indicates the normality of a biological process of pathogenesis or pharmaceutical answer – is common.

In this work, it was tried to explore different methods of electrochemical biosensors construction – characterized by its fast and low cost response -, by surface modification with different polymers, and nanoparticles or biomolecules incorporation, in an attempt to improve its analytical answer.

Polyaniline and gold nanoparticles were studied as electrode materials in the construction of an electrochemical biosensor for glucose at glassy carbon surface.

Techniques of molecular imprinting of proteins, in a polymeric network of a polymer, caffeic acid, at carbon-screen printed electrodes surface were also studied, which enable to construct sensible devices to glucose oxidase and amylase enzymes.

**Palavras-chave:** biossensores; eletroquímica; voltametria; espectroscopia de impedância; modificação de superfícies; polímeros condutores; nanopartículas de ouro; polímeros molecularmente impressos (MIP), glucose; glucose oxidase; amilase;

# Índice

<b>Capítulo 1. Enquadramento</b>	<b>20</b>
1.1 Motivação	21
1.2 Organização de capítulos	24
<b>Capítulo 2. Introdução teórica</b>	<b>26</b>
2.1 (Bio)Sensores	27
2.2 Modificação de superfícies	30
2.2.1 Modificação de superfícies com materiais compósitos	33
2.2.1.1 Polímeros Condutores	33
2.2.1.1.1 Polianilina	35
2.2.1.1.2 Nanopartículas de Ouro	39
2.2.1.1.3 Incorporação de nanopartículas de ouro em filmes poliméricos	40
2.2.2 Enzimas como elemento de reconhecimento à superfície	43
2.2.2.1 Métodos de imobilização	43
2.2.2.1.1 Adsorção	45
2.2.2.1.2 Sensores de glucose	45
2.2.2.2.1 Detecção mediada	48
2.2.3 Polímeros molecularmente impressos	51
2.2.3.1 Técnicas de impressão molecular	53
2.2.3.1.1 Eletropolimerização	54
2.2.3.1.2 Impressão de proteínas	55
2.3 Transdução	57
2.3.1 Transdução eletroquímica	57
2.3.1.1 Tipos de Sensores eletroquímicos	58
2.3.1.1.1 Amperometria	59
2.3.1.1.1.1 Voltametria	59
2.3.1.1.1.1.1 Voltametria cíclica	61
2.3.1.1.1.1.2 Voltametria de Onda Quadrada	63
2.3.1.1.1.1.2 Cronoamperometria	65
2.3.1.1.1.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica	67
2.4 Considerações Finais	70
2.5 Bibliografia	71

# Índice

<b>Capítulo 3. Síntese de materiais compósitos</b>	<b>83</b>
3.1 Métodos de preparação dos materiais compósitos	84
3.1.1 Reagentes	84
3.1.2 Síntese da Polianilina (PANI)	84
3.1.3 Síntese de Nanopartículas de Ouro (AuNPs)	85
3.1.4 Síntese das AuNPs estabilizadas pela Polianilina (AuNPs/ PANI)	86
3.2 Apresentação e discussão dos resultados	89
3.2.1 Estudos espectrocópicos das nanopartículas obtidas	89
3.2.2 Estudos eletroquímicos dos materiais compósitos sintetizados	90
3.2.3 Caracterização de superfícies modificadas com os materiais compósitos sintetizados	93
3.3 Bibliografia	96
<b>Capítulo 4. Biossensor de glucose</b>	<b>97</b>
4.1 Métodos de preparação	98
4.1.1 Instrumentação	98
4.1.2 Reagentes	98
4.1.3 Soluções	99
4.1.4 Modificação da superfície dos C-SPE	99
4.2 Resposta analítica do biossensor de glucose	100
4.3 Bibliografia	104
<b>Capítulo 5. Preparação dos filmes poliméricos molecularmente                 impressos</b>	<b>105</b>
5.1 Preparação dos filmes poliméricos	106
5.1.1 Instrumentação	106
5.1.2 Reagentes	106
5.1.3 Soluções	107
5.1.4 Eletrossíntese dos filmes molecularmente impressos	107
5.1.5 Medições eletroquímicas	108
5.2 Apresentação e discussão dos resultados obtidos	109
5.2.1 Construção do filme polimérico	109

# Índice

5.2.2	Monitorização do processo de construção do MIP por EIS	110
5.2.3	Estudo do processo de polimerização e impressão molecular	112
5.2.4	Estudo da desnaturação e remoção proteica	116
5.3	Bibliografia	119
<b>Capítulo 6.</b>	<b>Biossensores para proteínas</b>	<b>121</b>
6.1	Construção dos biossensores	122
6.1.1	Instrumentação	122
6.1.2	Reagentes	122
6.1.3	Soluções	123
6.1.4	Eletrossíntese dos filmes molecularmente impressos	123
6.1.5	Medições eletroquímicas	123
6.2	Biossensor de glucose oxidase	125
6.2.1	Resposta analítica do sensor de glucose oxidase	128
6.2.2	Afinidade de ligação da glucose oxidase	130
6.2.3	Estudo de interferentes	132
6.2.4	Aplicação em ensaios de recuperação	134
6.3	Biossensor de Amilase	134
6.3.1	Resposta analítica do sensor de amilase	137
6.3.2	Afinidade de ligação da amilase	138
6.3.3	Aplicação em ensaios com amostras reais	140
6.4	Bibliografia	142
<b>Capítulo 7.</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>143</b>

# Índice de Tabelas

<b>Capítulo 1. Enquadramento</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 2. (Bio)Sensores</b>	<b>26</b>
2.1 Algumas moléculas usadas para a modificação de elétrodos por adsorção química e ligação covalente.	32
2.2 Estrutura, condutividade e principais características de alguns polímeros condutores.	34
2.3 Estados de oxidação da polianilina: leucoesmeraldina, sal de esmeraldina, base esmeraldina e pernigranilina.	37
2.4 Mediadores de diferentes classes e respectivo potencial de redução.	50
<b>Capítulo 3. Sítese de materiais compósitos</b>	<b>83</b>
3.1 Dados obtidos por DLS para as Nanopartículas de Ouro.	90
3.2 Dados obtidos por DLS para a PANI.	90
3.3 Resultados obtidos por AFM, em superfícies de mica simples, modificada com PANI e modificada com PANI+AuNPs	94
<b>Capítulo 4. Biossensor de glucose</b>	<b>97</b>
4.1 Diferentes modificações de eletrodo testadas como biossensor de glucose	99
4.2 Características das retas de calibração obtidas para os diferentes biossensores de glucose	102
4.3 Características de alguns biossensores eletroquímicos (amperométricos) para deteção de glucose reportados na literatura.	103
<b>Capítulo 5. Construção de Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)</b>	<b>105</b>
5.1 Diferentes condições testadas para a eletropolimerização do ácido cafeico à superfície do eletrodo	112
5.2 Espessuras estimadas para os filmes poliéricos obtidos por cronoamperometria e resistência de transferência de carga obtida por impedância após formação do filme	115
5.3 Diferentes condições de remoção da proteína testadas.	117

# Índice de Tabelas

<b>Capítulo 6. Biossensores para proteínas</b>	<b>121</b>
6.1 Diferentes concentrações das enzimas usadas para a construção dos sensores por impressão molecular	125
6.2 Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração a partir da Figura 6.3	129
6.3 Propriedades de ligação do MIP, constante de dissociação ( $K_D$ ) e número máximo de locais de ligação ( $B_{max}$ ), obtidos a partir das isotérmicas de ligação.	132
6.4 Determinação da concentração de glucose oxidase em solução tampão. Ensaios de recuperação.	134
6.5 Diferentes concentrações da enzima usadas para a construção dos sensores por impressão molecular.	135
6.6 Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração apresentadas na Figura 6.9.	138
6.7 Propriedades de ligação do MIP, constante de dissociação ( $K_D$ ) e número máximo de locais de ligação ( $B_{max}$ ), obtidos a partir das isotérmicas de ligação.	139
6.8 Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear da curva de calibração apresentada na Figura 6.11.	141
<b>Capítulo 7. Considerações finais</b>	<b>143</b>

# Índice de Figuras

<b>Capítulo 1. Enquadramento</b>	<b>20</b>
<b>Capítulo 2. (Bio)Sensores</b>	<b>26</b>
2.1 Representação do modo de funcionamento de um sensor	27
2.2 Estrutura geral da Polianilina na forma de base de emeraldina, em que $n + m = 1$ e $x$ equivale ao grau de polimerização	36
2.3 Voltamograma cíclico da polianilina, as diferentes cores representam os diferentes estados de oxidação da PANI.	37
2.4 Equação geral da síntese da Polianilina	38
2.5 Representação esquemática da síntese das nanopartículas de ouro, usando ião citrato como agente redutor e estabilizante	40
2.6 Representação esquemática dos principais métodos de imobilização enzimática descritos na literatura. (E – enzima, P – proteína inserida).	44
2.7 Reação de catálise da glucose oxidase	46
2.8 Representação esquemática das diferenças entre transferência eletrónica mediada e não-mediada	49
2.9 Representação esquemática das diversas fases de construção de um MIP	52
2.10 a) Representação esquemática da variação de potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho ao longo do tempo na voltametria cíclica. b) Resposta de intensidade de corrente em função do potencial aplicado, voltomograma cíclico obtido.	61
2.11 Sinal de excitação aplicado para voltametria de onda quadrada, em função do tempo, o ponto 1 e 2 correspondem ao momento de aplicação do impulso de potencial em que a intensidade de corrente é medida e $\tau$ ao período do pulso.	63
2.12 Resposta de corrente obtida por aplicação de um potencial tal como o representado na Figura 2.11	64

# Índice de Figuras

2.13	Evolução da corrente com o tempo ao aplicar um impulso de potencial a um eléctrodo que desencadeia uma reacção de oxidação-redução. Em que $I_f$ corresponde à corrente faradaica e $I_c$ à corrente capacitiva.	67
2.14	Circuito eléctrico equivalente de Randles	69
<b>Capítulo 3. Síntese de materiais compósitos</b>		<b>83</b>
3.1	a) Imagens TEM de AuNPs (cittrato). b) coloração obtida na síntese.	85
3.2	Histograma de distribuição de tamanho para AuNPs (cittrato).	86
3.3	a) Imagem de TEM da suspensão de AuNPs/PANI. b) Coloração obtida na síntese.	87
3.4	Histograma de distribuição do tamanho para AuNPs sintetizadas em PANI	88
3.5	Espectros de absorvância UV/Visível obtidos para as soluções de AuNPs, PANI e AuNPs/PANI.	89
3.6	Ensaio voltamétricos em eléctrodo de GC modificado com PANI e AuNPs/PANI.	91
3.7	Ensaio de estabilidade, eléctrodo de GC modificado com AuNPs/PANI.	92
3.8	Representação da intensidade de corrente de pico anódico em função do tempo.	92
<b>Capítulo 4. Biossensor de glucose</b>		<b>97</b>
4.1	Voltamogramas obtidos para os eléctrodos modificados com Glucose Oxidase (A), Glucose Oxidase + PANI (B) e Glucose Oxidase + PANI + AuNPS (C), em ensaios eletroquímicos com soluções contendo tampão fosfato, cloreto de potássio, benzoquinona e de diferente concentração de Glucose	100
4.2	Representação gráfica da intensidade de corrente de pico em função da concentração de glucose presente na solução, ajustes lineares para concentrações mais baixas	101

# Índice de Figuras

<b>Capítulo 5. Construção de Polímeros Molecularmente Impressos (MIP)</b>	<b>105</b>
5.1 Esquema resumido dos procedimentos para a formação e utilização do MIP	109
5.2 Diagramas de Nyquist de impedância eletroquímica obtidos depois dos diferentes estágios da preparação do MIP. Depois da limpeza inicial (preto), depois da polimerização (vermelho) e depois do processo de remoção proteica (azul), para a construção de um biossensor de glucose oxidase	111
5.3 Circuito equivalente de Randle	112
5.4 Espectros de impedância obtidos após a eletrodeposição do ácido cafeíco e da glucose oxidase à superfície do SPE de carbono	113
5.5 Cronoamperogramas obtidos durante a eletrodeposição do ácido cafeíco e da glucose oxidase à superfície do elétrodo de carbono. Em inclusão estão apresentados os mesmos valores de intensidade de pico em função de $t^{1/2}$	114
5.6 Representação gráfica da resistência de transferência de carga do filme polimérico em função da sua espessura estimada.	115
5.7 Espetros de impedância obtidos em cada um dos elétrodos sujeitos aos diferentes métodos de remoção de proteína apresentados na Tabela 5.3	117
<b>Capítulo 6. Biossensores para proteínas</b>	<b>121</b>
6.1 Cronoamperograma obtido durante a eletrodeposição do ácido cafeíco e da glucose oxidase na superfície do SPE de carbono	125
6.2 Morfologia da superfície do SPE-C, obtida por AFM, após limpeza (A), após polimerização (B) e após remoção da glucose oxidase (C).	127
6.3 Curvas de calibração da resistência de transferência	

# Índice de Figuras

- de carga ( $R_{CT}$ ) em função das diferentes concentrações de glucose oxidase adicionadas aos filmes poliméricos. Diferentes cores representam as diferentes concentrações de glucose oxidase usada durante a fase de impressão – azul  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL, vermelho  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL e preto  $1 \times 10^{-4}$  mg/mL. 128
- 6.4 Curva de calibração da glucose oxidase obtida para um intervalo de concentrações de  $1 \times 10^{-11}$  a  $1 \times 10^{-3}$  g/L 130
- 6.5 Isotérmica de ligação entre o recetor MIP e a glucose oxidase, para as diferentes concentrações de enzima usadas na fase de impressão:  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  (inset A) and  $1 \times 10^{-5}$  (inset B). A linha sólida representa o ajuste para ligação específica e não-específica em simultâneo. 131
- 6.6 Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) em função das diferentes concentrações de glucose oxidase e dos dois interferentes em estudo, amilase e mioglobina. 133
- 6.7 Cronoamperograma obtido durante a eletrodeposição do ácido cafeíco e da amilase na superfície do SPE de carbono, a 2V durante 30 segundos. 135
- 6.8 Diagramas de Nyquist de impedância eletroquímica obtidos depois dos diferentes estágios da preparação do MIP. Depois da limpeza inicial (preto), depois da polimerização (vermelho) e depois do processo de remoção proteica (azul), para a construção de um biossensor de amilase 136
- 6.9 Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) – A – e intensidade de corrente de pico – B – em função das diferentes concentrações de amilase adicionadas aos filmes poliméricos. A azul as diferentes concentrações de amilase usadas na fase de impressão ( $1 \times 10^{-6}$  mg/mL – azul escuro e  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL – azul claro) e

# Índice de Figuras

a vermelho a calibração do NIP.	137
6.10 Isotérmica de ligação entre o recetor MIP e a amilase, para as diferentes concentrações de enzima usadas na fase de impressão: $1 \times 10^{-6}$ , $1 \times 10^{-5}$ (inset). A linha sólida representa o ajuste para ligação específica e não-específica em simultâneo.	139
6.11 Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) em função das diferentes concentrações de amilase, na presença de amostras reais de saliva. Simulação da curva de calibração para uma adição de saliva com $ amilase  = 1 \times 10^{-7,5}$ mg/mL.	141
<b>Capítulo 7. Considerações finais</b>	<b>143</b>

# Lista de Abreviaturas

A	Área
AcHO	Ácido acético
AFM	Microscopia de Força Atômica
Aml	Amilase
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
Bmax	Número máximo de locais de ligação
Cdl	Capacidade da dupla camada
CrA	Cronoamperometria
C-SPE	Eléttodos impressos à superfície de carbono
CV	Voltametria cíclica
DLS	Difusão dinâmica de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GC	Carbono vítreo
Gox	Glucose Oxidase
ITO	Óxido de índio e estanho
Kd	Constante de dissociação
LOD	Limite de detecção
MIP	Polímero molecularmente impresso
NIP	Polímero não impresso
NP	Nanopartículas
PANI	Polianilina
PBS	Solução de tampão fosfato
Rct	Resistência de transferência de carga
RMS	Rugosidade quadrática média
RNA	Ácido ribonucleico
Rs	Resistência da solução
SCE	Eléttodo saturado de calomelanos
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIMS	Espectroscopia de massa iônica secundária
SWV	Voltametria de onda quadrada

# Lista de Abreviaturas

TEM Microscopia de transmissão eletrónica

W Constante de Warburg

## **1. Enquadramento**

## 1.1. Motivação

A deteção e quantificação das mais diversas biomoléculas é um processo fundamental e rotineiro em investigação bioquímica. Um número incontável de moléculas, nomeadamente as enzimas, estão envolvidas nos mais diversos processos biológicos e a capacidade de monitorizar alterações na sua concentração é cada vez mais importante na nossa vida quotidiana em áreas que vão desde a indústria alimentar ou o controle ambiental até ao campo médico, onde a sua ação como biomarcador – indicador da normalidade de um processo biológico, de patogénese ou resposta farmacêutica - é comum.

Desta forma, é longa a lista de métodos convencionais que vêm sendo usados numa tentativa de detectar e quantificar diferentes biomoléculas. Atualmente, um dos métodos mais usados para monitorizar biomoléculas são os imunossensores, esta é uma técnica analítica muito poderosa, que permite a deteção de diferentes espécies com elevado grau de sensibilidade e especificidade, uma vez que se baseia no reconhecimento molecular entre anticorpos e antigénio. O princípio dos imunoensaios é usado em laboratório para medições de rotina de inúmeros analitos. O método de imunoensaio mais comum é o ELISA.

Outros métodos de deteção de biomoléculas, tais como a espectrofotometria ou métodos cromatográficos são também rotineiramente usados e apresentam resultados altamente sensíveis e específicos para a deteção de proteínas. No entanto, todos estes métodos apresentam consideráveis inconvenientes: são demasiado complexos, prolongam no tempo a espera pelos resultados e requerem intenso trabalho laboratorial, o que dificulta o diagnóstico de rotina. Para além disso, aqueles que requerem o uso de anticorpos, como o ELISA, tornam-se extremamente dispendiosos, não só na sua obtenção mas também nas condições especiais de manuseamento e armazenamento.

Como alternativa, os biossensores, em particular os biossensores electroquímicos, surgiram nos últimos anos como uma ferramenta atrativa que permite realizar análises rápidas e de baixo custo e o seu desenvolvimento

está fortemente ligado à performance eletroquímica dos materiais de eletrodo utilizados.

Este projeto de doutoramento surgiu dessa procura de desenvolver novos biossensores enzimáticos com detecção eletroquímica, que permita uma avaliação rápida e seletiva da quantidade de uma proteína em solução. Para isso foram estudados diferentes formas de modificação de superfícies de carbono, com polímeros condutores, nanopartículas, modificação enzimática e por fim, por construção de polímeros molecularmente impressos (MIPs).

Os materiais compósitos contendo nanopartículas tem uma grande variedade de aplicações tanto na área da medicina (por exemplo em novos agentes de contraste, no tratamento do cancro ou como meio de transporte e administração de fármacos) ou biomedicina e mais recentemente em células fotovoltaicas orgânicas ou em baterias e células de combustível. Durante a fase inicial deste trabalho, a síntese de um polímero condutor, a polianilina, e das nanopartículas de ouro foi otimizada e estes materiais foram estudados por métodos eletroquímicos e análises complementares foram realizadas, nomeadamente AFM, e SIMS.

Numa segunda fase do trabalho, foi construído um sensor enzimático para a glucose, por modificação de eletrodos de carbono (C-SPE) com a enzima glucose oxidase, e os materiais compósitos estudados previamente foram introduzidos na superfície do eletrodo para que as alterações ao seu comportamento pudessem ser estudadas e avaliadas.

Por último, foi sintetizado um novo polímero, preparado pela oxidação eletroquímica do ácido caféico à superfície dos C-SPE para, recorrendo a uma técnica de impressão molecular, construir biossensores que permitam a detecção eletroquímica de proteínas por um método mais simples, rápido e barato que as tradicionais técnicas bioquímicas.

A impressão molecular é um método barato para a fabricação rápida de polímeros orgânicos e materiais inorgânicos estruturados em rede que

possibilitam a ligação selectiva de uma molécula modelo, funcionando como anticorpos artificiais. No decurso deste trabalho e pela descrição na literatura da introdução de enzimas nos alimentos como forma de melhorar a sua conservação, ou pela possibilidade de utilizar enzimas nativas de outros produtos naturais como marcadores de qualidade e/ou estado de conservação dos alimentos, decidiu-se avaliar a possibilidade de desenvolver estes sensores para a enzima glucose oxidase. Por último, o mesmo método de impressão molecular foi utilizado para a construção de um biossensor para a amilase. Esta enzima está presente numa das suas formas na saliva e é a responsável pela hidrólise do amido. No organismo humano a sua desregulação pode estar associada a diversas doenças pelo que a sua monitorização pode ser de grande importância. É usada na remoção de resíduos contendo amido em áreas tão distintas como a indústria alimentar, têxtil ou na produção de detergentes.

Os resultados obtidos serão apresentados e discutidos ao longo dos próximos capítulos.

## 1.2. Organização de capítulos

Esta tese está organizada em sete capítulos ao longo dos quais revisão bibliográfica, discussão de resultados e conclusões são apresentadas.

No capítulo 1 – Enquadramento – pretende-se dar uma visão geral das motivações que levaram ao desenvolvimento deste trabalho e dos objetivos que me propus atingir, assim como explicar mais detalhadamente a organização desta tese.

No capítulo 2 – Introdução teórica – faz-se uma revisão inicial dos temas comuns a todo este trabalho, construção de biossensores, modificação de superfícies, os diferentes elementos de bioreconhecimento usados, e sua monitorização por técnicas eletroquímicas. Abordam-se em três subcapítulos os conceitos teóricos envolvidos em cada uma das fases do trabalho experimental que serão, mais à frente discutidos.

Os capítulos 3 a 7 apresentam-se e são discutidos os resultados obtidos em cada uma das fases deste trabalho nomeadamente:

No capítulo 3 – Síntese e estudo dos materiais compósitos – a síntese de novos materiais de eletrodo, nomeadamente a polianilina e as nanopartículas de ouro, são descritas e a sua caracterização à superfície é estudada por diferentes técnicas;

No capítulo 4 – Biossensor enzimático para a deteção de glucose – é descrita a construção de um biossensor eletroquímico para a glucose em que é efetuada a modificação de eletrodos impressos de carbono com a enzima glucose oxidase. A incorporação dos materiais compósitos estudados no capítulo anterior é testada e a sua eficácia avaliada.

No capítulo 5 – Construção de MIPs – é descrita a construção, por eletropolimerização, de novos sensores para proteínas baseados na técnica de impressão molecular, e usando um novo polímero baseado no ácido cafeico. As diferentes fases de construção do polímero, desde a eletrooxidação do ácido cafeico à remoção da proteína molde, são descritas e analisadas;

No capítulo 6 – Biossensor para proteínas – é estudado o desempenho analítico do biossensor construído através das técnicas de impressão molecular para a quantificação da enzima glucose oxidase. É realizado um estudo de interferentes com outras proteínas e com uma molécula de menores dimensões. É estudada ainda a performance electroquímica de um biossensor construído através da mesma técnica de impressão molecular para a quantificação da enzima amilase. É feita uma tentativa de quantificação em amostras reais de saliva.

No capítulo 7 – Considerações Finais - são apresentadas as principais conclusões de todo o trabalho desenvolvido e as perspectivas de trabalho futuro.

## **2. Introdução teórica**

## 2.1 (Bio)sensores

Um sensor químico é um dispositivo que, como resultado de uma interação química entre o analito e o dispositivo do sensor, transforma informação química ou bioquímica, quantitativa ou qualitativa, num sinal analítico útil [1]. Todos os sensores químicos contêm dois componentes básicos: um sistema de reconhecimento químico (recetor) e um sistema que transforme a interação existente num sinal detetável (transdutor).

A Figura 2.1 esquematiza os componentes de um sensor e o seu modo de funcionamento. O analito interage com o recetor, o transdutor traduz as alterações provocadas pela interação entre o analito e o recetor transformando-a num sinal possível de ser detetado e trabalhado por uma interface eletrónica. [2]

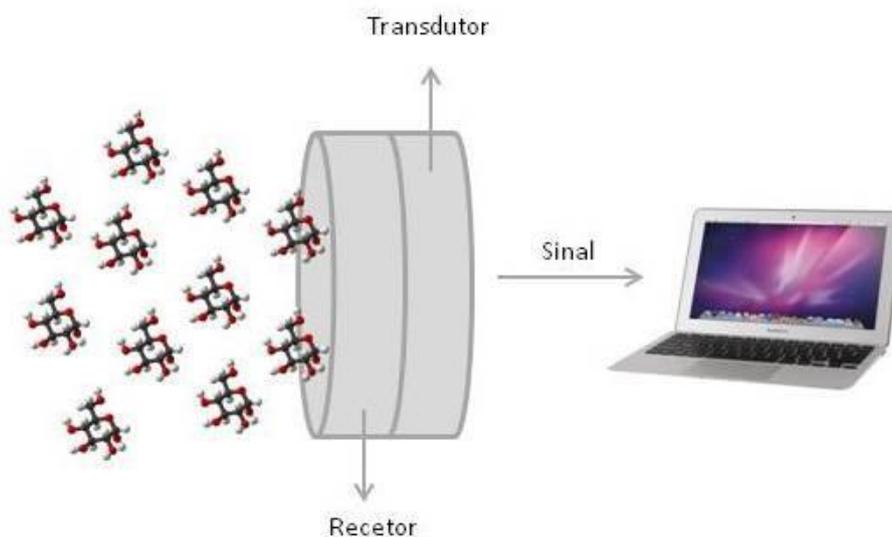


Figura 2.1. – Representação do modo de funcionamento de um sensor

O primeiro biossensor foi descrito em 1962, como um “elétrodo enzimático”, que introduzia glucose oxidase numa membrana de diálise com o objetivo de determinar a quantidade de glucose no sangue. [3]

Apesar de nos primeiros anos de aparecimento dos biossensores estes terem sido genericamente considerados como dispositivos analíticos que respondiam à presença de elementos químicos em amostras biológicas [4], hoje em dia, para

que a classificação como biossensor possa ser considerada, é necessário que um elemento biológico esteja incorporado no recetor, de forma a intermediar a interação entre o analito e o sensor. [5-7] Dependendo do objeto de estudo, estes elementos de reconhecimento podem ser as mais variadas moléculas biológicas, enzimas, anticorpos, microorganismos, DNA. Para deteção de elementos biológicos usam-se também, cada vez mais, como elemento de reconhecimento, materiais artificiais como nanopartículas, polímeros ou materiais de impressão molecular. [8]

De forma genérica pode afirmar-se que um bom sensor deve apresentar as seguintes características: [9, 10]

- Responder continuamente e de forma reversível;
- Transformar a informação química num sinal mensurável;
- Responder de forma rápida;
- Manter a sua atividade ao longo do tempo;
- Ser barato;
- Ser miniaturizável;
- Ser específico e seletivo;
- Não interferir com a amostra.

A superfície de um sensor é um aspeto muito sensível para o desempenho do sensor. Uma boa performance do sensor está diretamente relacionada com a escolha da superfície e com a sua preparação. Dependendo do uso pretendido, uma vasta gama de materiais pode ser usado, entre eles o ouro, a prata, o grafeno ou os nanotubos de carbono. A escolha do elemento de reconhecimento deve ser efetuada de acordo com o método analítico em estudo e com a aplicação a que se destina. [2]

Apesar de ser o campo médico aquele que mais condiciona a investigação em biossensores, estes são usados em áreas tão diversas como o controlo alimentar ou a monitorização ambiental. A maior parte das aplicações requer uma deteção

ou identificação rápida, com boa precisão e que possa ser realizada em qualquer local.

É a interação entre o elemento de reconhecimento e o analito que vai determinar a seletividade global do sensor construído e a imensa variedade de moléculas possíveis de incorporar permite a imobilização de elementos com afinidade específica para a molécula desejada, possibilitando o desenho de uma interação altamente seletiva. [8]

Para além do elemento de reconhecimento, a construção dos biossensores assenta ainda num outro parâmetro muito importante – o processo de transdução do sinal obtido; desta forma, os biossensores podem ser classificados de acordo com o princípio em que se baseia o funcionamento do transdutor, podendo ser óticos [11-13], térmicos [14], piezoelétricos [15], magnéticos [16] ou eletroquímicos [17].

Dentro das várias classes de transdução citadas na literatura, a transdução eletroquímica foi a base da nossa escolha para a construção dos sensores em estudo, devido às suas características mais atrativas: elevada sensibilidade e seletividade, simplicidade experimental, velocidade de resposta, portabilidade, facilidade de automatização, baixo custo, possibilidade de usar em amostras coradas ou com grande quantidade de materiais em suspensão. Neste tipo de sensores o elemento de reconhecimento e transdução é um eléctrodo de trabalho e os resultados obtidos estão relacionados com a mobilidade de cargas e/ou com as reações de oxidação/redução que ocorrem à sua superfície [5].

Dada a importância, já referida, do elemento de reconhecimento para a performance global de um biossensor, os diferentes materiais (polímeros, enzimas, e nanopartículas) e as técnicas de modificação de superfície dos eléctrodos de trabalho (adsorção e impressão molecular), utilizados ao longo deste estudo, serão abordadas ao longo deste capítulo.

## 2.2 Modificação de superfícies

A escolha do material de eletrodo para a construção de um sensor está dependente de variados fatores, devendo ser feita tendo em conta o método analítico em desenvolvimento, o objetivo de aplicação e as características da reação redox envolvida. O material deve ser escolhido de forma a manter características como exatidão, sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados, assim como um baixo limite de detecção.

As características que um material deve ter para ser usado como sensor eletroquímico são [9]:

- Baixa resistência óhmica;
- Baixa corrente residual;
- Possibilidade de regeneração da superfície;
- Ampla janela de potencial;
- Elevada sobrepotencial para a redução do  $O_2$
- Elevada sobrepotencial para a redução do  $H^+$

Dependendo do modo de medição, um conjunto muito variado de materiais, como o ouro, a prata, a platina ou o carbono, pode ser usada como superfície de transdutora. O uso destes materiais permite a determinação de algumas espécies químicas, no entanto começaram a surgir dificuldades como a discriminação de compostos com características redox semelhantes, com a adsorção dos próprios produtos da reação, ou porque a sensibilidade do eletrodo não era a suficiente para alguns composto ou a sua reprodutibilidade baixa [18]. Com o objetivo de minimizar alguns destes efeitos e melhorar o desempenho dos eletrodos surgiram os eletrodos modificados. A alteração das características da superfície de recepção de um sensor pode ser determinante para o aumento da sua performance global, resultando numa detecção mais eficiente de biomoléculas eletroativas a potenciais mais baixos e diminuindo as interferências [19].

A possibilidade de estabelecer interações específicas, que possibilitem melhorar a afinidade de ligação à molécula em estudo, por imobilização de

elementos de reconhecimento à superfície do recetor é uma das características que confere uma maior seletividade aos biossensores. O elemento de reconhecimento presente no recetor é fundamental para a seletividade do sensor, existindo diversos tipos de moléculas (biológicas ou artificiais) que podem cumprir estas funções num biossensor (tais como péptidos, enzimas, anticorpos, microorganismos, DNA, RNA ou polímeros molecularmente impressos (MIPs)). [8]

A modificação química dos elétrodos para análise vestigial, pode também permitir a preconcentração do analito num pequeno volume à superfície do eléctrodo, tornando possível a deteção de baixas concentrações o que, sem o passo da pré-concentração, não seria possível. A modificação dos elétrodos com elementos eletrocatalíticos ou biocatalíticos (como as enzimas) permite ainda o aumento da seletividade do sensor [5], conduzindo à simplificação de procedimentos e diminuição de pré-tratamentos das amostras, o que se torna bastante útil em amostras complexas. A modificação química dos elétrodos permite ainda aumentar o conjunto de analitos analisáveis [20].

A grande maioria dos elétrodos modificados pode ser obtida por adsorção física, química, ou ligação covalente dos materiais que vão constituir o filme. Existe uma vasta gama de compostos orgânicos e inorgânicos que pode ser usada como modificante.

Na Tabela 2.1 estão listados alguns exemplos de compostos orgânicos ou inorgânicos, usados como modificante, em função do tipo de modificação de superfície utilizada.

Neste trabalho serão abordados diferentes tipos de modificação de elétrodos para construção de sensores. Em primeiro lugar foram estudadas as alterações em superfícies de carbono vítreo (para os ensaios eletroquímicos) e mica (para a obtenção de imagens de superfície) por deposição de materiais compósitos constituídos por um polímero condutor e nanopartículas de ouro.

Por último, foi estudado um método de deteção de proteínas por impressão molecular numa rede polimérica construída em superfícies de carbono.

**Tabela 2.1 – Algumas moléculas usadas para a modificação de elétrodos por adsorção química e ligação covalente.**

<b>Tipo de modificação</b>	<b>Modificante</b>	<b>Utilização</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Adsorção química	Nanoestruturas Dipéptido-Grafeno	Sensor de peróxido de hidrogénio	[21]
	Sarcosina Oxidase	Sensor de sarcosina	[17]
	Ftalocianina de Zinco (II)	Sensor de amónio	[22]
	Hidroximetilpireno	Células solares	[23]
Ligação covalente	Lactato oxidase	Sensor de lactato	[24]
	Glucose oxidase	Sensor de glucose	[25]
	Ftalocianina de Zinco (II)	Sensor de amónio	[22]
	Enxofre	Baterias de iões sódio	[26]

## 2.2.1 Modificação de superfícies com materiais compósitos

### 2.2.1.1 Polímeros Condutores

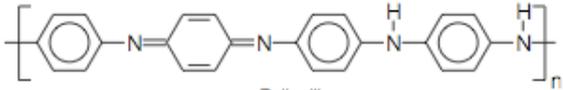
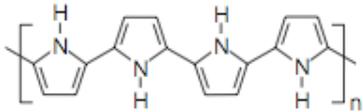
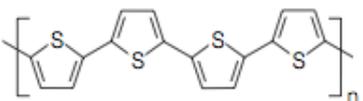
Apesar do seu comportamento como isolante elétrico, quando sujeitos à aplicação de elevadas voltagens, ser uma das características a que primeiro associamos os polímeros, a ideia de que sólidos orgânicos apresentassem uma condutividade elétrica, comparável à dos metais, foi proposta há mais de meio século com o objetivo de tirar partido das propriedades elétricas dos metais associadas às propriedades mecânicas dos polímeros. Os primeiros trabalhos desenvolvidos passaram pela incorporação de cargas condutoras (negro de fumo, fibras metálicas ou fibra de carbono) a polímeros, produzindo os chamados “polímeros condutores extrínsecos” (extrínsecos, pois a carga condutora é adicionada). Só na década de 70 do século passado foram publicados os primeiros estudos de dopagem de polímeros com o objetivo de os tornar condutores. A primeira publicação conhecida estuda a dopagem do poliacetileno com iodo e foi publicada em 1977, o que valeu aos seus autores o Prémio Nobel da Química em 2000. [27, 28]

Nos últimos anos, uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida e exaustivamente estudada, devido à descoberta da sua capacidade intrínseca para conduzir eletricidade.

Esta nova classe de materiais, chamada de “metais sintéticos”, possui um potencial de condução elétrica devido à presença, na sua estrutura, de longos sistemas  $\pi$  conjugados, alternância de ligações simples e duplas ao longo da cadeia carbonada e que permitem a deslocalização de carga. Os elétrons  $\pi$  da ligação dupla podem, facilmente, ser removidos ou adicionados, por oxidação/redução da cadeia polimérica, formando um ião. Este papel é levado a cabo por agentes de transferência de carga (aceitadores/dadores de elétrons), convertendo o polímero de isolante em condutor ou vice-versa. Esses agentes são chamados “dopantes” numa analogia com a dopagem dos semicondutores, no entanto, são adicionados em quantidades muito superiores (a massa do dopante pode chegar a 50% da massa total do composto).[29]

Têm vindo a ser publicados estudos com diversos polímeros, que podem apresentar características condutoras, como a polianilina (PANI), o polipirrole, o politiofeno. Uma lista com alguns exemplos de polímeros condutores e as suas condutividades encontram-se na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2 – Estrutura, condutividade e principais características de alguns polímeros condutores, adaptado de [30].**

Polímero Conductor	Condutividade / (S/cm)	Principais características
 <p>Poliacetileno</p>	$10^3 - 1,7 \times 10^5$	Primeiro polímero a ser dopado (vapor de iodo) Difícil de sintetizar Instável ao ar
 <p>Polianilina</p>	30 - 200	Fácil de sintetizar Barata Não-biodegradável Facilidade em mudar entre a forma condutora e resistiva
 <p>Polipirrol</p>	$10^2 - 7,5 \times 10^3$	Boa estabilidade química Facilmente sintetizada à temperatura ambiente e em vários solventes Facilidade de controlo do processo de síntese e da resposta do polímero
 <p>Politiofeno</p>	$10 - 10^3$	Possui um conjunto de derivados com diferentes características como o PEDOT (com melhor estabilidade térmica e condutividade) ou o poli-hexiltiofeno (boa condutividade, estabilidade ambiental e solubilidade em solventes orgânicos)

A variedade de polímeros condutores existente atualmente, bem como as suas diversas características, permitem que o seu campo de aplicações seja cada vez mais vasto e que os estudos para o seu conhecimento mais aprofundado continuem a surgir regularmente. Algumas aplicações nas mais diversas áreas, tais como sensores, inibidores de corrosão, dispositivos electrocrómicos, células solares, ou baterias encontram-se relatadas na literatura [31, 32].

Os polímeros condutores podem ser sintetizados, tanto química como electroquimicamente, à excepção do poliacetileno que só é formado quimicamente. A grande maioria dos polímeros condutores pode ser produzida por oxidação, permitindo a obtenção do filme condutor diretamente sobre a superfície de um eléctrodo.

A condutividade de um polímero pode ser modificada (desde a sua forma isoladora à condutora) através do uso de diversas técnicas de dopagem [33]:

- Dopagem química por transferência de carga;
- Dopagem eletroquímica;
- Dopagem por reação ácido-base (apenas para a polianilina);
- Fotodopagem;
- Injeção de carga na interface polímero semi-condutor/metal (*in situ*);
- Dopagem mecânica.

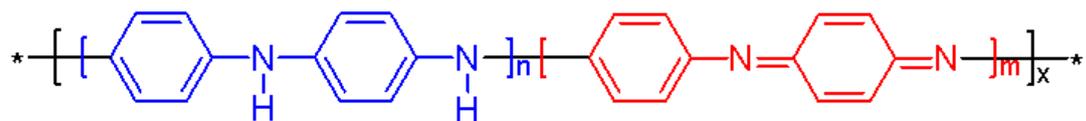
Zhao e Li descrevem um processo de dopagem de filmes de politiofeno, por oxidação eletroquímica, para detecção seletiva de tióis e aminas voláteis. A dopagem é efetuada pelo ácido tetracloroaurico e permite variações, não só na condutividade (de 47,2  $\mu\text{S/cm}$  no politiofeno para 71,7  $\text{S/cm}$  no politiofeno dopado com  $\text{HAuCl}_4$ ) do polímero dopado, mas também na coloração que apresenta. [34]

Para o mesmo polímero, o politiofeno, várias outras técnicas de dopagem estão descritas na literatura; são exemplos disso a dopagem *in situ* com moléculas de iodo, como descrito por Paosawatyanong [35], ou a dopagem mecânica na presença de micro e nano partículas de cobre, aumentando uma e duas ordens de grandeza, respetivamente, na condutividade do compósito obtido. [36]

#### **2.2.1.1.1 Polianilina**

A polianilina é considerada como um dos polímeros condutores mais favoráveis para várias aplicações eletroquímicas e eletrónicas, devido às suas características únicas. A sua elevada performance elétrica, fácil

controlo da condutividade, estabilidade térmica, fácil manuseamento [37], bem como facilidade de síntese e possibilidade de deposição em vários substratos como a platina, tornou-a um dos polímeros condutores mais estudados desde que as suas características como condutor elétrico foram descobertas nos anos 80. [38] A polianilina é constituída por grupos fenilo ligados a um grupo –NH, sendo a sua forma geral apresentada na Figura 2.2.



**Figura 2.2 – Estrutura geral da Polianilina na forma de base de esmeraldina, em que  $n + m = 1$  e  $x$  equivale ao grau de polimerização. (adaptado de [39])**

Os filmes de polianilina podem ser sintetizados por oxidação química da anilina, por eletropolimerização da anilina, ou por oxidação autocatalítica em circuito aberto da anilina.[31]

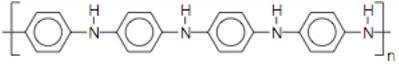
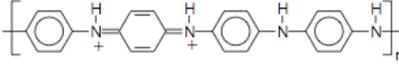
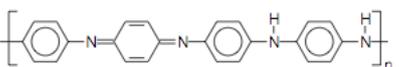
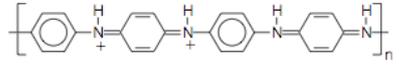
A polianilina pode apresentar-se em quatro estados de oxidação diferentes. São eles a forma de leucoesmeraldina, pernigranilina, base de esmeraldina (forma intermediária) e sal de esmeraldina (forma condutora). Tanto pelo método de oxidação química como por eletrodeposição, a PANI é normalmente preparada como sal de esmeraldina que, quando tratado com uma base, pode transformar-se na forma intermediária não-condutora. [33]

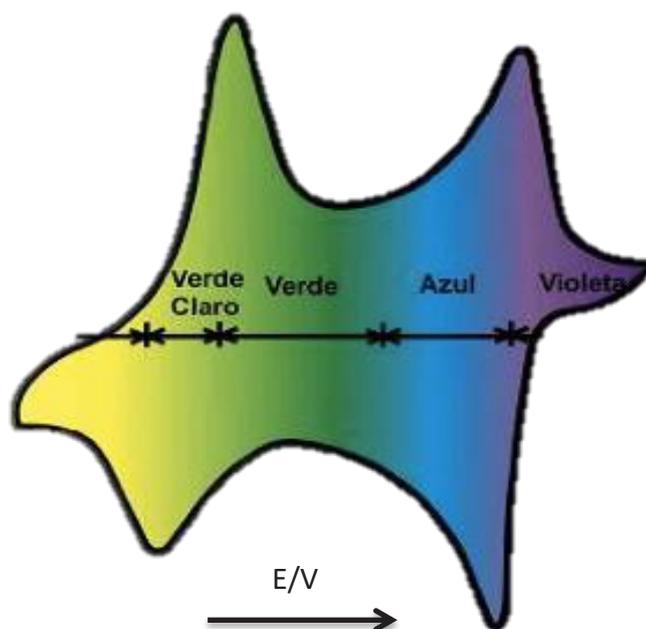
Para além da sua elevada condutividade elétrica, que chega à ordem de  $10^2$  S/cm, outra das suas propriedades interessantes é a de apresentar diferentes colorações quando se variam as condições de pH ou o potencial elétrico.[29]

A estrutura das diferentes formas da PANI, bem como algumas das suas principais características podem ser observadas na Tabela 2.3.

Os vários estados de oxidação da polianilina, desde a forma mais reduzida da leucoesmeraldina (amarela) até à forma mais oxidada da pernigranilina (roxa), podem ser acompanhados por voltametria cíclica [40-43]. A Figura 2.3 mostra o resultado de um ensaio de voltametria cíclica numa solução de HCl 1,0 mol/L a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s [40].

**Tabela 2.3 – Estados de oxidação da polianilina: leucoesmeraldina, sal de esmeraldina, base esmeraldina e pernigranilina. [44]**

Estado de oxidação	Estrutura	Cor	Característica	Eoxidação
Leucoesmeraldina		Amarela 310	Isolante	Completamente reduzida
Sal de esmeraldina		Verde 320, 420, 800	Condutora	Parcialmente oxidada
Base esmeraldina		Azul 320, 620	Isolante	Parcialmente oxidada
Pernigranilina		Púrpura 320, 530	Isolante	Completamente oxidada.

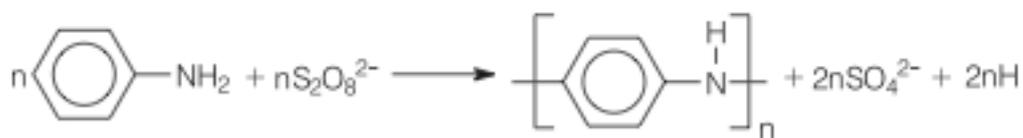


**Figura 2.3. - Voltamograma cíclico da polianilina, as diferentes cores representam os diferentes estados de oxidação da PANI. Adaptado de [40].**

O produto da oxidação da anilina foi preparado pela primeira vez em 1862, porém as suas propriedades foram apenas reconhecidas cerca de 100 anos depois, despertando um interesse particular devido ao baixo custo da sua produção, à

facilidade de síntese e ao seu alto rendimento.

Para a síntese da polianilina – na sua forma condutora, é fundamental manter o meio com  $\text{pH} \approx 1,0$ . Alguns dos agentes oxidantes estudados para a produção de polianilina foram o  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , o  $\text{KMnO}_4$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o  $\text{FeCl}_3$  ou o  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , sendo este último muito utilizado por apresentar bons resultados, tanto a nível de rendimento como de condutividade. [40] A reação de síntese da polianilina, por oxidação do monómero de anilina na presença de peroxidissulfato de amónio, como agente oxidante, está esquematizada na Figura 2.4.



**Figura 2.4. – Equação geral da síntese da Polianilina.**

Nos estudos de dopagem de polímeros orgânicos, a passagem para o estado condutor é acompanhada por processos de oxidação/redução. No entanto, a polianilina parece ser um caso diferente na dopagem de polímeros uma vez que não apresenta alterações no número de eletrões associados à cadeia polimérica durante o processo, que ocorre apenas por protonação. Assim, os azotos podem estar total ou parcialmente protonados, dependendo do pH da solução ao qual o polímero foi exposto, podendo obter-se o polímero na forma de sal (forma dopada). O sal de esmeraldina é a forma estrutural onde a PANI alcança os maiores valores de condutividade. Através de reações de oxidação e redução, bem como de tratamentos com ácidos e bases, é possível converter, de forma reversível, a PANI nas suas diferentes formas, o que confere a este polímero um grande potencial de aplicações tecnológicas [45].

Na síntese eletroquímica, a polimerização da polianilina ocorre por oxidação anódica da anilina diretamente sobre um elétrodo de um material inerte como o ouro, a platina ou o carbono. As vantagens desse método de síntese são:

- A obtenção de filmes finos de polímero;
- Maior controle de síntese;
- Não há necessidade de usar agentes oxidantes e catalisadores.

Apesar disso, apresenta também algumas desvantagens como a difícil remoção do polímero do eletrodo de trabalho. A síntese química é mais difícil de controlar e não permite a formação simultânea de filmes, no entanto, permite a obtenção de maiores quantidades em massa de polímero e a síntese de polímero com maiores massas molares. Ambos os métodos de síntese possuem vantagens e desvantagens e a escolha da síntese utilizada depende da aplicação destinada à PANI. [40]

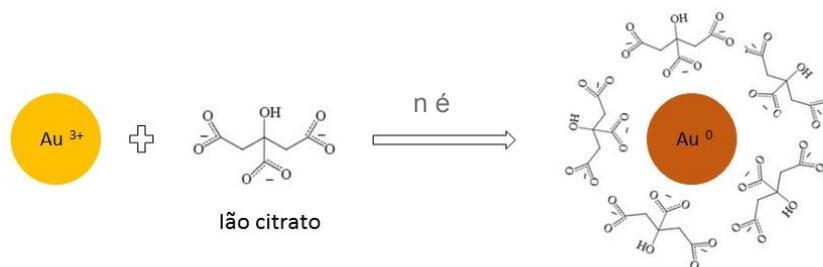
A formação de nanocompósitos com polianilina tem chamado muito a atenção na bibliografia mais recente, uma vez que a inserção de nanomateriais na matriz polimérica (nanopartículas metálicas, semicondutores, etc.) pode aumentar a condutividade e a estabilidade, ou alterar as propriedades magnéticas do compósito obtido, aumentando consideravelmente as possibilidades de aplicações. [40, 46, 47]

### **2.2.1.2 Nanopartículas de ouro**

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm tido uma vasta aplicação, desde a catálise, à detecção química e biológica, ou à espectroscopia de Raman, devido às suas propriedades promissoras, tais como elevado coeficiente de dispersão, grande área superficial, elevada sensibilidade a variações ambientais e toxicidade negligenciável.

A sua síntese com controlo de forma e tamanho tornou-se um tópico muito atrativo hoje em dia. Rotineiramente, as dispersões de ouro são preparadas por redução química a partir dum precursor de ouro apropriado, normalmente  $\text{HAuCl}_4$ , na presença de um agente redutor. [48] A forma e o tamanho das AuNPs dependem das várias variáveis do processo, tais como a concentração dos reagentes, temperatura, pH, presença de aditivos, surfactantes, etc [49].

Na Figura 2.5 está esquematicamente representada a síntese das nanopartículas de ouro pelo método do citrato.



**Figura 2.5. – Representação esquemática da síntese das nanopartículas de ouro, usando íões citrato como agente redutor e estabilizante.**

O método do citrato está muito estudado para a preparação de nanopartículas de ouro esféricas monodispersas; neste método o anião citrato atua como agente redutor e estabilizante. A estequiometria desta reação foi já estudada por diversos autores e mostra que uma mole de íão citrato consegue reduzir mais de quatro moles de ácido tetracloroáurico a  $\text{Au}^0$ , sendo por sua vez oxidado a 3-oxoglutarato  $(\text{COOCH}_2\text{COCH}_2\text{COO})^{2-}$  [50]. O processo de formação e crescimento das nanopartículas está muito dependente das condições do meio, nomeadamente pH e temperatura. Após a formação inicial dos primeiros núcleos de nanopartículas, o seu crescimento posterior pode ser devido à contínua redução do ouro à superfície das AuNPs já existentes ou pela agregação com outras partículas [49, 51].

A modificação de superfícies de elétrodo com nanopartículas de ouro pode ocorrer por interação eletrostática – em que ocorre a interação entre a superfície do elétrodo e as nanopartículas carregadas negativamente e estabilizadas pelo citrato – ou por formação de ligações covalentes – através da ligação entre o ouro e os grupos funcionais presentes à superfície do elétrodo (-SH, -NH<sub>2</sub>, -CN) [52].

### 2.2.1.3 Incorporação de nanopartículas em filmes poliméricos

Existem já diversos estudos combinando a presença de nanomateriais de diferentes espécies, como as nanopartículas metálicas de ouro e prata, nanotubos de carbono, nanopartículas de óxidos de ferro, óxidos de titânio e

outros compostos, com os mais diversos polímeros condutores. O objetivo de todos estes estudos passa por melhorar a resposta dos materiais poliméricos através da alteração das suas características que ocorre pela introdução das nanopartículas no seu seio, nomeadamente por alterações na sua condutividade, alteração de potenciais de oxidação/redução, estabilidade, aumento de área superficial.

Estes materiais compósitos contendo nanopartículas possuem uma enorme variedade de aplicações em campos tão distintos como a medicina (por exemplo no desenvolvimento de novos agentes de contraste [53], no tratamento do cancro [54] ou como meio de transporte e administração de fármacos [55]), a biomedicina [56, 57] e mais recentemente em células fotovoltaicas orgânicas [58] ou em baterias [59, 60] e células de combustível [61].

No caso das aplicações eletroquímicas, como os sensores, baterias e células de combustível, o sucesso destas aplicações está fortemente ligado às melhorias do desempenho eletroquímico dos materiais de eletrodo utilizados e à forma como a transferência de carga ocorre. O uso de polímeros, de nanopartículas metálicas e, mais recentemente, de compósitos de polímeros incorporando nanopartículas metálicas têm sido estratégias utilizadas para atingir essa melhoria do desempenho dos materiais de eletrodo [62]; todavia, e apesar dos avanços verificados, ainda não há uma compreensão total dos processos envolvidos.

No desenvolvimento de novos compósitos polímero-nanopartícula devem ser contemplados vários aspetos, dos quais devemos salientar os seguintes [63]:

- Propriedades físicas dependentes das dimensões das nanopartículas;
- Aglomeração das partículas;
- Reprodutibilidade da preparação dos compósitos;
- Influência de aditivos como tensioativos, plastificantes entre outros nas propriedades dos compósitos;
- Estabilidade térmica e tempo de vida dos compósitos.

Um estudo sobre as propriedades eletroquímicas da polianilina modificada com nanotubos de carbono foi publicado em 2011, descrevendo um método simples

de polimerização *in situ* que permite obter uma camada fina e homogênea de polianilina sobre os nanotubos de carbono [64].

Em 2012 foi publicado, por Ding et al., [65] um estudo sobre a atividade eletrocatalítica de compósitos PANI/nanotubos de carbono na redução do bromato – subproduto na desinfecção da água potável – que mostra que estes compósitos sintetizados por oxidação química *in situ* apresentam resultados catalíticos melhores que aqueles que são obtidos pela PANI não modificada. A redução do bromato ocorre em simultâneo com a transformação do sal de esmeraldina em leucoesmeraldina em meio ácido.

Um trabalho de Spain et al, publicado em 2011, [66] relata a construção de um biossensor para fragmentos de DNA associados a um elemento patogénico relacionado com o desenvolvimento de metástases, em que fibras de polianilina cobertas com nanopartículas de ouro crescem à superfície de elétrodos de ouro, permitindo um aumento de cerca de quatro vezes da área disponível para interação com os fragmentos de DNA em estudo.

Em 2013, Zou et al. [67] depositaram um filme nanocompósito de nanopartículas de ouro e polianilina à superfície de um elétrodo de carbono vítreo com o objetivo de construir um sensor para a deteção de epinefrina e ácido úrico. Os resultados obtidos mostram melhorias na sensibilidade do sensor (consegue detetar concentrações aproximadamente 10x inferiores) pela incorporação do filme compósito, quando comparado com outros sensores reportados na literatura.

Neste trabalho será testada a incorporação de polianilina, produzida quimicamente a partir da anilina em meio ácido, bem como a incorporação de nanopartículas de ouro, produzidas em meio de citrato, na superfície de elétrodos com a finalidade de serem usados, posteriormente, como biossensores.

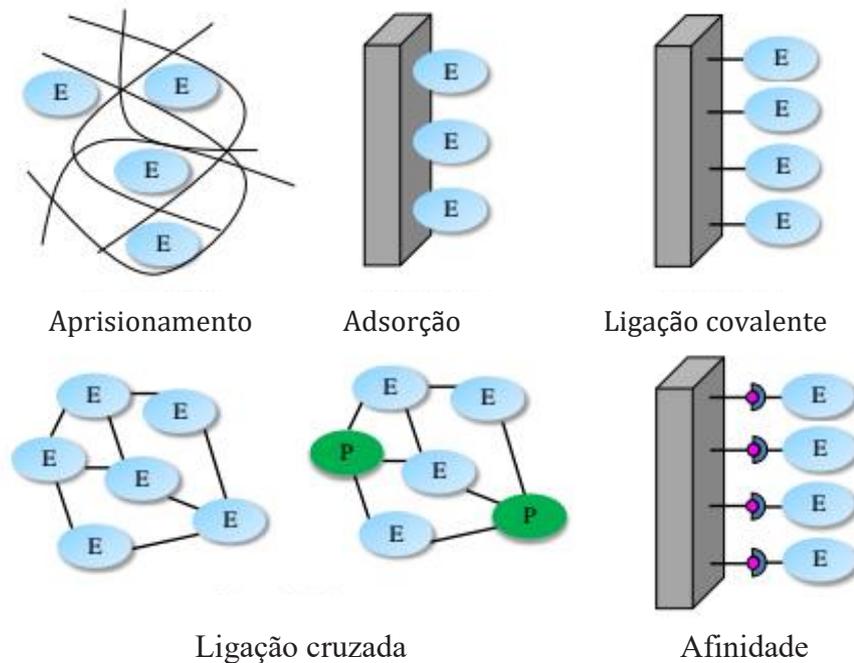
## 2.2.2 Enzimas como elemento de reconhecimento

Os biossensores enzimáticos [68] são uma classe muito promissora de sensores quando comparados com os métodos analíticos mais tradicionais, uma vez que podem ser usados para diagnóstico, em tempo real, na monitorização de doenças e possuem vantagens como elevada sensibilidade e especificidade em relação ao substrato. Possuem ainda características como a portabilidade, possibilidade de miniaturização, de produção em massa e em alguns casos de reutilização, diminuindo os custos de deteção. Estas características tornaram-nos uma ferramenta muito importante na análise qualitativa e quantitativa de uma enorme variedade de moléculas-alvo, em áreas tão distintas como a biomedicina [69], ambiente [70], controle de qualidade alimentar [71], agricultura [72], indústria farmacêutica e no sector clínico [73].

### 2.2.2.1 Métodos de imobilização

A estratégia de imobilização mais recorrente consiste na deposição da enzima na superfície do transdutor de maneira a que a sua interação com o analito crie um sinal elétrico mensurável [17]. Para uma boa performance do biossensor é necessário que o passo de imobilização seja efetivo. É fundamental que as enzimas se mantenham ligadas à superfície do transdutor de forma estável, que não ocorra nenhum fenómeno de desorção durante o uso do biossensor e que a sua estrutura e funcionalidade seja preservada de forma a manter a atividade biológica, para que seja possível obter uma medição precisa, reprodutível e com um bom tempo de vida do sensor. Uma vez que o método de imobilização escolhido vai influenciar fatores como a orientação da enzima, a sua mobilidade, estabilidade, estrutura e atividade biológica, irá necessariamente afetar também características como a sensibilidade, seletividade e estabilidade da enzima. Desta forma o desenvolvimento de estratégias de imobilização bem-sucedidas é um passo fundamental na construção de um biossensor. [74]

Diferentes tipos de estratégia, para uma correta imobilização de proteínas à superfície do transdutor, estão já referenciadas na literatura [75-77] e podem ser observadas na Figura 2.6.



**Figura 2.6.** – Representação esquemática dos principais métodos de imobilização enzimática descritos na literatura. (E – enzima, P – proteína inserida). Adaptada de [74].

As estratégias de imobilização têm por base a utilização de um ou de uma combinação de vários dos processos referidos.

Cada um destes métodos tem as suas vantagens e desvantagens. A escolha do mais apropriado depende da natureza da enzima, do transdutor e da forma de deteção associada ao processo. O melhor método de imobilização enzimática vai também depender do tipo de aplicação, se requer o máximo de sensibilidade ou se, por outro lado, a estabilidade do processo é o fator mais importante. É necessário ter também em conta fatores como a reprodutibilidade, o custo e a dificuldade de imobilização da enzima aquando da escolha do melhor processo. A sensibilidade vai diminuir nos casos em que a imobilização provoca a desnaturação da enzima, alterações à sua conformação ou se o centro ativo da enzima for afetado. A melhor sensibilidade do sensor é obtida quando as

enzimas são imobilizadas de forma orientada à superfície do transdutor, com o seu centro ativo exposto à solução. [74]

### **2.2.2.1.1 Adsorção**

A imobilização enzimática pelo método de adsorção é muito usada devido à simplicidade do seu protocolo. A solução contendo a enzima precisa apenas de ser colocada em contacto com a superfície que se deseja modificar, durante um determinado período de tempo. O processo de adsorção baseia-se em diversos tipos de ligação fracas tais como forças de Van der Waals, interações eletrostáticas ou hidrofóbicas.[74]

O processo de adsorção tem a vantagem de não necessitar de funcionalização prévia da superfície de imobilização, o que facilita a manutenção da atividade das enzimas. Por outro lado, uma vez que a ligação estabelecida não é muito forte, pequenas alterações de temperatura, pH ou força iónica podem levar à desorção da enzima. Uma outra desvantagem deste processo é a elevada probabilidade de ocorrerem fenómenos de adsorção não-específica de outras proteínas ou substâncias presentes na amostra. É necessário grande atenção às condições de armazenamento devido à baixa estabilidade da ligação.[74]

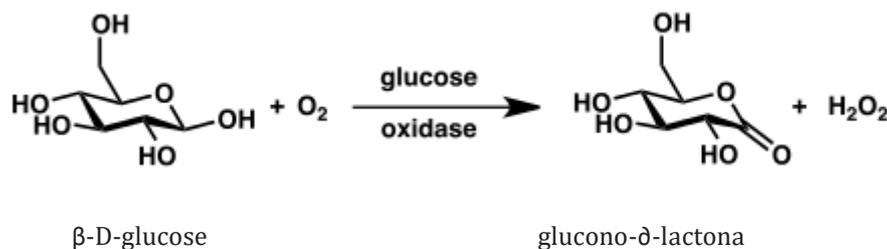
### **2.2.2.2 Sensores de glucose**

Uma grande variedade de biossensores enzimáticos baseados em deteção eletroquímica para aplicações clínicas reais tem sido muito desenvolvida em formato descartável e estão disponíveis comercialmente.

Os biossensores enzimáticos mais usados no setor clínico são para a glucose, lactato, glutamato, ureia e colesterol, mas de todos estes, a glucose é, sem dúvida, o analito mais estudado. A concentração normal de glucose no sangue varia entre 80 a 140 mg/dL e a sua determinação é fundamental no controle e tratamento da diabetes, cujo grau de prevalência nos países industrializados é

de cerca de 4%. Outros fatores, como a sua importância nas células de biocombustível glucose-O<sub>2</sub>, tornam este tema de grande importância. [68, 78] Os biossensores enzimáticos clássicos baseiam-se na ação de uma enzima oxireductase acoplada à detecção amperométrica. A conversão biocatalítica do analito de interesse é relacionada com um processo redox de transferência eletrônica à superfície do eletrodo, que poderá ser posteriormente quantificada, uma vez que deste processo de transferência eletrônica resulta a formação de uma intensidade de corrente proporcional à concentração do analito. [68]

No caso dos biossensores de glucose, a enzima glucose oxidase vai catalisar a oxidação da β-D-glucose a glucono-δ-lactona, usando o oxigênio molecular como aceitador de elétrons e produzindo peróxido de hidrogênio. Tal como é traduzido pela equação representada esquematicamente na Figura 2.7. [79]



**Figura 2.7. – Reação de catálise da glucose oxidase.**

Vários tipos de sensores de glucose, de diferentes configurações, têm sido desenvolvidos, alguns para monitorizações *in vivo*.

Em 1996, Shaolin et al., descrevem a construção de um biossensor para a glucose, usando diferentes técnicas de imobilização, em que a glucose oxidase era incorporada num filme de polianilina; comparam as vantagens e desvantagens obtidas por cada uma das técnicas, concluindo que, por comparação com técnicas de adsorção, a deposição eletroquímica forma uma interação mais forte entre a polianilina e a enzima criando um biossensor mais estável ao longo do tempo. [80]

Singhal et al. descrevem, em 2002, a construção de um sensor de glucose, em que a superfície do eletrodo é modificada com uma monocamada de uma mistura contendo um poliofeno, ácido esteárico e a glucose oxidase. Estudaram

diferentes tipos de imobilização, tendo sido possível quantificar a glucose num intervalo de concentrações que variou entre os 100 e os 400 mg/dL. [78]

Em 2010, German et al., utilizaram a glucose oxidase imobilizada num elétrodo de grafite modificado com nanopartículas de ouro. Apesar de uma diminuição significativa do tempo de vida do sensor de glucose obtido na presença das nanopartículas, a taxa de transferência eletrónica mediada pela enzima aumentou consideravelmente no intervalo linear de 0,1 a 10 mmol L<sup>-1</sup>. [81]

Ramanavicius et. al, também em 2010, propuseram um novo método de fabricação para elérodos enzimáticos aplicável a um biossensor amperométrico de glucose ou a um ánodo de uma célula de biocombustível, em que a glucose oxidase era imobilizada por ligação cruzada com moléculas de glutaraldeído numa matriz de polianilina. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo do limite de deteção e um aumento da estabilidade do elétrodo na presença da polianilina. [82]

O desafio principal na construção dos biossensores enzimáticos é remover as interferências e obter seletividade suficiente em condições fisiológicas, devido à complexidade do ambiente biológico e à presença de várias espécies que podem ser facilmente oxidadas, tais como o ácido ascórbico ou o ácido úrico. Várias estratégias têm sido estudadas, numa tentativa de reduzir/eliminar o efeito dos interferentes, incluindo o uso de membranas seletivas como o Nafion, oxidação preliminar dos interferentes ou o uso de elérodos *'self-referencing'*. [68, 83]

Hoje em dia encontram-se já disponíveis comercialmente vários biossensores, enquanto muitos outros se encontram em fase de desenvolvimento. Embora biossensores baseados noutros elementos de bioreconhecimento estejam em rápido progresso (tal como os filmes molecularmente impressos que serão abordados no próximo subcapítulo), os biossensores enzimáticos são ainda dos mais frequentemente usados no campo biomédico. [84]

### 2.2.2.2.1 Detecção mediada

Os elétrodos enzimáticos amperométricos têm sido muito usados, pois permitem a transdução direta da reação. No caso do sensor de glucose é medida a intensidade de corrente criada, por aplicação de um potencial, devido à redução do oxigénio a peróxido de hidrogénio.

Este tipo de biossensores torna a sua ação dependente, não só da concentração ambiente de oxigénio, mas também da taxa de difusão do oxigénio em solução para a superfície do eletrodo. [85]

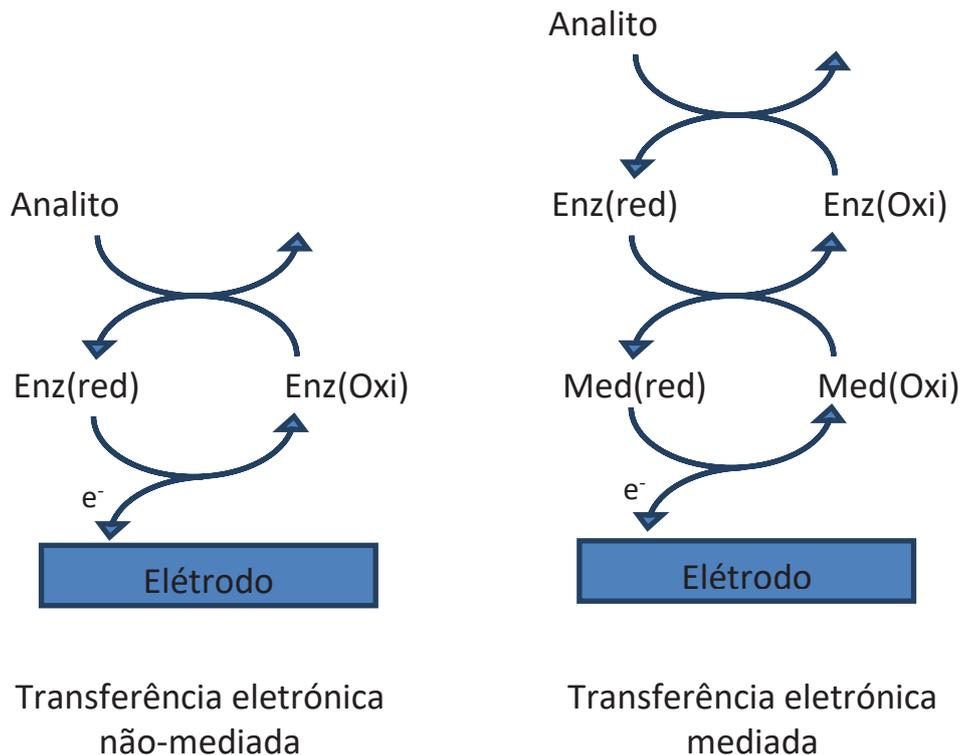
De forma a ultrapassar estes problemas, surgiu a ideia de usar aceitadores artificiais de eletrões, eletroquimicamente ativos, a quem a enzima pudesse doar os seus eletrões. Estes agentes de transferência eletrónica, que trocam eletrões entre o centro redox das enzimas e a superfície do eletrodo, chamam-se mediadores. Uma vez que, neste caso, todas as espécies electroquimicamente ativas com potenciais de conversão mais baixos que o potencial aplicado iriam contribuir para o sinal eletroquímico final obtido, é fundamental que o potencial aplicado seja o mais baixo possível. Ou seja, para que a interferência eletroquímica seja reduzida, os mediadores devem apresentar um potencial de oxidação muito baixo. [85]

Esta nova geração de biossensores enzimáticos opera em fases distintas. Em primeiro lugar a enzima participa na primeira reação redox com o analito em estudo, posteriormente é reoxidada pelo mediador, que finalmente se difunde até à superfície do eletrodo onde é oxidado, produzindo uma corrente de eletrões possível de ser quantificada. Os diferentes passos envolvidos neste processo, bem como a comparação entre a transferência eletrónica mediada e não-mediada, podem ser observados nos esquemas representados na Figura 2.8.

Como principais características de um mediador, é esperado que: [85]

- Seja estável nas condições de trabalho;
- Não participe em reações laterais durante a transferência eletrónica;
- Reaja rapidamente com a enzima reduzida;
- Apresente uma cinética reversível;

- A forma reduzida não deve reagir com o oxigénio;
- Possua um potencial de oxidação mais baixo que os possíveis interferentes presentes em solução;
- Ofereça um gradiente de potencial adequado para que a transferência eletrónica entre o centro ativo da enzima e a superfície do eléctrodo possa ocorrer.



**Figura 2.8.** – Representação esquemática das diferenças entre transferência eletrónica mediada e não-mediada. Adaptada de [85].

Se estas condições se verificarem, a medição vai tornar-se independente da concentração de oxigénio e o potencial de trabalho do sensor enzimático será determinado apenas pelo potencial de oxidação do mediador.

Uma vasta gama de compostos, desde corantes orgânicos como o azul de metileno, o violeta de metilo ou o azul da Prússia até iões metalo-orgânicos como o ferroceno, pode ser usada como mediador em biossensores enzimáticos. Diferentes tipos de quinonas, classe em que se inclui o mediador usado neste

trabalho, estão também descritos na literatura para uso como mediadores. [86, 87]

A Tabela 2.4 apresenta algumas das principais classes de compostos usados frequentemente como mediadores.

**Tabela 2.4. – Mediadores de diferentes classes e respetivo potencial de redução. (adaptado de [85])**

<b>Classe</b>	<b>Mediador</b>	<b>Potencial de redução mV (em relação ao SCE)</b>
Ferroceno e derivados	Ferroceno carboxiliado	275
	Vinil ferroceno	150
	Ferroceno	165
Quinonas	Benzoquinona	39
	Hidroquinona	60
Ferri/ferricianetos	Hexacianoferrato	180

Neste trabalho, a construção de um biossensor para a glucose, foi feita por imobilização da glucose oxidase através da adsorção à superfície de um eletrodo de carbono, na presença de polianilina e/ou nanopartículas de ouro, e usando a p-benzoquinona como mediador, é discutida em detalhe no quarto capítulo desta tese.

### 2.2.3 Polímeros molecularmente impressos

Como já foi referido anteriormente, o uso de elementos de reconhecimento biológico confere características de seletividade e especificidade a um sensor, sendo os anticorpos um dos elementos biológicos bastante utilizados na construção de biossensores [88]. No entanto, e apesar de conferir a elevada especificidade pretendida, ainda há no seu uso bastantes inconvenientes relacionados, principalmente, com a natureza irreversível da ligação que impossibilita o uso múltiplo do sensor, mas também com o custo associado ao uso de anticorpos e à sua conservação para manter a viabilidade do sensor desde o momento da preparação até à sua utilização.

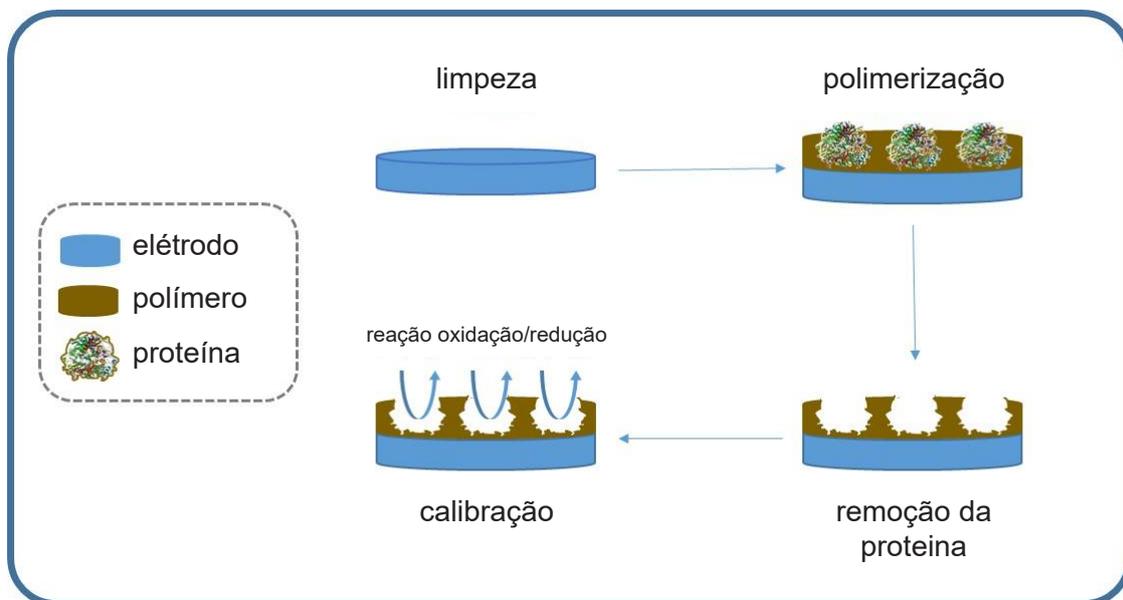
Como alternativa, uma nova estratégia baseada no uso de anticorpos artificiais como recetores biológicos, em substituição dos naturais, pode oferecer uma elevada estabilidade química [89] e promover uma resposta analítica reversível, permitindo - numa situação ideal - uma reutilização 'infinita' dos dispositivos do biossensor. Esta alternativa consiste no uso de polímeros molecularmente impressos (Molecularly Imprinted Polymers – MIPs), também designada por técnica de impressão molecular.

A técnica de impressão molecular é usada para a preparação de sensores com afinidade seletiva para uma molécula alvo, sendo uma alternativa promissora a compostos naturais como os anticorpos, enzimas ou recetores biológicos naturais. Os MIP têm a capacidade de seletivamente reconhecer moléculas, tais como drogas, proteínas ou outras biomoléculas [90]. Esta tecnologia, baseada no uso de moldes moleculares, permite criar sistemas poliméricos eficientes com capacidade para reconhecer moléculas bioativas específicas, onde a interação depende das propriedades e da concentração da molécula alvo presente no meio envolvente.

Apesar de existirem diferentes técnicas de impressão molecular, todas elas se baseiam na mesma estratégia geral. Em primeiro lugar a molécula alvo é misturada com o monómero escolhido, interagindo de forma a criar interações específicas (eletrostáticas, pontes de hidrogénio, etc.) entre os dois compostos.

De seguida dá-se o processo de polimerização e os locais de ligação do MIP são obtidos pelo arranjo dos monómeros ao redor da molécula alvo. Este processo vai dar origem à formação de uma rede polimérica rígida e tridimensional formada através de ligações covalentes e não covalentes. Uma vez criado o filme, a molécula-alvo é libertada da rede polimérica formando um material sólido com locais de ligação que são eletrostática e/ou geometricamente complementares à molécula-alvo. Estes locais de ligação vão ficar expostos e o polímero resultante apresenta afinidade, reconhece e liga-se seletivamente à molécula-alvo em estudo [91-93].

Um esquema do processo global de construção de um MIP encontra-se representado na Figura 2.9.



**Figura 2.9. – Representação esquemática das diversas fases de construção de um MIP.**

Para avaliar a seletividade obtida pelo método de impressão molecular é normalmente sintetizado um polímero não-impresso (NIP) – pelo mesmo método, mas na ausência da molécula alvo. A comparação entre a afinidade de ligação da molécula alvo para com o MIP e o NIP vai servir de controlo para avaliar a eficácia do processo.

### 2.2.3.1 Técnicas de impressão molecular

Existem diversas técnicas de impressão molecular já reportadas na literatura, que podem ser agrupadas em dois grupos principais: as técnicas de polimerização à superfície ou em solução. Cada uma delas tem as suas vantagens e desvantagens e a escolha da técnica apropriada deve ser feita tendo em consideração as propriedades da molécula alvo em estudo. [94] A impressão de proteínas em solução recorre a procedimentos experimentais muito simples, mas tem alguns problemas relacionados com a eficiência da extração da proteína, uma vez que há estrangimentos nos movimentos da molécula alvo no interior do polímero e tem normalmente uma cinética de ligação lenta. Os métodos de impressão à superfície permitem um controle mais apertado da modificação da superfície, a remoção da molécula alvo é muito mais simples e a ligação não específica bastante mais baixa. Apesar dos locais de ligação estarem muito mais acessíveis, o seu número é bastante inferior quando comparado com a impressão feita em solução. [92, 94]

Atualmente, os MIP mais usados para impressão de proteínas inteiras são por impressão à superfície, principalmente devido à sua elevada capacidade de ligação e ao facto de permitirem uma cinética de ligação/transferência de massa mais rápida. [92]

Diferentes técnicas podem ser enquadradas nesta classe de impressão molecular à superfície, tais como: [95]

- Estampagem/micro-contacto;
- Impressão de escovas poliméricas;
- Enxerto de superfície;
- eletropolimerização.

O enxerto à superfície e a eletropolimerização têm particular interesse no caso da impressão de proteínas, uma vez que constituem processos simples e bem-sucedidos para a montagem do filme polimérico ao redor de estruturas mais complexas. [95]

### 2.2.3.1.1 Eletropolimerização

A polimerização eletroquímica é um método de produção limpo que produz agregados dos monómeros presentes em solução diretamente no substrato, evitando o uso de solventes orgânicos voláteis. É também uma técnica bastante útil, uma vez que permite o controlo da taxa de nucleação e crescimento do polímero através da seleção apropriada dos parâmetros eletroquímicos. A espessura do filme pode ser controlada pela quantidade de carga que passa durante a deposição do filme [96] e a sua morfologia pode ser modificada pela escolha adequada do solvente e do eletrólito de suporte. [97] Estes fatores vão ser de maior relevância para a sensibilidade do sensor.

Este tipo de MIP baseados na eletropolimerização à superfície de elétrodos tem sido muito referida na bibliografia para o reconhecimento e deteção de moléculas alvo [98-100] e é considerada uma ferramenta promissora para a construção de biossensores com *design* simples, elevada estabilidade, resposta rápida, seletividade melhorada e bem-sucedida para a deteção de moléculas-alvo mais complexas [99, 100]

A polimerização eletroquímica é tipicamente realizada misturando a molécula alvo com o monómero escolhido, numa solução à qual são aplicadas as condições eletroquímicas necessárias para formar o filme polimérico molecularmente impresso à superfície do transdutor. A realização deste processo não requer nem um iniciador da polimerização, nem luz UV, nem calor. A seleção do monómero, bem como o modo/tempo de aplicação do potencial/densidade de corrente, são cruciais neste procedimento, levando à formação de camadas mais ou menos compactas do polímero, o que vai influenciar as suas características físicas e conseqüente desempenho analítico.[101]

Pelas características apresentadas acima, nomeadamente a resposta rápida e estável do sensor aliado a uma boa seletividade para moléculas mais complexas, esta foi a técnica escolhida para a síntese dos polímeros molecularmente impressos neste trabalho.

### 2.2.3.2 Impressão de proteínas

Para compostos de baixo peso molecular, este processo de impressão já se encontra bem estudado e referido na literatura [102-104], no entanto quando falamos de impressão de proteínas, nomeadamente enzimas [105], há muito menos trabalho desenvolvido nesta área (cerca de 25% de referências no ScienceDirect.com quando comparado com o universo de moléculas mais pequenas impressas em MIP), uma vez que são moléculas bastante grandes e difíceis de lidar.

Os principais problemas relacionados com o manuseamento de proteínas para a construção de MIP estão relacionados com fatores, tais como: [88, 93, 106, 107]

- A sua dimensão;
- A sua estrutura e conformação flexível;
- Sensibilidade à temperatura e ao ambiente que as rodeia;
- A existência de múltiplos locais carregados que variam de acordo com a conformação;
- A sua insolubilidade em solventes comuns.

Dois métodos distintos para a preparação de MIP para proteínas podem ser genericamente enunciados: num deles a impressão polimérica é realizada de maneira a que uma sequência de aminoácidos da proteína seja reconhecida, noutra que a proteína seja reconhecida pela sua forma global. Qualquer que seja o método escolhido, a preparação de MIP deve ser realizada em condições o mais próximo possível do ambiente nativo da proteína, tais como a realização da polimerização à temperatura ambiente e o uso de materiais compatíveis. Processos que permitam a criação destes sistemas sintéticos para impressão de proteínas com cada vez mais seletividade e sensibilidade têm sido alvo de estudo exaustivo.[88, 106]

Em 2004, Ramanaviciene et al. descreveram a construção de um MIP de polipirrole, depositado eletroquimicamente na superfície de um eletrodo

de platina, para a detecção de uma glicoproteína responsável pela leucemia bovina. A detecção eletroquímica direta da proteína foi conseguida, mas o papel preponderante das interações não específicas não permitiram a obtenção de seletividades e sensibilidades elevadas. [98]

Em 2011, Sontimuang et al. [108] combinam uma superfície impressa, com um transdutor capacitivo interdigital, para a detecção de proteínas alergénias presentes no latex; a deposição de um polímero no dispositivo permitiu registar alterações na capacidade do transdutor e dessa forma detetar uma resposta - dependente da concentração - à presença dos alergénios, até um limite de detecção de 10 ng/mL. Em 2014, Viswanathan et al. [109] relataram a possibilidade de detecção de um marcador de cancro do ovário através da construção de um sensor por impressão molecular numa superfície de ouro tri-dimensional. A construção do filme de policarbonato é feita por deposição eletroquímica e a detecção do biomarcador, após construção do sensor, é por via indireta recorrendo a um par redox de hexacianoferrato de potássio (III) e hexacianoferrato de potássio (II) em solução. O biossensor apresenta uma boa resposta, linear num intervalo entre 0,5 – 400 U/mL e um limite de detecção de 0,5 U/mL.

Neste trabalho foram construídos polímeros molecularmente impressos para a detecção de duas diferentes proteínas, a glucose oxidase e a amilase. A impressão foi realizada por eletropolimerização do ácido cafeico à superfície de um SPE de carbono, na presença da molécula-alvo em estudo. Foi usado um método indireto de detecção das proteínas e um par redox (hexacianoferrato de potássio (III) e hexacianoferrato de potássio (II)), que permitiu avaliar as variações ocorridas à superfície do eléctrodo por variação da concentração da proteína em estudo, utilizando técnicas de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de onda quadrada.

## 2.3 Transdução

Os avanços no desenvolvimento de métodos de transdução estão intimamente ligados ao desenvolvimento de áreas como a eletrônica e as ciências dos materiais. A investigação na área dos processos de transdução tem evoluído no sentido de permitir a construção de uma grande variedade de dispositivos simples e de baixo custo para fins comerciais. Dependendo da propriedade físico-química em estudo (transferência eletrônica, alterações de massa, transferência de calor, cor, índice de refração, etc.) é possível criar diferentes tipos de transdutores. O futuro passa também pela combinação de diferentes formas de transdução de forma a permitir o melhoramento da seletividade em biossensores. [15]

### 2.3.1 Transdução eletroquímica

Entre os diversos tipos de transdução citada na literatura, os sensores eletroquímicos são uma classe importante e muito atrativa de sensores químicos, pois permitem obter resultados com elevada sensibilidade, simplicidade experimental e baixo custo. Este tipo de transdução pode ser usada na análise qualitativa ou quantitativa de qualquer espécie que possa sofrer um processo de oxidação ou redução, permitindo também a realização de estudos fundamentais envolvendo processos redox em diferentes eletrólitos, processos de adsorção em diferentes materiais e mecanismos de transferência eletrônica em superfícies modificadas. [5, 18, 110]

Neste tipo de sensores o elemento de reconhecimento e transdução é um eletrodo de trabalho e os resultados obtidos estão relacionados com:

- reações de oxidação ou redução que ocorrem na sua superfície, uma vez que a propriedade medida é o fluxo de elétrons entre a espécie eletroativa e a superfície do eletrodo, que estará sujeita a um determinado potencial fixo ou variável [5];

- a alteração da intensidade de corrente capacitiva ou mobilidade de cargas à superfície do eletrodo;
- a alteração da resistência do camada sensora utilizada.

Devido à elevada sensibilidade que apresenta, à sua seletividade e à possibilidade de efetuar análises rápidas e precisas, este tipo de transdução deu um grande impulso ao desenvolvimento de novos biossensores.

### **2.3.1.1 Tipos de sensores eletroquímicos**

Os sensores eletroquímicos podem ser classificados tendo em conta as características do sinal obtido a partir do transdutor. Cada tipo de sensor eletroquímico está relacionado com diferentes técnicas eletroquímicas. De acordo com o tipo de sinal, que pode ser intensidade de corrente, diferença de potencial ou alterações de impedância/condutância, estes sensores podem ser classificados em três grupos distintos: amperométricos, potenciométricos e impedimétricos, descritos brevemente de seguida: [5, 18, 110, 111]

- Potenciométricos – o sinal obtido a partir do transdutor é uma diferença de potencial. Esta diferença de potencial corresponde à medição do potencial de equilíbrio do eletrodo de trabalho relativamente ao potencial de um eletrodo de referência. Utiliza-se um voltímetro de elevada impedância, ou seja, a experiência ocorre em condições de passagem de corrente nula.
- Amperométricos – o sinal obtido a partir do transdutor é uma intensidade de corrente. A intensidade de corrente pode ser medida em função do tempo ou em função de um potencial aplicado variável no tempo (voltametria).
- Impedimétricos – o sinal obtido a partir do transdutor é apresentado sob a forma de impedância ou condutância. Este tipo de sensor não é seletivo para várias espécies presentes em solução, mas permite determinar a concentração

total das espécies iónicas, bem como a mobilidade de cargas à superfície do eléctrodo.

Ao longo do trabalho desenvolvido durante este projeto foram utilizadas diversas técnicas eletroquímicas como elementos de transdução dos sensores em estudo. Foram usadas três técnicas amperométricas distintas, e uma técnica impedimétrica: voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica, respetivamente.

Nas próximas secções serão descritos, resumidamente, os princípios de funcionamento básico de cada uma delas.

#### **2.3.1.1.1 Amperometria**

Em amperometria mede-se a intensidade de corrente que flui entre dois eléctrodos devido a uma reacção eletrolítica. Uma das espécies envolvidas pode ser o analito em estudo, que muda o seu estado de oxidação e o fluxo eletrónico gerado, cria uma corrente eléctrica que pode ser monitorizada e é proporcional à quantidade de espécies eletroquimicamente transformadas à superfície do eléctrodo. [18]

O sinal obtido pelo transdutor é apresentado sob a forma de intensidade de corrente e pode ser medido em função do potencial aplicado (voltametria) ou em função do tempo (cronoamperometria). Várias espécies podem ser detetadas simultaneamente numa mesma solução, se reagirem à superfície do eléctrodo a potenciais distintos. [16, 112]

##### **2.3.1.1.1.1 Voltametria**

No conjunto das técnicas amperométricas, a voltametria engloba os ensaios que envolvem a perturbação de um sistema por aplicação de uma diferença de

potencial que varia ao longo do tempo, medindo-se a intensidade de corrente resultante.

O potencial do eletrodo de trabalho é controlado em relação ao potencial de um eletrodo de referência cujo potencial, idealmente, se mantém inalterado ao longo da experiência [113]. Para melhorar o controle do potencial do eletrodo de trabalho, é usual utilizar um sistema com três eletrodos em que o controle do potencial aplicado e da medição da intensidade de corrente são separados, de forma a melhorar o controle do potencial do eletrodo de trabalho e minimizar o efeito da queda ôhmica.

A voltametria chegou a ser uma ferramenta importante para a determinação de iões inorgânicos e de certas espécies orgânicas em solução aquosa, todavia no final dos anos 50, com a emergência dos métodos espectroscópicos, a voltametria passou a ser um método de análise menos importante. Em meados dos anos 60, com a incorporação de várias modificações que permitiram um aumento significativo da sensibilidade e seletividade do método as técnicas voltamétricas ressurgiram e a sua aplicação estendeu-se à determinação de muitas espécies, particularmente de interesse farmacológico, ambiental e biológico. A voltametria moderna continua a ser uma ferramenta potente usada no estudo de processos de oxidação e redução, assim como em processos de adsorção [110].

As diferentes técnicas voltamétricas distinguem-se pelo tipo de sinal de excitação de potencial que são aplicados ao sistema. Esse sinal origina uma resposta de corrente característica. Estes sinais podem ter uma variação linear no tempo, como na voltametria cíclica, ou de impulso, como na voltametria de onda quadrada.

A escolha da técnica mais apropriada está relacionada com o tipo de informação qualitativa ou quantitativa que se pretende obter sobre o analito ou sobre o processo de interação deste com a superfície do eletrodo. Ao longo deste trabalho foram usados dois métodos voltamétricos diferentes, a voltametria cíclica e a voltametria de onda quadrada que serão resumidamente abordados.[16, 18]

### 2.3.1.1.1.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é muito usada na obtenção de informação qualitativa sobre as reações eletroquímicas. A técnica permite obter de forma rápida informação termodinâmica acerca do processo redox, a cinética das reações de transferência eletrônica, de reações químicas ou de processos de adsorção. Esta ferramenta permite avaliar a influência da composição do meio no processo redox. [18]

Na voltametria cíclica é aplicada uma rampa de potenciais que varia linearmente com o tempo. Na voltametria cíclica a rampa é triangular e o ponto de início do varrimento de potencial é escolhido de acordo com as características do estudo podendo ser um dos limites de potencial usado ou um ponto intermédio. Na Figura 2.10. é possível observar uma representação esquemática do potencial aplicado ao elétrodo de trabalho, em função do tempo, em voltametria cíclica (A), bem como observar a representação da resposta de intensidade de corrente em função do potencial aplicado (B) – típica para um processo redox reversível. Esta representação designa-se voltamograma cíclico.

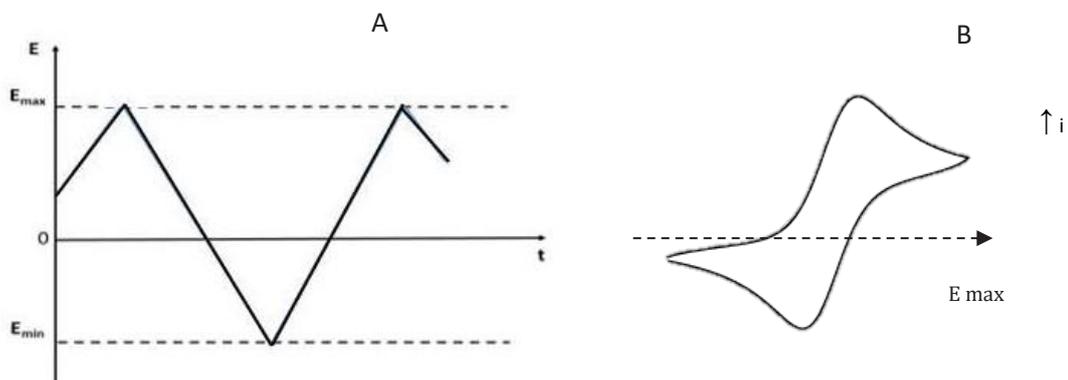


Figura 2.10. – A) Representação esquemática da variação de potencial aplicado ao elétrodo de trabalho ao longo do tempo na voltametria cíclica. B) Resposta de intensidade de corrente em função do potencial aplicado, voltamograma cíclico obtido.

Um voltamograma cíclico tradicional apresenta um pico catódico a potenciais mais negativos, devido à redução do analito, e um pico anódico a potenciais mais

positivos, onde a espécie formada na redução catódica pode ser oxidada segundo a reação inversa.

Quando estamos perante um sistema reversível, o pico anódico formado pela oxidação das espécies reduzidas, formadas no ciclo catódico, deverá apresentar uma intensidade de corrente igual em valor absoluto à do pico catódico. [18]

$$\frac{i_{pa}}{-i_{pc}} = 1 \quad (\text{Equação 2.1})$$

Esta técnica foi usada neste trabalho para estudar a performance da superfície dos elétrodos modificados com polímeros condutores e nanopartículas e em todos os processos de limpeza dos elétrodos.

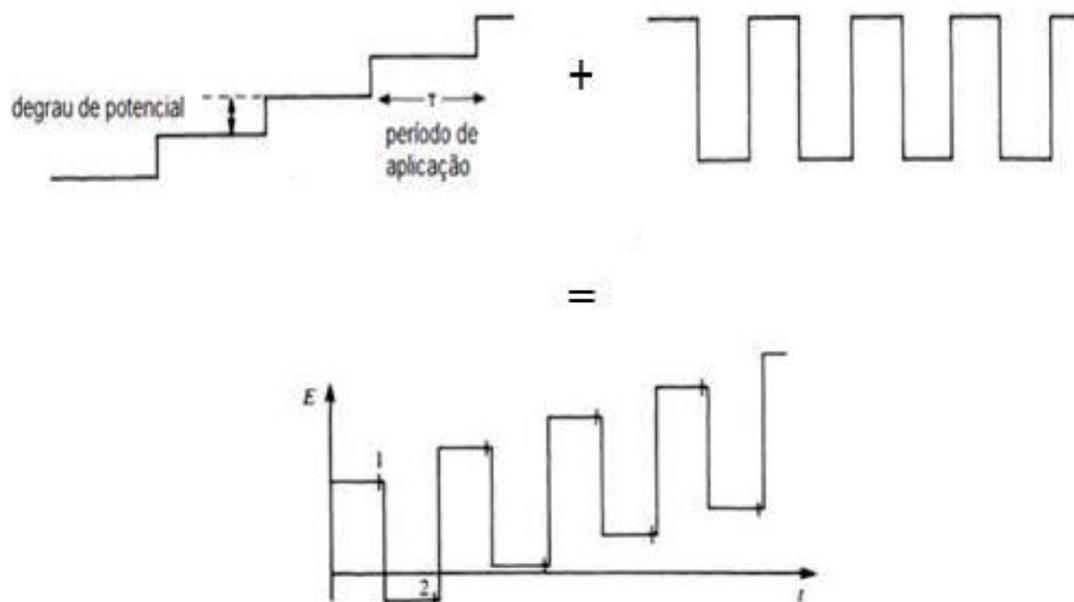
Para além da corrente faradaica, devida à redução ou oxidação do analito – aquela que normalmente interessa –, terão, também, de ser tidas em consideração as contribuições da corrente residual, devido à presença de alguma impureza no eléctrodo de trabalho e da corrente capacitiva, devido à carga da dupla camada na interface eléctrodo/solução por aplicação de um determinado potencial. O limite de deteção da técnica está associado à intensidade da corrente capacitiva, enquanto a corrente máxima pode ser associada à concentração do analito em estudo. Na situação mais habitual, a velocidade da reação é limitada pela difusão da espécie eletroativa em solução.

Em casos extremos de baixas concentrações do analito em estudo, em que a intensidade de corrente faradaica baixe para valores próximos dos da intensidade de corrente capacitiva, a voltametria cíclica descrita anteriormente torna-se pouco útil como ferramenta de quantificação. Foi desta forma que surgiram novas técnicas voltamétricas que aplicam impulsos de potencial, como a voltametria de onda quadrada, também utilizada neste trabalho.

### 2.3.1.1.1.2 Voltametria de onda quadrada

O uso de técnicas voltamétricas na análise de moléculas biológicas está relacionado com a necessidade de obtenção de um método mais sensível e, desta forma, a escolha da voltametria de onda quadrada surge como uma boa opção, uma vez que apresenta uma das sensibilidades mais elevadas aliadas à rapidez de resposta, entre as diversas técnicas eletroquímicas. Para além da elevada sensibilidade do método, a análise dos parâmetros obtidos também permite a avaliação do mecanismo e da cinética do processo em estudo. [114] Nas técnicas voltamétricas de impulso são aplicados impulsos de potencial ao sistema e a intensidade de corrente obtida é medida em intervalos de tempo determinados.

Na voltametria de onda quadrada, o sinal de excitação é obtido através da sobreposição de impulsos quadrados sequenciais com um sinal em forma de escada, dando origem à curva potencial-tempo representada na Figura 2.11 e a corrente é medida duas vezes em cada um destes ciclos, no fim do impulso direto e no fim do impulso reverso (indicados na imagem com os algarismos 1 e 2)



**Figura 2.11 – Sinal de excitação aplicado para voltametria de onda quadrada, em função do tempo, o ponto 1 e 2 correspondem ao momento de aplicação do impulso de potencial em que a intensidade de corrente é medida e  $T$  ao período do pulso.**

O objetivo destes métodos é medir a intensidade de corrente no momento em que a diferença entre a intensidade de corrente faradáica devida às reações de oxidação-redução e a intensidade de corrente capacitiva, provocada pela acumulação de cargas à superfície do eletrodo, é maior, o que permite reduzir o efeito da corrente capacitiva na sua medição. [16]

Nestes ensaios a intensidade de corrente é medida em dois momentos diferentes da aplicação do pulso de potencial, representados na Figura 2.10, e o resultado obtido num voltamograma de onda quadrada corresponde à intensidade de corrente resultante, tal como pode ser observado na Figura 2.12.

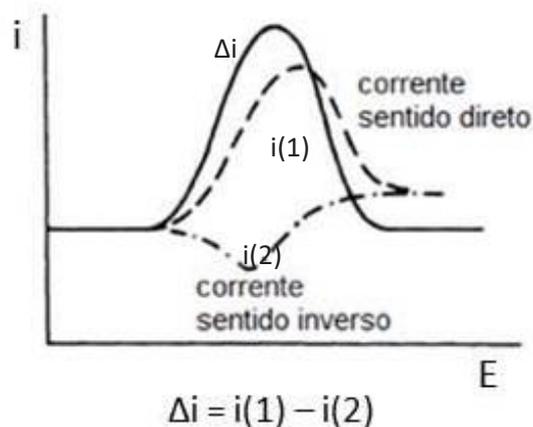


Figura 2.12 – Resposta de corrente obtida por aplicação de um potencial tal como o representado na Figura 2.11.

Quanto maior a reversibilidade da reação, maior a contribuição da corrente reversa e, conseqüentemente, maior o aumento da corrente resultante e maior a sensibilidade da medição.

Vários parâmetros experimentais podem ser manipulados na técnica de voltametria de onda quadrada, tais como amplitude dos saltos de potencial ou tempo de estabilização. No entanto, apenas dois deles – a frequência/período da onda quadrada e a amplitude do impulso – vão levar a alterações na intensidade da corrente de pico medida. O uso de baixos períodos de pulso, elevada frequência, permite aumentar a intensidade de corrente medida (existe uma relação linear entre a intensidade de pico e a raiz quadrada da frequência), possibilitando a medição de sinais em soluções mais diluídas e melhorando o

limite de deteção da voltametria de onda quadrada, quando comparada com outras técnicas voltamétricas. O aumento da amplitude do impulso, apesar de trazer uma melhoria na sensibilidade da técnica, alarga o pico de transferência, diminuindo a resolução obtida. [113, 115-117]

Esta técnica foi usada neste trabalho para construir curvas de calibração para a determinação da amílase, usando o biossensor construído por deposição de polímeros molecularmente impressos.

### 2.3.1.1.1.2 Cronoamperometria

Uma outra técnica de impulso que se engloba dentro das técnicas amperométricas é a cronoamperometria.

Esta técnica consiste na aplicação de um impulso de potencial e no registo da intensidade de corrente em função do tempo, originando um cronoamperograma. Este impulso corresponde, normalmente, ao potencial ao qual a resposta de corrente faradaica é limitada pelo transporte de massa.

Para descrever esta alteração de corrente, em função do tempo, por aplicação de um potencial fixo, Cottrell enunciou em 1903 a equação que representa este comportamento e que viria a ter o seu nome (Equação 2.3). Para um processo de oxidação/redução clássico, Cottrell mostrou que a intensidade de corrente está relacionada com a taxa de difusão do analito através da solução até à superfície do eléctrodo. Diz-se, portanto, que o processo faradaico é controlado por difusão.

Para um eléctrodo planar, a equação de Cottrell toma a seguinte forma:

$$I_f = \frac{nFAD^{1/2}c}{(\pi t)^{1/2}} \quad (\text{Equação 2.2})$$

Em que:

n é o número de eletrões envolvidos no processo redox;

F a constante de Faraday;

D o coeficiente de difusão da espécie em estudo;

c a concentração do analito;

t é o tempo.

Para além da contribuição faradaica, a intensidade de corrente medida vai também ser influenciada pela corrente capacitiva, que durante os primeiros instantes – em que a dupla camada é carregada – não pode ser negligenciada. A contribuição da corrente capacitiva pode ser determinada através da Equação 2.3 [16]

$$i_c = \frac{\Delta E}{R} \exp\left(\frac{-t}{RC}\right) \quad (\text{Equação 2.3})$$

Em que:

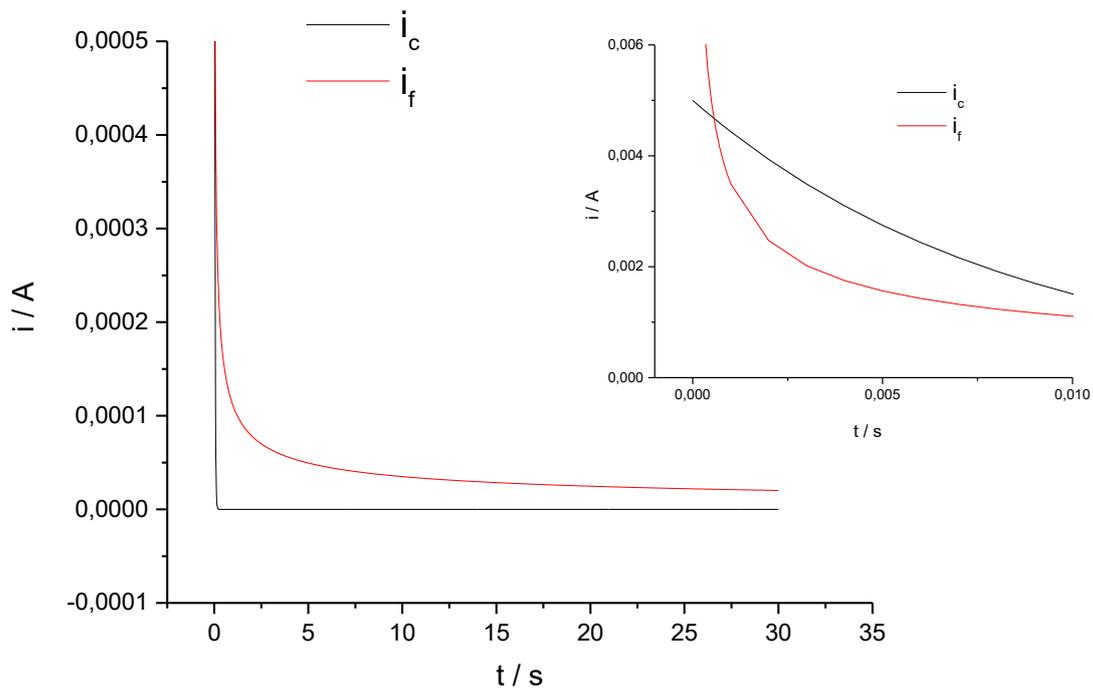
$\Delta E$  corresponde à variação de potencial aplicado;

R é a resistência da solução;

t é o tempo e;

C a capacidade da dupla camada.

Um cronoamperograma típico possui um pico inicial de corrente que corresponde à carga da dupla camada. Na Figura 2.13 é possível ver a evolução de corrente capacitiva e faradaica por aplicação de um impulso de potencial, em função do tempo. A imagem mostra o comportamento da corrente faradaica devida à difusão, estimada a partir da equação de Cottrell e a intensidade da corrente capacitiva, estimada por aplicação da equação 2.3, e devida à acumulação de carga na dupla camada. No gráfico principal é possível observar o comportamento para tempos mais longos e na inserção para tempos inferiores a 0,01 segundos. [18].



**Figura 2.13 – Evolução da corrente com o tempo ao aplicar um impulso de potencial a um eletrodo que desencadeia uma reação de oxidação-redução. Em que  $i_f$  corresponde à corrente faradaica e  $i_c$  à corrente capacitiva. [18]**

Foram utilizadas nesta representação gráfica valores de resistência de 100 ohm, uma capacidade de  $8,25 \times 10^{-5}$  F e um potencial de 0,5 V.

Esta técnica foi utilizada neste trabalho para depositar, à superfície do eletrodo, os filmes poliméricos molecularmente impressos usados na construção dos MIP e NIP para os estudos com os biossensores de glucose oxidase e de amilase.

### 2.3.1.1.2 Espectroscopia de Impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) permite obter uma informação detalhada dos processos que ocorrem na interface eletrodo/solução. É utilizada em variadas áreas que vão desde o estudo de processos de eletrodo até ao estudo do transporte eletrónico de dispositivos semicondutores e pode ser relacionada com os diferentes processos que ocorrem na célula eletroquímica.

A resistência elétrica do sistema é um conceito bem conhecido e estudado e que corresponde à capacidade desse sistema de resistir ao fluxo da corrente elétrica. A Lei de Ohm (Equação 2.4) define a resistência como sendo a razão entre a potencial (E) e a intensidade de corrente (I):

$$R = E/I \quad \text{(Equação 2.4)}$$

Esta equação é aplicada apenas em sistemas de corrente contínua e num circuito de um elemento, a resistência ideal, que apresenta uma série de propriedades, tais como: [110, 113]

- Obedece à lei de Ohm para toda a gama de intensidade de corrente e voltagem;
- É independente da frequência;
- A intensidade de corrente alterna e a voltagem estão em fase ao longo de todo o sistema.

No caso da espectroscopia de impedância eletroquímica, a medição da capacidade de um circuito para resistir ao fluxo eletrônico não está limitada pelas propriedades listadas acima. [118]

A EIS envolve a aplicação de uma perturbação sinusoidal que pode ser de potencial ou de corrente, medindo-se o sinal (intensidade de corrente ou potencial, respetivamente) resultante da perturbação, quando este se encontra no estado estacionário. A resposta obtida pode diferir do sinal da perturbação aplicada, tanto em fase como em amplitude.

Os resultados obtidos, para as modificações que ocorrem à superfície do eléctrodo, correspondem às propriedades capacitivas e resistivas dos materiais, às quais chamamos impedância.

A impedância é calculada através da razão entre o potencial (E) e a corrente (I), em que  $j$  é a componente imaginária e  $\omega$  a frequência angular (equação 2.5). [119]

$$Z(j\omega) = E(j\omega) / I(j\omega) \quad \text{(Equação 2.5)}$$

A partir das medições de impedância e da amplitude do ângulo de fase é possível avaliar processos como o transporte de carga, resistência do eletrólito,

condutividade de filmes, capacidade da dupla camada ou coeficientes de difusão. Para que a interpretação dos dados obtidos seja possível é necessário ajustar os resultados experimentais a um circuito elétrico equivalente. [120, 121] Num ensaio de impedância, o diagrama típico de Nyquist obtido inclui um semicírculo, na região de elevadas frequências devido ao comportamento controlado pela transferência de carga, seguido de uma linha reta, a baixas frequências devido aos processos de difusão [122].

Neste trabalho, o circuito equivalente de Randles foi usado para ajustar os dados experimentais. Neste sistema, o circuito elétrico equivalente representado na Figura 2.14, é constituído pela resistência da solução ( $R_s$ ), pela capacidade da dupla camada ( $C_{dl}$ ), pela resistência de transferência de carga ( $R_{ct}$ ) e pelo elemento de difusão de Warburg ( $W$ ) [5, 101].

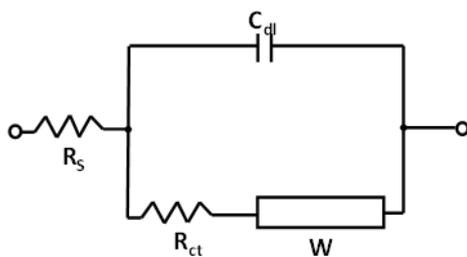


Figure 2.14. – Circuito elétrico equivalente de Randles.

A resistência de transferência de carga extraída do circuito equivalente de Randles está relacionada com a cinética de transferência eletrónica do sistema. Uma vez que os sistemas em estudo são interfaces eléctrodo/solução, o processo de imobilização que ocorre à superfície do eléctrodo vai ser responsável pelas variações apresentadas.[122]

Neste trabalho, as medições de impedância eletroquímica foram usadas para acompanhar a construção dos MIP à superfície do eléctrodo e para realizar o estudo analítico posterior.

## 2.4 Considerações Finais

Neste capítulo foi feita uma breve descrição dos diferentes conceitos teóricos e métodos experimentais utilizados no trabalho laboratorial que foi desenvolvido durante este projeto de doutoramento.

O elemento comum às três fases deste trabalho é a modificação de superfícies para o desenvolvimento e construção de biossensores eletroquímicos. Foi apresentada uma descrição da importância dos biossensores nas mais variadas áreas e as mais-valias que a modificação da sua superfície poderia acrescentar ao seu desempenho.

Em três subcapítulos, foram descritos os diferentes elementos de reconhecimento usados neste trabalho para o *design* de novos biossensores.

Finalmente foi abordada e explicada, de forma resumida, a transdução eletroquímica, comum a todas as fases do trabalho.

Nos próximos capítulos serão apresentados os métodos experimentais usados em cada uma das fases do trabalho, bem como os resultados obtidos que serão discutidos em detalhe.

## 2.5 Bibliografia

1. Stetter, J.R., W.R. Penrose, and S. Yao, *Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS*. Journal of The Electrochemical Society, 2003. **150**(2): p. S11-S16.
2. Lowe, C.R., *Biosensors*. Trends in Biotechnology, 1984. **2**(3): p. 59-65.
3. Clark, L.C. and C. Lyons, *ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1962. **102**(1): p. 29-45.
4. Mascini, M., *A Brief Story of Biosensor Tecnology*, in *Biotechnological Applications of Photosynthetic Proteins: Biochips, Biosensors and Biodevice*, M.T.G.a.E.V. Piletska, Editor. 2006, Springer. p. 280.
5. Mousty, C., *Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes—new trends*. Applied Clay Science, 2004. **27**(3–4): p. 159-177.
6. Kirsch, J., et al., *Biosensor technology: recent advances in threat agent detection and medicine*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(22): p. 8733-8768.
7. Gs, S., A. Cv, and B.B. Mathew, *Biosensors: A Modern Day Achievement*. Journal of Instrumentation Technology, 2014. **2**(1): p. 26-39.
8. Turner, A.P.F., *Biosensors: sense and sensibility*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(8): p. 3184-3196.
9. Fernandes, P.M.d.V., *Nanopartículas para Sensores*, in *Departamento de Química*. 2009, FCUP: Porto.
10. Rathee, K., et al., *Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review*. Biochemistry and Biophysics Reports, 2016. **5**: p. 35-54.
11. Lan, J., et al., *Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles*. Analytica Chimica Acta, 2014. **825**(0): p. 63-68.

12. Pundir, C.S., et al., *Immobilization of Arthrobacter sarcosine oxidase onto alkylamine and arylamine glass and its application in serum sarcosine determination*. 2011. p. 219-223.
13. Jans, H., et al., *A simple double-bead sandwich assay for protein detection in serum using UV-vis spectroscopy*. *Talanta*, 2011. **83**(5): p. 1580-1585.
14. Lai, S.V.H., P. Kao, and S. Tadigadapa, *Thermal biosensors from micromachined bulk acoustic wave resonators*. *Procedia Engineering*, 2011. **25**(Supplement C): p. 1381-1384.
15. Su, L., et al., *Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **46**(0): p. 155-161.
16. Bard, F., *Electrochemical Methods - Fundamentals and Applications*. Vol. 4. 2001, USA: John Wiley & Sons, Inc. 263-276.
17. Rebelo, T.S.C.R., et al., *Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **850**(0): p. 26-32.
18. Brett, A.M.O. and C.M.A. Brett, *Electroquímica - Princípios e Aplicações*. 1996, Almedina: Coimbra.
19. Kumar, S.A. and S.-M. Chen, *Electrocatalytic reduction of oxygen and hydrogen peroxide at poly(p-aminobenzene sulfonic acid)-modified glassy carbon electrodes*. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2007. **278**(1-2): p. 244-250.
20. Baldwin, R.P. and K.N. Thomsen, *Chemically modified electrodes in liquid chromatography detection: A review*. *Talanta*, 1991. **38**(1): p. 1-16.
21. Wu, Y., et al., *Self-assembled dipeptide-graphene nanostructures onto an electrode surface for highly sensitive amperometric hydrogen peroxide biosensors*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **244**: p. 1022-1030.
22. Polyakov, M.S., et al., *Effect of covalent and non-covalent linking of zinc(II) phthalocyanine functionalised carbon nanomaterials on the sensor response to ammonia*. *Synthetic Metals*, 2017. **227**: p. 78-86.

23. De Filipo, G., et al., *Non-covalent functionalisation of single wall carbon nanotubes for efficient dye-sensitised solar cells*. Journal of Power Sources, 2015. **274**: p. 274-279.
24. Dagar, K. and C.S. Pundir, *An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode*. Enzyme and Microbial Technology, 2017. **96**: p. 177-186.
25. Ghasemi, E., E. Shams, and N. Farzin Nejad, *Covalent modification of ordered mesoporous carbon with glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2015. **752**: p. 60-67.
26. Wang, X., et al., *Sulfur covalently bonded graphene with large capacity and high rate for high-performance sodium-ion batteries anodes*. Nano Energy, 2015. **15**: p. 746-754.
27. Shirakawa, H. and S. Ikeda, *Infrared Spectra of Poly(acetylene)*. Polym J, 1971. **2**(2): p. 231-244.
28. Shirakawa, H., et al., *Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1977(16): p. 578-580.
29. Maia, D., M. Paoli, and O. Alves, *CONDUCTIVE POLYMER SYNTHESIS IN SOLID HOST MATRICES*. 2000: Química Nova. p. 204-215.
30. Balint, R., N.J. Cassidy, and S.H. Cartmell, *Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering*. Acta Biomaterialia, 2014. **10**(6): p. 2341-2353.
31. Buron, C.C., et al., *Elaboration and characterization of polyaniline films electrodeposited on tin oxides*. Synthetic Metals, 2011. **161**(19–20): p. 2162-2169.
32. Naveen, M.H., N.G. Gurudatt, and Y.-B. Shim, *Applications of conducting polymer composites to electrochemical sensors: A review*. Applied Materials Today, 2017. **9**(Supplement C): p. 419-433.

33. Zarras, P., et al., *Progress in using conductive polymers as corrosion-inhibiting coatings*. Radiation Physics and Chemistry, 2003. **68**(3–4): p. 387-394.
34. Zhao, D., et al., *Highly conductive polythiophene films doped with chloroauric acid for dual-mode sensing of volatile organic amines and thiols*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017. **243**: p. 380-387.
35. Paosawatyanong, B., et al., *Doping of polythiophene by microwave plasma deposition*. Surface and Coatings Technology, 2010. **204**(18–19): p. 3053-3058.
36. Shanmugapriya, C. and G. Velraj, *Investigation on structural and electrical properties of FeCl<sub>3</sub> doped polythiophene (PT) blended with micro and nano copper particles by mechanical mixing*. Optik - International Journal for Light and Electron Optics, 2016. **127**(20): p. 8940-8950.
37. Park, S.Y., M.S. Cho, and H.J. Choi, *Synthesis and electrical characteristics of polyaniline nanoparticles and their polymeric composite*. Current Applied Physics, 2004. **4**(6): p. 581-583.
38. Epstein, A.J., et al., *Insulator-to-metal transition in polyaniline: Effect of protonation in emeraldine*. Synthetic Metals, 1987. **21**(1): p. 63-70.
39. Lai, J., et al., *Polyaniline-based glucose biosensor: A review*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2016. **782**: p. 138-153.
40. Mehl, H., *Nanocompósitos Formados por Nanotubos de Carbono, Nanopartículas de Prata e Polianilina: Síntese e Caracterização*. 2011: Curitiba.
41. Macdiarmid, A.G., et al., *Proceedings of the International Conference of Science and Technology of Synthetic Metals Polyaniline: a new concept in conducting polymers*. Synthetic Metals, 1987. **18**(1): p. 285-290.
42. Gospodinova, N. and L. Terlemezyan, *Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline*. Progress in Polymer Science, 1998. **23**(8): p. 1443-1484.
43. Geniès, E.M., M. Lapkowski, and J.F. Penneau, *Cyclic voltammetry of polyaniline: interpretation of the middle peak*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1988. **249**(1): p. 97-107.

44. Feast, W.J., et al., *Synthesis, processing and material properties of conjugated polymers*. Polymer, 1996. **37**(22): p. 5017-5047.
45. Huang, W.-S., A.G. MacDiarmid, and A.J. Epstein, *Polyaniline: non-oxidative doping of the emeraldine base form to the metallic regime*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1987(23): p. 1784-1786.
46. Ameen, S., M.S. Akhtar, and H.S. Shin, *Nanocages-augmented aligned polyaniline nanowires as unique platform for electrochemical non-enzymatic glucose biosensor*. Applied Catalysis A: General, 2016. **517**(Supplement C): p. 21-29.
47. Wu, S., et al., *Development of glucose biosensors based on plasma polymerization-assisted nanocomposites of polyaniline, tin oxide, and three-dimensional reduced graphene oxide*. Applied Surface Science, 2017. **401**: p. 262-270.
48. Chirea, M.P., E. Pereira, C. M. Silva, F., *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2011. **1**: p. 119-126.
49. Nguyen, D.T., et al., *Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of HAuCl<sub>4</sub>*. Advanced Powder Technology, 2010. **21**(2): p. 111-118.
50. Leng, W., P. Pati, and P. Vikesland, *Room temperature seed mediated growth of gold nanoparticles: mechanistic investigations and life cycle assesment †*. Vol. 2. 2015.
51. Tyagi, H., et al., *A Facile pH Controlled Citrate-Based Reduction Method for Gold Nanoparticle Synthesis at Room Temperature*. Nanoscale Res Lett, 2016. **11**(1): p. 362.
52. Mena, M.L., P. Yáñez-Sedeño, and J.M. Pingarrón, *A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes*. Analytical Biochemistry, 2005. **336**(1): p. 20-27.
53. Wang, Z., et al., *Self-Assembly of Magnetite Nanocrystals with Amphiphilic Polyethylenimine: Structures and Applications in Magnetic Resonance*

- Imaging*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2009. **9**(1): p. 378-385.
54. van Landeghem, F.K.H., et al., *Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles*. Biomaterials, 2009. **30**(1): p. 52-57.
55. Thierry, B., et al., *Multifunctional core-shell magnetic cisplatin nanocarriers*. Chemical Communications, 2009(47): p. 7348-7350.
56. Ramakrishna, S., et al., *Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*. Composites Science and Technology, 2001. **61**(9): p. 1189-1224.
57. Schmitt, L., et al., *Correlation of Ultrastructure with Mechanical Properties of Nano-Hybrid Dental Composites*. Advanced Engineering Materials, 2009. **11**(10): p. B137-B143.
58. Anandan, S. and R. Sivakumar, *Effect of loaded TiO<sub>2</sub> nanofiller on heteropolyacid-impregnated PVDF polymer electrolyte for the performance of dye-sensitized solar cells*. physica status solidi (a), 2009. **206**(2): p. 343-350.
59. Ahn, J.H., et al., *Nanoparticle-dispersed PEO polymer electrolytes for Li batteries*. Journal of Power Sources, 2003. **119-121**(0): p. 422-426.
60. Bruce, P.G., B. Scrosati, and J.-M. Tarascon, *Nanomaterials for Rechargeable Lithium Batteries*. Angewandte Chemie International Edition, 2008. **47**(16): p. 2930-2946.
61. Rinaldo, S.G., J. Stumper, and M. Eikerling, *Physical Theory of Platinum Nanoparticle Dissolution in Polymer Electrolyte Fuel Cells*. The Journal of Physical Chemistry C, 2010. **114**(13): p. 5773-5785.
62. Fu, L.J., et al., *Novel TiO<sub>2</sub>/C nanocomposites for anode materials of lithium ion batteries*. Journal of Power Sources, 2006. **159**(1): p. 219-222.
63. Bronstein, L.A., M.Valetsky, P., *Metal colloids in block copolymer micelles: Formation and materials properties*, in *Nanoparticles and Nanostructured Films: preparation, Characterization and Applications*, J.H. Fendler, Editor. 1998, Wiley-VCH: Weinheim, Germany.

64. Gao, B., et al., *Preparation and electrochemical properties of polyaniline doped with benzenesulfonic functionalized multi-walled carbon nanotubes*. *Electrochimica Acta*, 2010. **55**(7): p. 2311-2318.
65. Ding, L., et al., *Modification of glassy carbon electrode with polyaniline/multi-walled carbon nanotubes composite: Application to electro-reduction of bromate*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012. **668**(0): p. 44-50.
66. Spain, E., et al., *High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. **26**(5): p. 2613-2618.
67. Zou, L., et al., *Gold nanoparticles/polyaniline Langmuir–Blodgett Film modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for detection of epinephrine and uric acid*. *Talanta*, 2013. **117**(0): p. 333-337.
68. Ispas, C.R., G. Crivat, and S. Andreescu, *Review: Recent Developments in Enzyme-Based Biosensors for Biomedical Analysis*. *Analytical Letters*, 2012. **45**(2-3): p. 168-186.
69. Kotanen, C.N., et al., *Implantable enzyme amperometric biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012. **35**(1): p. 14-26.
70. Fang, Y., Y. Umasankar, and R.P. Ramasamy, *A novel bi-enzyme electrochemical biosensor for selective and sensitive determination of methyl salicylate*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016. **81**: p. 39-45.
71. Barsan, M.M., et al., *New CNT/poly(brilliant green) and CNT/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) based electrochemical enzyme biosensors*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **927**: p. 35-45.
72. Soldatkin, O.O., et al., *Conductometric enzyme biosensor for patulin determination*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **239**: p. 1010-1015.
73. Wasik, D., A. Mulchandani, and M.V. Yates, *A heparin-functionalized carbon nanotube-based affinity biosensor for dengue virus*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017. **91**: p. 811-816.

74. Sassolas, A., L.J. Blum, and B.D. Leca-Bouvier, *Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors*. *Biotechnology Advances*, 2012. **30**(3): p. 489-511.
75. Andreescu, S. and J.-L. Marty, *Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications*. *Biomolecular Engineering*, 2006. **23**(1): p. 1-15.
76. Arya, S.K., M. Datta, and B.D. Malhotra, *Recent advances in cholesterol biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008. **23**(7): p. 1083-1100.
77. Choi, M.M.F., *Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers*. *Microchimica Acta*, 2004. **148**(3): p. 107-132.
78. Singhal, R., et al., *Langmuir–Blodgett films of poly(3-dodecyl thiophene) for application to glucose biosensor*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2002. **86**(1): p. 42-48.
79. Bankar, S.B., et al., *Glucose oxidase — An overview*. *Biotechnology Advances*, 2009. **27**(4): p. 489-501.
80. Shaolin, M. and X. Huaiguo, *Bioelectrochemical characteristics of glucose oxidase immobilized in a polyaniline film*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1996. **31**(3): p. 155-160.
81. German, N., et al., *Glucose biosensor based on graphite electrodes modified with glucose oxidase and colloidal gold nanoparticles*. *Microchimica Acta*, 2010. **168**(3-4): p. 221-229.
82. Kausaite-Minkstiniene, A., et al., *Enzymatically synthesized polyaniline layer for extension of linear detection region of amperometric glucose biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. **26**(2): p. 790-797.
83. Burmeister, J.J. and G.A. Gerhardt, *Self-Referencing Ceramic-Based Multisite Microelectrodes for the Detection and Elimination of Interferences from the Measurement of L-Glutamate and Other Analytes*. *Analytical Chemistry*, 2001. **73**(5): p. 1037-1042.
84. Wilson, G.S. and Y. Hu, *Enzyme-Based Biosensors for in Vivo Measurements*. *Chemical Reviews*, 2000. **100**(7): p. 2693-2704.
85. Chaubey, A. and B.D. Malhotra, *Mediated biosensors*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002. **17**(6–7): p. 441-456.

86. Kulys, J.J. and N.K. Čénas, *Oxidation of glucose oxidase from *Penicillium vitale* by one- and two-electron acceptors*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1983. **744**(1): p. 57-63.
87. Ikeda, T., T. Shibata, and M. Senda, *Amperometric enzyme electrode for maltose based on an oligosaccharide dehydrogenase-modified carbon paste electrode containing p-benzoquinone*. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1989. **261**(2, Part 2): p. 351-362.
88. Rebelo, T.S.C.R., et al., *Novel Prostate Specific Antigen plastic antibody designed with charged binding sites for an improved protein binding and its application in a biosensor of potentiometric transduction*. *Electrochimica Acta*, 2014. **132**: p. 142-150.
89. Haupt, K. and K. Mosbach, *Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors*. *Chemical Reviews*, 2000. **100**(7): p. 2495-2504.
90. Vasapollo, G., et al., *Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011. **12**(9).
91. Turner, N.W., et al., *From 3D to 2D: A Review of the Molecular Imprinting of Proteins*. *Biotechnology progress*, 2006. **22**(6): p. 1474-1489.
92. Moreira, F.T.C., et al., *Smart plastic antibody material (SPAM) tailored on disposable screen printed electrodes for protein recognition: Application to myoglobin detection*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. **45**: p. 237-244.
93. Hansen, D.E., *Recent developments in the molecular imprinting of proteins*. *Biomaterials*, 2007. **28**(29): p. 4178-4191.
94. Whitcombe, M.J., et al., *The rational development of molecularly imprinted polymer-based sensors for protein detection*. *Chemical Society Reviews*, 2011. **40**(3): p. 1547-1571.
95. Kobayashi, M., *Graft Polymerization from Surface*, in *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, S. Kobayashi and K. Müllen, Editors. 2021, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-9.

96. Karimian, N., A.P.F. Turner, and A. Tiwari, *Electrochemical evaluation of troponin T imprinted polymer receptor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 160-165.
97. Sharma, P.S., et al., *Electrochemically synthesized polymers in molecular imprinting for chemical sensing*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **402**(10): p. 3177-3204.
98. Ramanaviciene, A. and A. Ramanavicius, *Molecularly imprinted polypyrrole-based synthetic receptor for direct detection of bovine leukemia virus glycoproteins*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004. **20**(6): p. 1076-1082.
99. Kan, X., et al., *Molecularly imprinted polymers based electrochemical sensor for bovine hemoglobin recognition*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012. **168**: p. 395-401.
100. Reddy, S.M., G. Sette, and Q. Phan, *Electrochemical probing of selective haemoglobin binding in hydrogel-based molecularly imprinted polymers*. *Electrochimica Acta*, 2011. **56**(25): p. 9203-9208.
101. Moreira, F.T.C., et al., *Protein-responsive polymers for point-of-care detection of cardiac biomarker*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **196**(0): p. 123-132.
102. Ren, W., H.Q. Luo, and N.B. Li, *Electrochemical Behavior of Epinephrine at a Glassy Carbon Electrode Modified by Electrodeposited Films of Caffeic Acid*. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2006. **6**(2): p. 80-89.
103. Horemans, F., et al., *MIP-based sensor platforms for the detection of histamine in the nano- and micromolar range in aqueous media*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010. **148**(2): p. 392-398.
104. Nakamura, Y., et al., *Preparation of molecularly imprinted polymers for warfarin and coumachlor by multi-step swelling and polymerization method and their imprinting effects*. *Journal of Chromatography A*, 2017. **1516**: p. 71-78.
105. Erdőssy, J., et al., *Electrosynthesized molecularly imprinted polymers for protein recognition*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016. **79**(Supplement C): p. 179-190.

106. Bossi, A., et al., *Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: The state of the art*. Biosensors and Bioelectronics, 2007. **22**(6): p. 1131-1137.
107. Bueno, L., et al., *MIP-based electrochemical protein profiling*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **204**(0): p. 88-95.
108. Sontimuang, C., R. Suedee, and F. Dickert, *Interdigitated capacitive biosensor based on molecularly imprinted polymer for rapid detection of Hev b1 latex allergen*. Analytical Biochemistry, 2011. **410**(2): p. 224-233.
109. Viswanathan, S., et al., *Molecular imprinted nanoelectrodes for ultra sensitive detection of ovarian cancer marker*. Biosensors and Bioelectronics, 2012. **33**(1): p. 179-183.
110. Skoog, et al., *Fundamentos de Química Analítica*. 2007, São Paulo: Thomson.
111. Samec, Z., E. Samcová, and H.H. Girault, *Ion amperometry at the interface between two immiscible electrolyte solutions in view of realizing the amperometric ion-selective electrode*. Talanta, 2004. **63**(1): p. 21-32.
112. Belluzo, S.M., E.M. Ribone, and M.C. Lagier, *Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics*. Sensors, 2008. **8**(3).
113. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. seventh edition ed. 2007, New York: Freeman.
114. Rebelo, T., *Improving the early diagnostic of prostate cancer by multiple biomarker detection with new biosensing devices in Faculdade de Ciências*. 2015: Porto.
115. Aoki, K., K. Maeda, and J. Osteryoung, *Characterization of Nernstian square-wave voltammograms*. Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1989. **272**(1): p. 17-28.
116. Pereira, C., *Desenvolvimento de sensores voltamétricos com base em microinterfaces líquido-líquido suportadas em membranas.*, in *Departamento de Química*. 1997, Universidade do Porto: Porto.
117. Souza, D.d., S.A.S. Machado, and L.A. Avaca, *Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos*. Química Nova, 2003. **26**: p. 81-89.

118. Moreira, F., *Fast screening for diagnostic of heart ischemic episodes*. 2013.
119. Randviir, E.P. and C.E. Banks, *Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications*. *Analytical Methods*, 2013. **5**(5): p. 1098-1115.
120. Ates, M., *Review study of electrochemical impedance spectroscopy and equivalent electrical circuits of conducting polymers on carbon surfaces*. *Progress in Organic Coatings*, 2011. **71**(1): p. 1-10.
121. Panagopoulou, M.A., et al., *Impedimetric Biosensor for the Assessment of the Clotting Activity of Rennet*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(20): p. 8629-8636.
122. Moreira, F.T.C., et al., *Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection*. *Electrochimica Acta*, 2013. **107**(0): p. 481-487.

### **3. Síntese de materiais compósitos**

### 3.1 Método de preparação dos materiais compósitos

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na preparação de um polímero condutor – a polianilina – na síntese de nanopartículas de ouro e na modificação de elétrodos de carbono com estes materiais compósitos.

#### 3.1.1 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese dos materiais compósitos:

Anilina, Sigma-Aldrich 99,5%

Ácido tetracloroáurico, Merck

Ácido clorídrico, Sigma-Aldrich 37%

Ácido sulfúrico, Merck 25%

Borohidreto de sódio, Fluka, 96%

Citrato de amónio, Sigma-Aldrich

Peroxidissulfato de amónio, Merck

A água foi desionizada usando um sistema Millipore (MilliQ System) até uma resistividade de 18 MOhm.cm.

#### 3.1.2 Síntese da Polianilina (PANI)

Prepararam-se duas soluções (a seguir designadas por A e B). Para preparar a solução A adicionaram-se 0,333 mL de anilina a 20 mL de uma solução HCl a 1 mol/L (9,6 mL de HCl para preparar 100 mL). Para preparar a solução B adicionaram-se 3,65 g ( $1,6 \times 10^{-2}$  mol) de peroxidissulfato de amónio a 13,3 mL da solução HCl 1 mol/L. À solução A em agitação e à temperatura ambiente, foi adicionada lentamente a solução B. Manteve-se a mistura reacional em agitação

por 40 min. A solução obtida foi filtrada a vácuo para obter a polianilina, o material obtido foi lavado com uma solução HCl 0,1 mol/L. (Esta síntese foi adaptada da descrita no trabalho de Travain et al. [1])

A síntese da polianilina foi efetuada regularmente para efetuar os diferentes estudos descritos neste trabalho. É sintetizada em meio ácido, sendo obtida na sua forma condutora de sal de esmeraldina, com cor verde.

### 3.1.3 Síntese de nanopartículas de Ouro (AuNPs)

Foi adicionado 1 mL de ácido tetracloroaurico  $5 \times 10^{-3}$  mol/L a 18 mL de água ultrapura em agitação. A esta solução foi adicionado 1 mL de citrato de sódio 38,8 mmol/L. De seguida foi adicionado, gota a gota e sob agitação forte, 10 mL de borohidreto de sódio 0,01 mol/L preparado recentemente. A mistura foi agitada por 30 min adicionais. (Esta síntese foi adaptada de Chirea et al. [2])

Seguindo o procedimento descrito anteriormente, as AuNPs foram sintetizadas em meio citrato e a solução obtida apresentava uma coloração arroxeada.

No sentido de determinar o tamanho e forma das AuNPs (sintetizadas em citrato e em PANI) foram realizadas, no MicroLab – Laboratório de Microscopia Eletrónica, medições de Microscopia Eletrónica de Transmissão (TEM), com um microscópio Tecnai G2, operando com uma energia de feixe de 120 keV e uma resolução pontual de 0,5 nm.

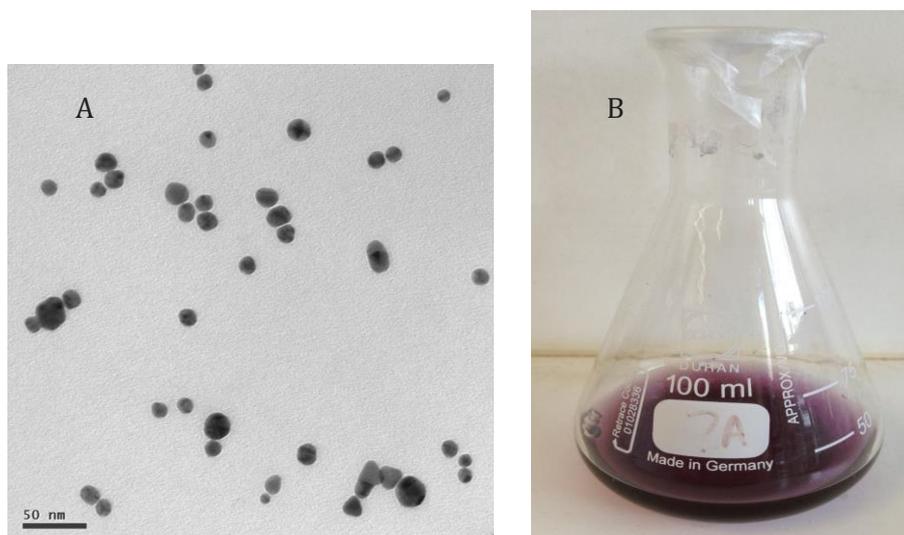


Figura 3.1. – a) Imagens TEM de AuNPs (citrato). b) coloração obtida na síntese.

Na Figura 3.1 é possível observar as imagens de TEM (a) e da solução obtida (b) na síntese das nanopartículas de ouro na presença de anião citrato.

A partir da imagem de TEM foi estimado o diâmetro médio das NPs sintetizadas com citrato. Para obter a distribuição de tamanho, algumas dezenas de NPs foram contadas usando software *Image J*. A partir deste método verificou-se que foram produzidas NPs de tamanhos médios de 9,3 +/- 0,9 nm.

Na Figura 3.2 encontra-se representado o histograma de distribuição de tamanhos das nanopartículas de ouro sintetizadas em anião citrato, elaborado de acordo com os dados obtidos através da contagem do número e diâmetro das nanopartículas de ouro.

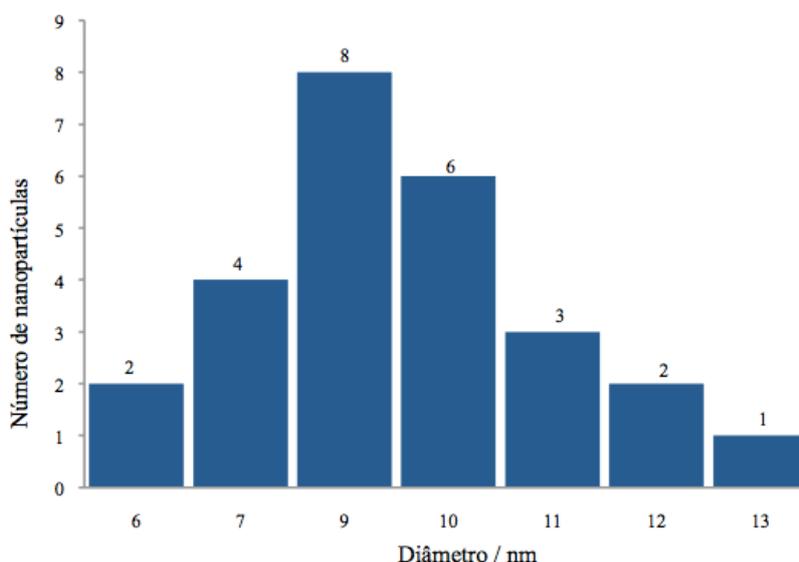


Figura 3.2. – Histograma de distribuição de tamanho para AuNPs (citrato).

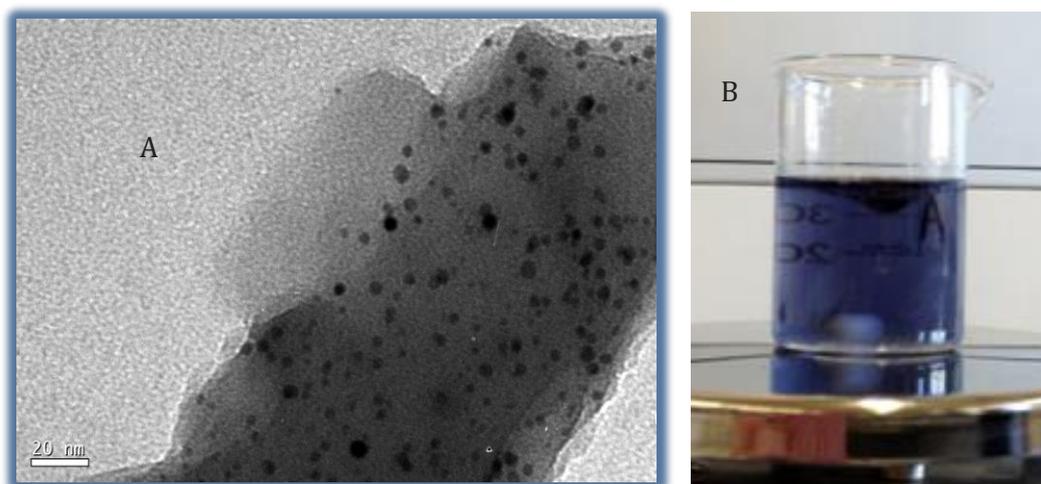
### 3.1.4 Síntese das nanopartículas de Ouro estabilizadas pela Polianilina (AuNPs/PANI)

Foi adicionado 1 mL de ácido tetracloroaúrico  $5 \times 10^{-3}$  mol/L a 18 mL de água ultrapura em agitação. A esta solução foi adicionado 1 mL de polianilina em solução aquosa com uma concentração de 0,5% (m/V). De seguida foi adicionado, gota a gota e sob agitação forte, 10 mL de borohidreto de sódio 0,01

mol/L. A mistura foi agitada por 30 min adicionais. (Esta síntese foi adaptada da descrita no trabalho de Chirea et al. [2])

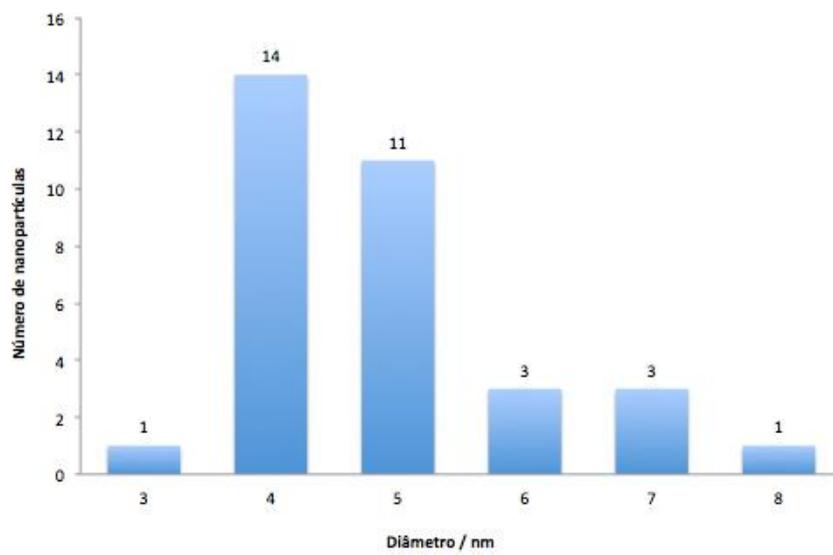
A síntese química das nanopartículas de ouro modificadas em presença de PANI foi realizada substituindo o agente estabilizante usado na síntese das AuNPs, o anião citrato, pela polianilina. Esperava-se desta forma que a PANI formasse uma camada à superfície das nanopartículas impedindo o seu crescimento e atuando simultaneamente como agente estabilizante.

Foi também obtida uma imagem de TEM da suspensão de nanopartículas sintetizadas em PANI e o resultado obtido encontra-se na Figura 3.3. Nessa figura é possível observar as nanopartículas de ouro dispersas na matriz polimérica.



**Figura 3.3 – a) Imagem de TEM da suspensão de AuNPs/PANI. b) Coloração obtida na síntese.**

Na fotografia representada na Figura 3.3. é possível ver a solução das nanopartículas sintetizadas em PANI com uma coloração azulada. O mesmo processo de contagem de partículas recorrendo ao programa Image J foi utilizado para contar as nanopartículas em PANI, sendo possível obter o histograma representado na Figura 3.4. Em que é possível determinar que o diâmetro médio das nanopartículas sintetizadas é de  $4,8 \pm 0,7$  nm, ligeiramente inferior ao tamanho médio observado para as nanopartículas sintetizadas usando iões citrato como estabilizador.

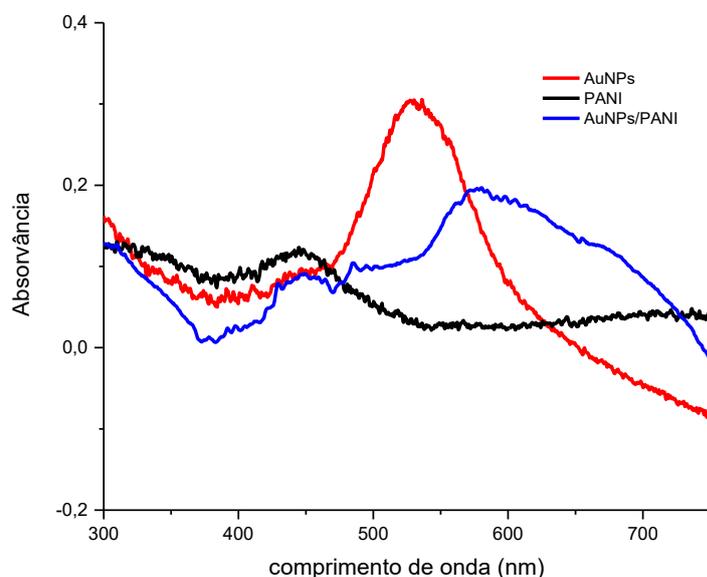


**Figura 3.4 - Histograma de distribuição do tamanho para AuNPs sintetizadas em PANI**

## 3.2 Apresentação e discussão dos resultados

### 3.2.1. Estudos espectroscópicos das nanopartículas obtidas

Foi traçado para ambas as soluções de nanopartículas (em meio citrato e em PANI) um espectro de absorção UV/visível que pode ser observado no gráfico da Figura 3.5.



**Figura 3.5. – Espectros de absorvância UV/Visível obtidos para as soluções de AuNPs, PANI e AuNPs/PANI.**

Por comparação dos espectros é visível a deslocação da banda de absorção para valores de comprimento de onda superiores. O deslocamento da banda para o infravermelho ocorre devido ao aumento da agregação das partículas provocado pela presença de polímero [3], todavia este resultado é contraditório com a medição do tamanho das partículas feita por TEM e poderá ser notado devido à dificuldade em observar compostos orgânicos em microscopia de transmissão, o resultado da presença destes compostos é uma imagem difusa que poderá significar que as medições efetuadas correspondem apenas a nanopartículas isoladas.

A partir da análise de DLS da amostra foi possível obter um valor de cerca de 2 nm para o tamanho médio das nanopartículas obtidas.

Os resultados quantitativos obtidos por análise dos gráficos de correlação, distribuição de intensidades e distribuição de massas encontram-se na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1. – Dados obtidos por DLS para as Nanopartículas de Ouro.**

<b>Diâmetro</b>	2,31 nm
<b>Polidispersão</b>	44,49 %
<b>Massa</b>	98,72 %

Os resultados obtidos para a PANI por DLS mostram estarmos na presença de grandes aglomerados de polímero ou partículas muito grandes, cerca de 11 µm, e com uma grande dispersão de tamanhos.

Os resultados obtidos por análise dos gráficos de correlação, distribuição de intensidades e distribuição de massas encontram-se na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2 - Dados obtidos por DLS para a PANI.**

<b>Diâmetro</b>	11,4 µm
<b>Polidispersão</b>	57,98 %
<b>Massa</b>	100 %

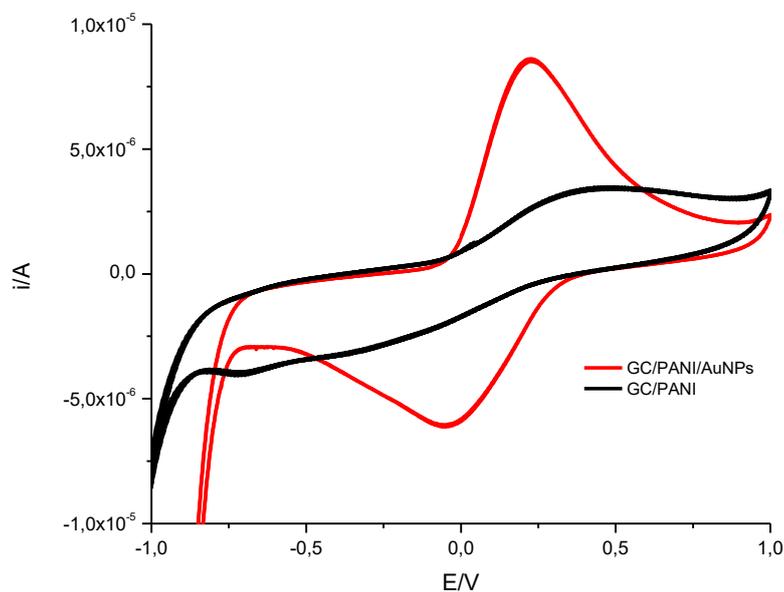
### 3.2.2 Estudos eletroquímicos dos materiais compósitos sintetizados

Um conjunto de ensaios eletroquímicos foram realizados para testar a influência da incorporação dos materiais compósitos sintetizados no desempenho dos eléctrodos.

A modificação dos eléctrodos de GC foi conseguida por adsorção a partir de 50 µL da solução de PANI obtida como descrito anteriormente e/ou por adsorção do mesmo volume de uma suspensão das nanopartículas descritas.

Diferentes ensaios voltamétricos foram realizados usando um sistema de três eléctrodos (GC – eléctrodo de trabalho; Pt – contra-eléctrodo; Ag/AgCl – eléctrodo de referência), numa solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/L.

Na Figura 3.6 observa-se o resultado dos ensaios voltamétricos para o eletrodo de GC modificado com PANI e com AuNPs/PANI, para um intervalo de potenciais de -1 a 1 V e a uma velocidade de varrimento de 0,05 V/s.



**Figura 3.6 – Ensaios voltamétricos em eletrodo de GC modificado com PANI e AuNPs/PANI em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M a 0,05 V/s.**

A comparação entre os resultados obtidos com o eletrodo de GC modificado com PANI e com AuNPs/PANI mostra uma melhoria do sinal eletroquímico obtido na presença das nanopartículas de ouro, uma vez que há um aumento significativo da corrente no pico de oxidação a 0,1 V, que corresponde à oxidação da forma reduzida leucoesmeraldina à forma oxidada condutora, sal de esmeraldina.

Foram realizados ensaios de estabilidade para analisar a influência que a realização dos ensaios voltamétricos tem na degradação do filme de AuNPs/PANI. Na Figura 3.7 é possível observar um decréscimo da corrente de pico com o tempo, o que mostra que há uma degradação dos filmes depositados à superfície do eletrodo.

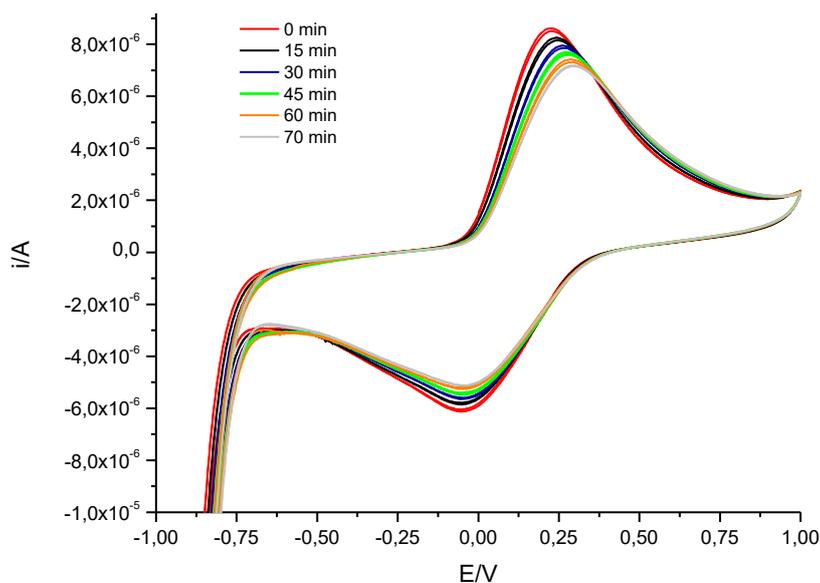


Figura 3.7. – Ensaio de estabilidade, elétrodo de GC modificado com AuNPs/PANI.

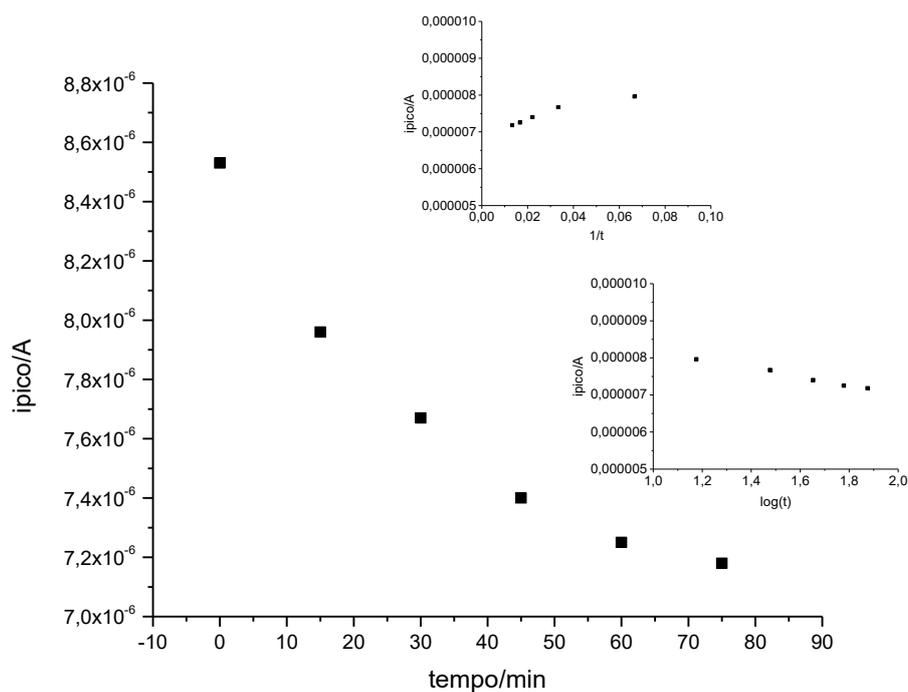


Figura 3.8. – Representação da intensidade de corrente de pico anódico em função do tempo.

No gráfico da Figura 3.8 é possível observar a representação da intensidade de corrente de pico em função do tempo. É notória a diminuição da corrente de pico que já havia sido referida mas parece notar-se um decréscimo no ritmo com que

diminuiu ao longo do tempo, observando-se que o fim de 75 min o nível é de cerca de 85% do valor inicial.

Num trabalho sobre modificação de superfícies de ITO com nanopartículas de ouro e polianilina, Pandey e colaboradores notam um decréscimo do sinal para cerca de 85% do inicial, que se mantém estável até 11 semanas. [4]

### **3.2.3 Caracterização de superfícies modificadas com os materiais compósitos sintetizados**

Foram utilizadas duas técnicas distintas (AFM e SIMS) de caracterização de superfícies em superfícies de mica modificadas com polianilina (PANI) e nanopartículas de ouro (AuNPs).

Ambos os estudos de caracterização de superfícies foram realizados na Universidade de Bratislava, ao abrigo de um Programa Bilateral PT-SK financiado pela União Europeia.

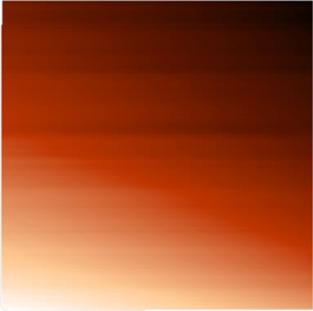
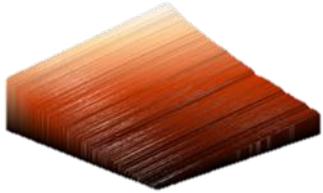
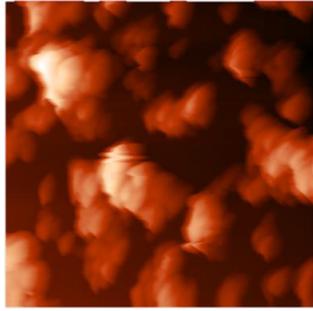
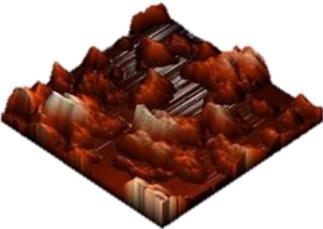
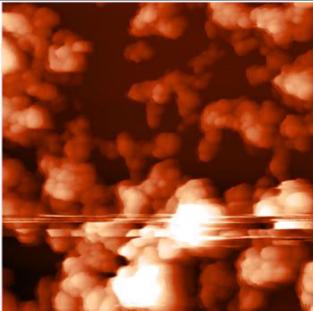
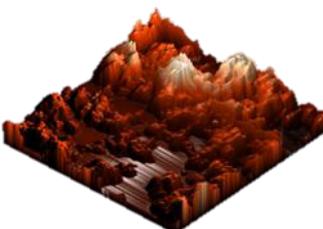
A Microscopia de Força Atómica foi descrita pela primeira vez por Binnig et al. como uma técnica que permite a obtenção de imagens topográficas de alta resolução.[5] Na técnica de AFM, um mapa topográfico da superfície em estudo é obtido pela interação física entre uma sonda e a superfície da amostra. A força desta interação é indiretamente determinada pela deflexão que um feixe ótico na sonda nas diferentes fases do varrimento da superfície. Estas oscilações são processadas por computador e uma imagem topográfica da superfície da amostra pode ser obtida. [6, 7]

A Tabela 3.3 apresenta um resumo dos resultados obtidos por AFM e das modificações morfológicas que ocorrem na superfície da mica.

A superfície limpa de mica apresenta uma quase inexistência de rugosidade, já espectacular, que aumenta quando ocorre a deposição do polímero de anilina e da mistura de polianilina com nanopartículas de ouro.

A deposição de polianilina origina aglomerados de maiores dimensões, quando comparados com aqueles que se observam por deposição da mistura polianilina+AuNPs, mas em menor quantidade.

**Tabela 3.3 – Resultados obtidos por AFM, em superfícies de mica simples, modificada com PANI e modificada com PANI+AuNPs.**

Superfície em estudo	Imagem 2D (5x5 µm)	Imagem 3D
Mica		
Mica + PANI		
Mica + PANI + AuNPs		

Apesar da presença das nanopartículas de ouro não poder ser visualizada diretamente, principalmente devido à rugosidade do depósito, são notórias as alterações que a sua presença induz na rugosidade do depósito mostrando grânulos de pequenas dimensões.

Aquele que viria a ser o primeiro espectrómetro de massa iónica secundária foi proposto pela primeira vez por Honig, em 1951, mas já em 1910 J. J. Thomson havia detetado pela primeira vez a existência de iões secundários [8].

A espectroscopia de massa de iões secundários é uma técnica usada para analisar a composição de superfícies sólidas e filmes finos através do bombardeio da sua superfície com um feixe de iões primários. A recolha e análise dos iões secundários ejetados por espectroscopia de massa permite determinar a composição elementar da superfície. Apesar de ser considerada apenas uma técnica qualitativa, é uma das técnicas de análise de superfície mais sensíveis, com um limite de deteção elementar inferior a 1 ppm. [9, 10]

O espectrómetro utilizado neste trabalho estava acoplado a um fotomultiplicador e a massa dos iões secundários extraídos da superfície, quando incidida por um feixe de iões primários de bismuto, é determinada através dos diferentes tempos de voo que as diferentes massas vão apresentar quando acelerados até uma mesma energia cinética.

Os resultados obtidos permitem verificar que a principal diferença, observada entre as amostras de mica modificada com polianilina e as amostras de mica modificadas com polianilina e nanopartículas de ouro, é a presença, nestes últimos, de iões secundários que combinam a presença de compostos com origem orgânica e átomos de ouro. A este fenómeno, que resulta na união entre iões metálicos com compostos orgânicos, consequência do bombardeamento pelo feixe de iões primários, chama-se cationização. [11]

Os espectros de emissão obtidos, com a respetiva análise elementar, bem como os mapas de superfície dos iões secundários de interesse, foram obtidos e tratados pelos colegas da Universidade de Bratislava a partir de amostras de mica modificada com PANI e PANI/AuNPs, e encontram-se disponíveis em Anexo no final desta tese.

### 3.3 Bibliografia

1. Travain, S.A., *Preparação e Caracterização de Filmes de Polianilina pelo método de deposição in situ*. 2001, Universidade de São Paulo: São Paulo.
2. Chirea, M.P., E. Pereira, C. M. Silva, F., *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2011. **1**: p. 119-126.
3. Akherat Doost, H., M.H. Majles Ara, and E. Koushki, *Synthesis and complete Mie analysis of different sizes of TiO<sub>2</sub> nanoparticles*. *Optik - International Journal for Light and Electron Optics*, 2016. **127**(4): p. 1946-1951.
4. Pandey, P., et al., *Gold nanoparticle-polyaniline composite films for glucose sensing*. *J Nanosci Nanotechnol*, 2008. **8**(6): p. 3158-63.
5. Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber, *Atomic Force Microscope*. *Physical Review Letters*, 1986. **56**(9): p. 930-933.
6. Ferreira, E., *Nucleação e crescimento de filmes de crómio a partir de solvente de baixo eutético*. 2012, Universidade do Porto: Porto.
7. Eaton, P.W., P., *Atomic Force Microscopy*. 2010, New York.
8. Jane Gale, P. and B.L. Bentz, *The Early History of Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS)*, in *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*. 2016, Elsevier: Boston. p. 101-102.
9. Vickerman, J.C. and N. Winograd, *SIMS—A precursor and partner to contemporary mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2015. **377**: p. 568-579.
10. Lockyer, N.P. and J.C. Vickerman, *SIMS, Time-of-Flight, and Surface Analysis*, in *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. 2016, Elsevier.
11. Grade, H. and R.G. Cooks, *Secondary ion mass spectrometry. Cationization of organic molecules with metals*. *Journal of the American Chemical Society*, 1978. **100**(18): p. 5615-5621.

## **4. Biossensor de glucose**

## 4.1 Métodos de preparação

Neste capítulo são descritos de forma detalhada os diferentes passos seguidos para a construção de sensor de glucose por imobilização de glucose oxidase à superfície do eletrodo. Será também estudada a incorporação no eletrodo dos materiais compósitos produzidos anteriormente, cujos resultados foram apresentados no capítulo anterior.

### 4.1.1 Instrumentação

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas usando um potenciostato/galvanostato da Metrohm Autolab PGSTAT302N, equipado com um módulo FRA e controlado pelo *software* GPES.

Os eletrodos impressos de carbono (C-SPE com referência DRP-110), com um eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de carbono e uma pseudo-referência de prata, foram comprados à DropSens, assim como a *switch box* que permite a interface entre o eletrodo e o potenciostato/galvanostato.

Quando necessário, o pH foi medido por um eletrodo de vidro combinado ligado a um medidor de pH MicroPH 2000 Crison.

### 4.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

Glucose Oxidase a partir de *Aspergillus Niger*, Fluka

Glucose, Merck

p-Benzoquinona, Sigma-Aldrich

Hexacianoferrato de Potássio (III), Fluka

Hexacianoferrato de Potássio (II) trihidratado, Fluka

Dihidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

Hidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

A água foi desionizada usando um sistema de filtros Millipore (MilliQsystem) até uma resistividade de 18 MOhm.cm.

#### 4.1.3 Soluções

As soluções de tampão fosfato  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L foram preparadas ajustando o pH a 7 por adição de volumes adequados de uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de hidrogenofosfato de sódio a uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de dihidrogenofosfato de sódio, estas soluções serão designadas como PBS 0,1 M.

Foram utilizadas a solução de PANI a 1% (m/V) a partir da PANI sintetizada para fase inicial deste trabalho e a suspensão de nanopartículas de ouro, produzidas pelo método do citrato já descrito anteriormente.

As soluções de Glucose Oxidase foram preparadas na presença de p-benzoquinona (2 mmol/L).

#### 4.1.4 Modificação da superfície dos elétrodos C-SPE.

A modificação da superfície de carbono dos elétrodos foi conseguida por adsorção direta de 30 µL de uma solução de Glucose Oxidase 5 mg/mL e da solução de PANI e/ou da suspensão de nanopartículas, para os diferentes casos em estudo.

A modificação da superfície era efetuada durante a noite até à completa evaporação do solvente, o filme obtido foi lavado abundantemente com água desionizada.

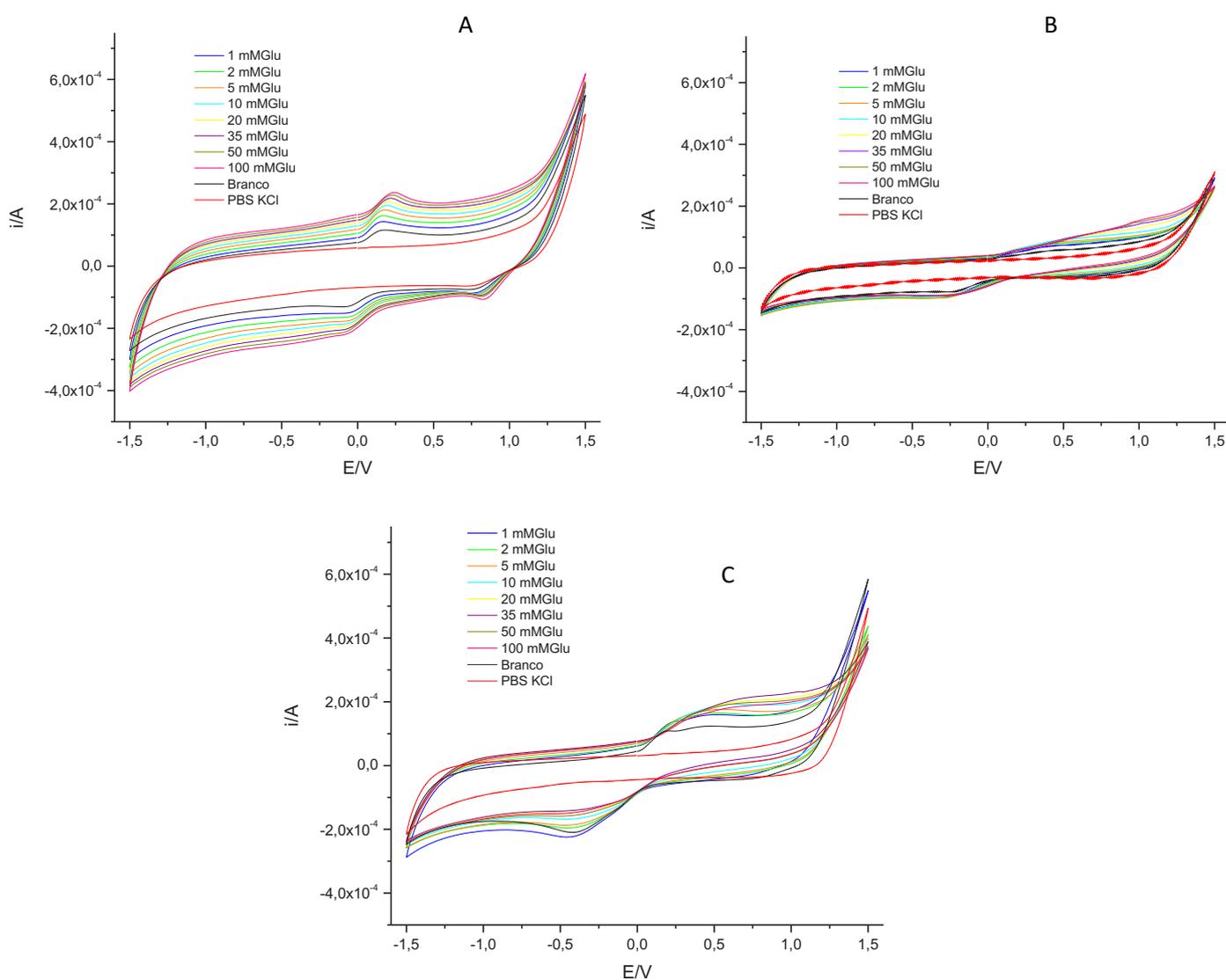
**Tabela 4.1 – Diferentes modificações de eletrodo testadas como biossensor de glucose**

Eléctrodo carbono (SPE-C)	Modificação à superfície
1	Glucose Oxidase
2	Glucose Oxidase + PANI
3	Glucose Oxidase + PANI + AuNPs

Foram produzidos elétrodos com três composições distintas. As diferentes modificações testadas, encontram-se resumidas na Tabela 4.1

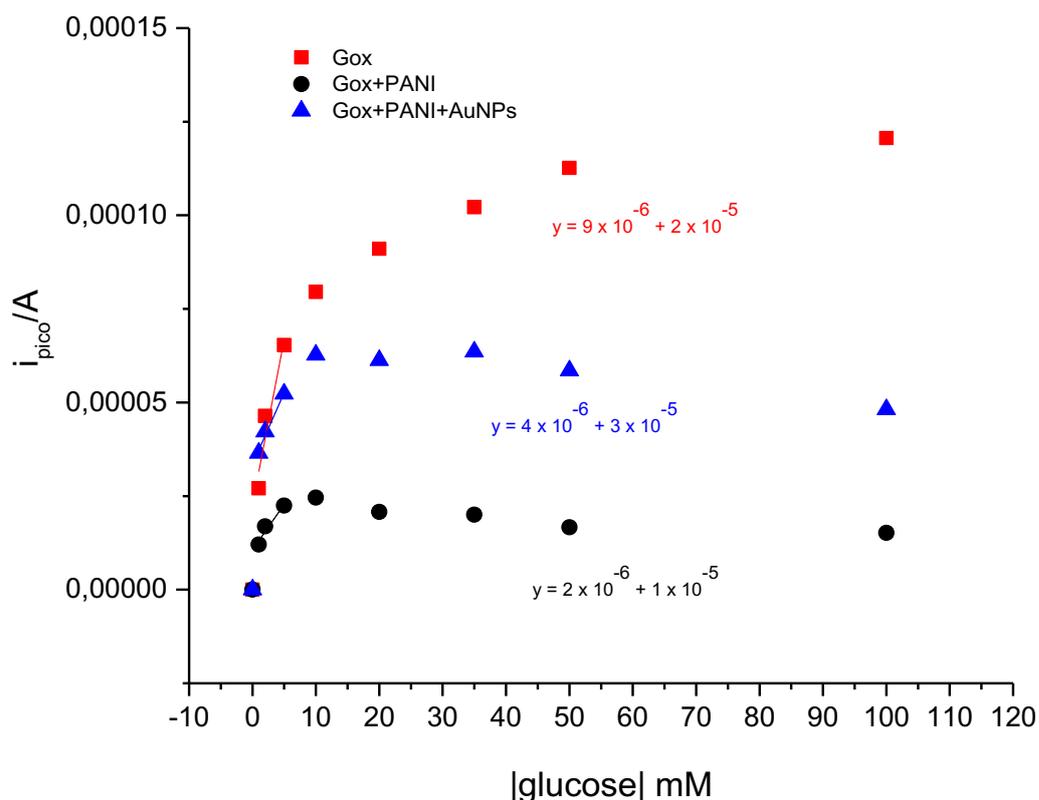
### 4.2 Resposta analítica do biossensor de glucose

Os elétrodos preparados foram usados para a análise de glucose tendo-se avaliado o seu comportamento através da construção de retas de calibração em soluções de diferente concentração de glucose.



**Figura 4.1. – Voltamogramas obtidos para os elétrodos modificados com Glucose Oxidase (A), Glucose Oxidase + PANI (B) e Glucose Oxidase + PANI + AuNPS (C), em ensaios eletroquímicos com soluções contendo tampão fosfato, cloreto de potássio, benzoquinona e de diferente concentração de Glucose.**

Foram preparadas oito soluções contendo concentrações crescentes de glucose (entre 1,0 mmol/L e 100,0 mmol/L) em tampão fosfato, PBS 0,1 mol/L e na presença de benzoquinona (2,0 mmol/L) e voltamogramas cíclicos (-1,5 V a 1,5 V) foram traçados para estudar as variações na oxidação/redução da glucose à superfície dos elétrodos. Os diferentes voltamogramas obtidos encontram-se representados nas imagens da Figura 4.1.



**Figura 4.2 - Representação gráfica da intensidade de corrente de pico em função da concentração de glucose presente na solução, em inclusão mostram-se os ajustes lineares para concentrações mais baixas.**

Os valores de intensidade de corrente pico de oxidação, para as três modificações de eletrodo em estudo, foram recolhidos e representados em função da concentração de glucose. As curvas de calibração obtidas encontram-se representadas no gráfico da Figura 4.2 e os valores obtidos para os ajustes lineares a concentrações mais baixas estão resumidos na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2 – Características das retas de calibração obtidas para os diferentes biossensores de glucose**

<b>Eléctrodo carbono (SPE-C) modificado</b>	<b>Declive da reta (A/mmol/L)</b>	<b>Ordenada na origem /A</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD (mmol/L)</b>
Glucose Oxidase	$9 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-5}$	0,919	0,118
Glucose Oxidase + PANI	$2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	0,942	0,775
Glucose Oxidase + PANI + AuNPs	$4 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-5}$	0,985	5,173

Os resultados mostram que os eléctrodos modificados com PANI e PANI+AuNPs não respondem de forma linear para concentrações superiores a 10 mM e que a incorporação da polianilina e das nanopartículas de ouro não traz melhorias também ao nível da sensibilidade de resposta para a gama de concentração mais baixa (1 mmol/L a 10 mmol/L), nem no limite de detecção calculado, uma vez que o declive das retas de calibração obtidas diminui significativamente. Provavelmente no presente caso, na presença de PANI, o filme pode ter ficado demasiado espesso, diminuindo a permeabilidade da camada superficial do eléctrodo e consequentemente o sinal electroquímico obtido.

Encontram-se já reportados na literatura uma variedade enorme de biossensores electroquímicos para glucose. Um resumo, das principais características dos biossensores de algumas das referências consultadas, encontra-se apresentado na Tabela 4.3.

Neste trabalho, uma vez que os resultados obtidos não mostravam uma melhoria no desempenho do nosso biossensor, por incorporação dos nanocompósitos em estudo, este caminho foi abandonado.

Tendo surgido a colaboração em trabalhos envolvendo o uso de polímeros impressos molecularmente para a construção de sensores electroquímicos e a falta que se verificou existir de sensores para a determinação das próprias enzimas, foi decidido utilizar novas abordagens, que serão apresentadas nos próximos capítulos.

**Tabela 4.3 – Características de alguns biossensores eletroquímicos (amperométricos) para detecção de glucose reportados na literatura.**

<b>Elemento de reconhecimento</b>	<b>Intervalo de linearidade (mmol/L)</b>	<b>LOD (umol/L)</b>	<b>Referência</b>
Nanotubos de carbon + polímero conjugado	0,002 – 0,5	7,035	[1]
Glucoamilase/ glucodesidrogenase + Nanotubos de carbono	0,1 – 0,2	40	[2]
Derivado de politiofeno	0,25 – 2,5	176	[3]
Polipirrole – Quitosano – Óxido de ferro	1 – 16	234	[4]
PANI – Óxido de grafeno	$5,532 \times 10^{-7}$ – $2,766 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-4}$	[5]
Álcool polivinilo – nanopartículas óxido de ferro	0,005 – 30	8	[6]

### 4.3 Bibliografia

1. Gokoglan, T.C., et al., *A novel approach for the fabrication of a flexible glucose biosensor: The combination of vertically aligned CNTs and a conjugated polymer*. Food Chemistry, 2017. **220**: p. 299-305.
2. Liu, A., et al., *Sensitive detection of maltose and glucose based on dual enzyme-displayed bacteria electrochemical biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 2017. **87**: p. 25-30.
3. Tekbaşoğlu, T.Y., et al., *Enhancing biosensor properties of conducting polymers via copolymerization: Synthesis of EDOT-substituted bis(2-pyridylimino)isoindolato-palladium complex and electrochemical sensing of glucose by its copolymerized film*. Biosensors and Bioelectronics, 2017. **87**: p. 81-88.
4. Abdul Amir Al-Mokaram, A.M.A., et al., *One-step electrochemical deposition of Polypyrrole–Chitosan–Iron oxide nanocomposite films for non-enzymatic glucose biosensor*. Materials Letters, 2016. **183**: p. 90-93.
5. Wu, S., et al., *Development of glucose biosensors based on plasma polymerization-assisted nanocomposites of polyaniline, tin oxide, and three-dimensional reduced graphene oxide*. Applied Surface Science, 2017. **401**: p. 262-270.
6. Sanaeifar, N., et al., *A novel electrochemical biosensor based on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles-polyvinyl alcohol composite for sensitive detection of glucose*. Analytical Biochemistry, 2017. **519**: p. 19-26.

## **5. Preparação dos filmes poliméricos molecularmente impressos**

## 5.1 Preparação dos filmes poliméricos

Neste capítulo serão descritos de forma detalhada os diferentes passos seguidos para a construção de um filme molecularmente impresso (MIP) e as diferentes condições utilizadas para a construção do filme, nomeadamente no processo de eletropolimerização e remoção da proteína, serão estudadas.

### 5.1.1 Instrumentação

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas usando um potencióstato/galvanostato da Metrohm Autolab PGSTAT302N, equipado com um módulo FRA e controlado pelo software GPES.

O eletrodo impresso de carbono (C-SPE), com um eletrodo de trabalho e contra-eletrodo de carbono e uma pseudo-referência de prata, foram comprados à DropSens (com a referência DRP-110), assim como a *switch box* que permite a interface entre o eletrodo e o potencióstato/galvanostato. Quando necessário, o pH foi medido por um eletrodo combinado de vidro ligado a um medidor de pH MicroPH 2000 Crison.

### 5.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

Glucose Oxidase a partir de *Aspergillus Niger*, Fluka

Ácido cafeico, Sigma-Aldrich

Hexacianoferrato (III) de Potássio, Fluka

Hexacianoferrato (II) de Potássio trihidratado, Fluka

Dihidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

Hidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

Ácido sulfúrico, Merck 25%

Dodecilssulfato de Sódio, Sigma-Aldrich

Ácido Acético, Sigma-Aldrich 99,7%

A água foi desionizada usando um sistema Millipore (MilliQsystem) até uma resistividade de 18 MOhm.cm.

### 5.1.3 Soluções

Soluções de tampão fosfato  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L foram preparadas ajustando o pH a 7 por adição de volumes adequados de uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de hidrogenofosfato de sódio a uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de dihidrogenofosfato de sódio. Foram preparadas soluções *stock* de Glucose Oxidase 1 mg/mL em tampão fosfato. As soluções menos concentradas de todas as enzimas foram preparadas por diluições precisas das soluções anteriores no mesmo tampão.

### 5.1.4 Eletrossíntese dos filmes molecularmente impressos

Antes da eletropolimerização, foi realizada uma limpeza electroquímica do C-SPE com 0,5 mol/L  $H_2SO_4$  por varrimento de potencial a uma velocidade de varrimento de 50 mV/s, numa janela de potencial de -0,2 V a 1,0 V, até estabilização do voltamograma obtido (cerca de 30 ciclos).

No primeiro passo para a produção dos filmes molecularmente impressos foi realizada a adsorção da molécula molde, através da cobertura da área de trabalho do eletrodo com uma solução contendo glucose oxidase (foram estudadas diferentes concentrações) e  $2 \times 10^{-4}$  mol/L de ácido cafeico em tampão fosfato. Para permitir a eletropolimerização, diferentes estratégias electroquímicas com aplicação de potenciais fixos ou variáveis ao longo do tempo foram estudadas.

Após este passo é necessário proceder à remoção da molécula molde, para o efeito, o filme polimérico obtido foi lavado com água desionizada

para remover o excesso de ácido cafeico não polimerizado e enzima não adsorvida ou imobilizada no filme - e incubado durante diferentes tempos e com diferentes agentes desnaturantes, para perceber qual a melhor estratégia de remoção da proteína. Após o período de incubação, o eletrodo foi abundantemente lavado com água desionizada de forma a remover completamente os resíduos de enzima ainda presentes no filme polimérico.

### 5.1.5 Medições eletroquímicas

Medições de espectroscopia de impedância electroquímica (EIS) foram realizadas numa solução equimolar de 5 mmol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  e 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  em tampão fosfato 0,1 mol/L.

Para a EIS, uma voltagem ac de 10 mV, num intervalo de frequências desde 0,1 a 100000 Hz, foi aplicado ao sistema sobreposto a um potencial contínuo de 120 mV e os dados de impedância foram depois representados sob a forma de diagramas de Nyquist, que foram ajustados a um circuito equivalente usando um módulo adequado no *software* FRA.

As medições de EIS foram usadas para monitorizar as alterações de impedância que ocorrem à superfície do eletrodo durante todo o processo de modificação e desta forma poder aferir sobre a extensão ou a qualidade da modificação realizada.

## 5.2 Apresentação e discussão de resultados obtidos

### 5.2.1 Construção do filme polimérico

O processo de construção do filme polimérico à superfície do eletrodo, tem lugar em duas fases distintas: (1) A polimerização do ácido cafeico, em simultâneo com a impressão da enzima e (2) a remoção da enzima das cavidades formadas durante a fase anterior.

Estas diferentes fases induzem mudanças nos processos de transferência eletrónica à superfície do recetor e podem ser acompanhadas por medições de EIS na presença de um par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ .

Um esquema, onde são apresentados os diferentes passos da construção do biossensor para a enzima glucose oxidase, é apresentado na Figura 5.1.

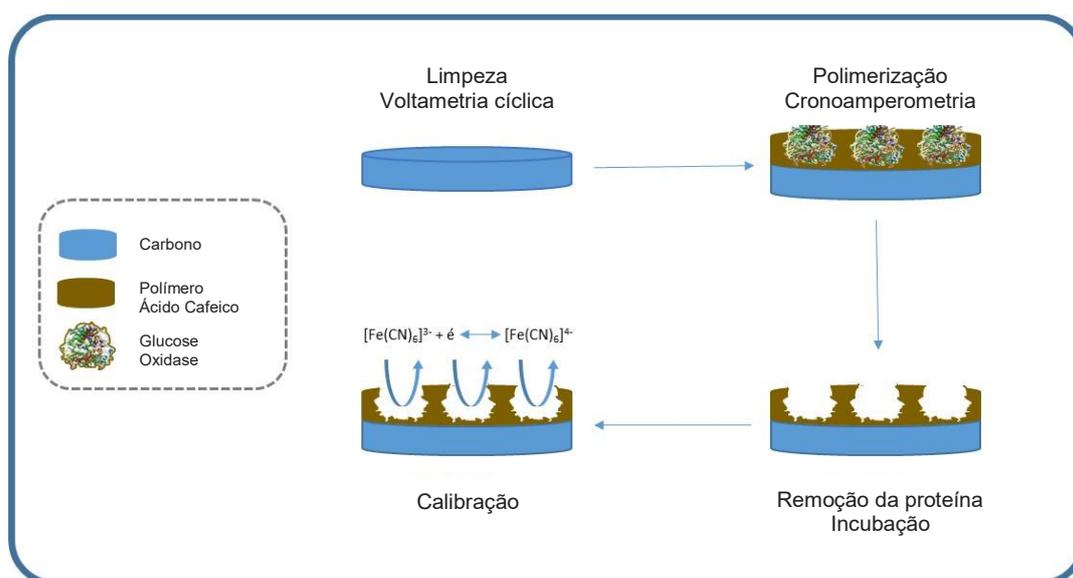


Figura 5.1 – Esquema resumido dos procedimentos para a formação e utilização do MIP.

A síntese do NIP, utilizado como controlo ou branco, é efetuada da mesma forma que o MIP excluindo a enzima da solução usada durante a fase de polimerização.

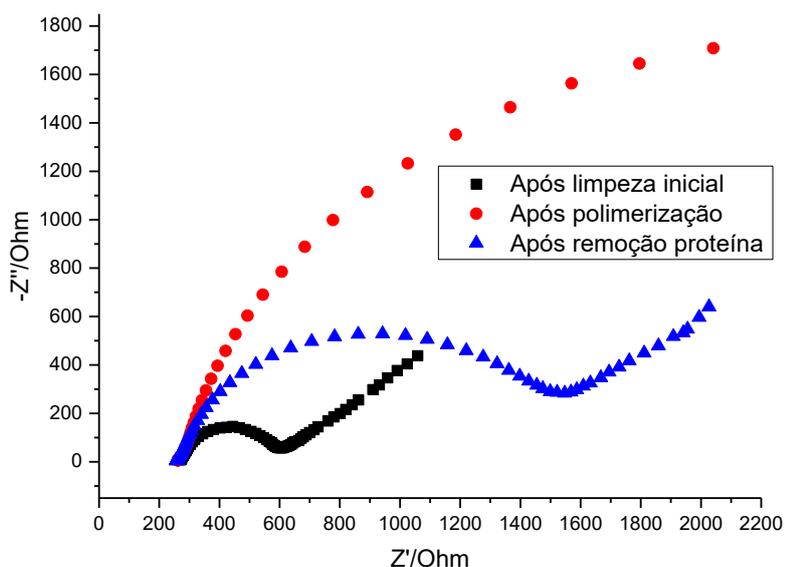
### 5.2.2. Monitorização do processo de construção do MIP por EIS

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi usada para avaliar as alterações a nível da capacidade de transferência de carga dos filmes após cada um dos passos da construção do biossensor. Para monitorizar o processo de construção do sensor, foi escolhido o sistema redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . [1, 2] Este sistema eletroquímico encontra-se bem caracterizado e tem um comportamento eletroquímico estável pelo que as alterações observadas são, de forma indirecta, a indicação das alterações ocorridas no filme, como o bloqueio da superfície na fase de polimerização (NIP), abertura de canais ou defeitos no filmes ou pelos espaços deixados vazios pela remoção da enzima impressa (MIP).

Uma curva Nyquist típica, para um processo de transferência de carga, apresenta um semicírculo, numa região de elevadas frequências indicativo de um comportamento controlado pela transferência de carga, seguida de uma linha reta, a frequências mais baixas indicativo de um comportamento controlado por difusão, da espécie eletroativa. A interpretação dos dados obtidos pela impedância eletroquímica requer o uso de circuitos equivalentes que irão permitir a determinação das resistências de transferência de carga para cada um dos passos envolvidos no processo. [3]

Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5.2 e mostram o diagrama de impedâncias com o semicírculo mais pequeno quando estudamos a superfície de carbono limpa e um aumento significativo do semicírculo após a polimerização, quando a superfície de carbono está coberta com a membrana polimérica e a enzima impressa. Após a remoção da proteína, há um novo decréscimo do diâmetro do semicírculo.

Os dados de impedância obtidos com a superfície de carbono polimerizada com ácido cafeico e a proteína impressa foram consistentes com a formação de uma fina camada polimérica.



**Figura 5.2 – Diagramas de Nyquist de impedância eletroquímica obtidos depois dos diferentes estágios da preparação do MIP. Depois da limpeza inicial (preto), depois da polimerização (vermelho) e depois do processo de remoção proteica (azul), para a construção de um biossensor de glucose oxidase.**

Este comportamento já era esperado uma vez que no eletrodo de carbono o processo de transferência eletrônica é rápido e limitado por difusão – apresentando um semicírculo pequeno. Quando a superfície do carbono é gradualmente coberta pelo polímero e pela enzima, o acesso à superfície torna-se mais difícil, o que se traduz no aumento da resistência de transferência de carga do processo – apresentando um semicírculo maior.

Após a remoção da proteína, tal como esperado, os valores de  $R_{ct}$  obtidos são mais baixos que aqueles obtidos após a polimerização. A recuperação de alguma capacidade de transferência eletrônica prova que a extração da enzima criou, no filme polimérico, cavidades correspondentes aos locais onde a enzima foi impressa, tornando o acesso à superfície mais facilitado.

Os diagramas de Nyquist, obtidos no decorrer deste trabalho, correspondem a um circuito equivalente de Randles. Neste sistema, o circuito elétrico equivalente utilizado encontra-se ilustrado na Figura 5.3., e é composto pela resistência da solução ( $R_s$ ), pela capacidade da dupla camada ( $C_{dl}$ ), pela

resistência da transferência de carga ( $R_{ct}$ ) e pelo elemento de difusão de Warburg ( $W$ ). [4, 5]

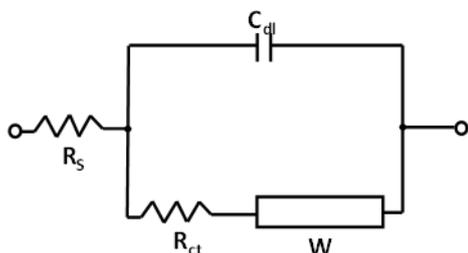


Figura 5.3 – Circuito equivalente de Randle.

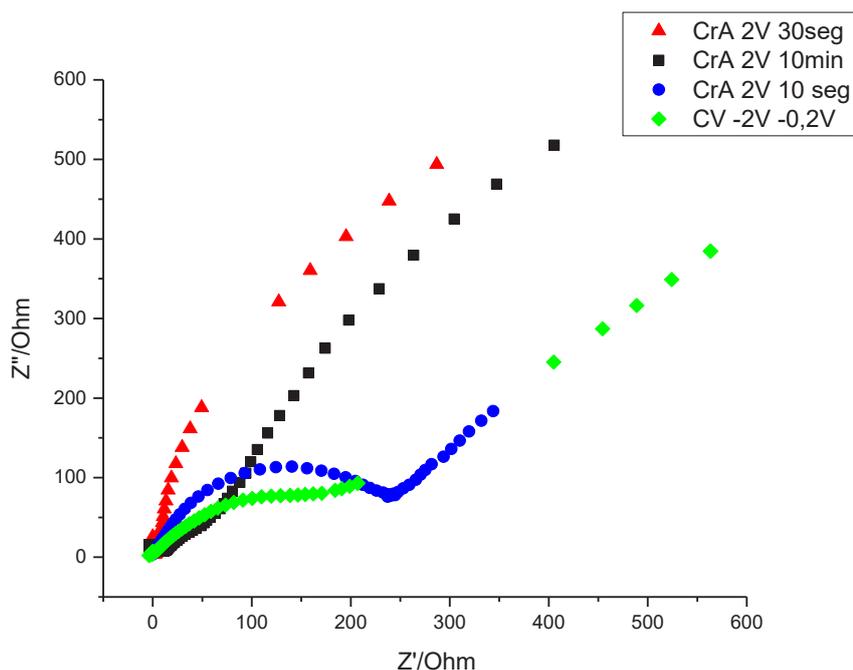
### 5.2.3 Estudo do processo de polimerização e impressão molecular

A construção dos filmes MIP foi realizada através da eletropolimerização do ácido cafeico na presença de glucose oxidase à superfície do eletrodo de carbono. Foram testadas duas técnicas eletroquímicas distintas, a voltametria cíclica e a cronoamperometria. Sendo que nesta última foi aplicado um potencial fixo de 2 V com diferentes tempos de aplicação. O potencial escolhido baseou-se em outros trabalhos já publicados na literatura. [6] Na tabela 5.1 encontram-se resumidas as condições experimentais utilizadas.

Tabela 5.1 – Diferentes condições testadas para a eletropolimerização do ácido cafeico à superfície do eletrodo.

Técnica eletroquímica	Potencial aplicado	Tempo de aplicação
Cronoamperometria	2 V	10 seg
		30 seg
		10 min
Voltametria cíclica	[-0,2 V; 2 V]	1 ciclo

A Figura 5.4 apresenta os espectros de impedância obtidos após a eletropolimerização dos eletrodos de carbono nas diferentes condições apresentadas na Tabela 5.1.

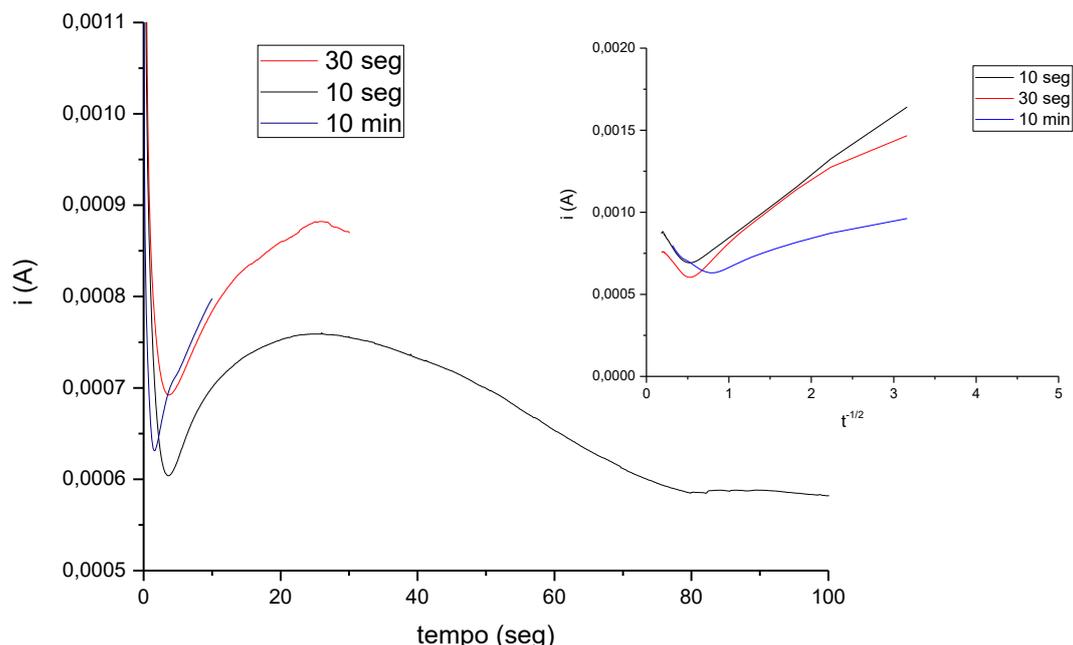


**Figura 5.4 – Espectros de impedância obtidos após a eletrodeposição do ácido cafeico e da glucose oxidase à superfície do SPE de carbono.**

É possível observar que os espectros correspondentes aos ensaios de cronoamperometria de 30 seg e 10 minutos são os que apresentam uma maior resistência de transferência de carga do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  o que indica uma maior cobertura da superfície do eletrodo.

Os cronoamperograma obtidos durante a eletrodeposição do ácido cafeico e da enzima estão representados na Figura 5.5.

É possível verificar que o pico máximo de corrente ocorre por volta dos 28 segundos de deposição em ambos os ensaios, após o qual há uma diminuição da corrente que poderá indicar que o processo de eletropolimerização está limitado pela difusão dos reagentes. A espessura do filme polimérico obtido pode ser controlada ajustando tanto o potencial aplicado como o tempo de deposição. Para melhorar a sensibilidade dos dispositivos é aconselhável que se produzam filmes poliméricos ultrafinos à superfície do transdutor.[7]



**Figura 5.5 – Cronoamperogramas obtidos durante a eletrodeposição do ácido cafeico e da glucose oxidase à superfície do elétrodo de carbono. Em inclusão são apresentados os mesmos valores de intensidade de pico em função do  $t^{-1/2}$ .**

A espessura dos filmes poliméricos obtidos foi estimada através da análise dos cronoamperogramas obtidos durante a electrodeposição do ácido cafeico à superfície do SPE-C. Foi usada a equação 5.1 apresentada em algumas das referências consultadas para avaliação da espessura do filme produzido [8, 9]

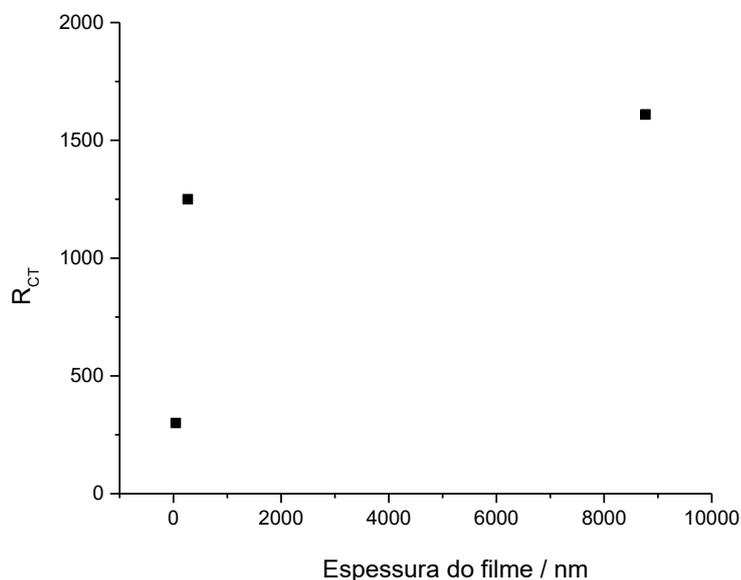
$$d = \frac{MQ}{FA\rho} \quad \text{(Equação 5.1)}$$

em que  $d$  é a espessura do filme,  $M$  a massa molecular do monómero do ácido cafeico (180,16 g/mol),  $Q$  é a carga total transferida durante a eletropolimerização – obtida pela integração do cronoamperograma -,  $A$  a área do elétrodo,  $F$  é a constante de Faraday ( $9,6485 \times 10^4$  C/mol) e  $\rho$  é a densidade do polímero ( $1,48 \text{ g/cm}^3$  assumindo que será aproximadamente igual à do monómero). Esta equação permite obter uma estimativa da espessura do filme obtido e comparar as diferentes condições experimentais testadas.

Os valores estimados para a espessura dos filmes obtidos encontram-se na Tabela 5.2 e estão de acordo com os resultados eletroquímicos obtidos. A resistência de transferência de carga do filme, analisada posteriormente por espectroscopia de impedância eletroquímica, foi representada em função da espessura estimada da membrana. O gráfico obtido encontra-se representado na Figura 5.6.

**Tabela 5.2 – Espessuras estimadas para os filmes poliméricos obtidos por cronoamperometria e resistência de transferência de carga obtida por impedância após a formação do filme.**

Condições eletroquímicas	Espessura estimada (nm)	Resistência transferência de carga (ohm)
2 V; 10 seg	43	300
2 V; 30 seg	265	1250
2 V; 10 min	8770	1610



**Figura 5.6 – Representação gráfica da resistência de transferência de carga do filme polimérico em função da sua espessura estimada.**

Numa estimativa muito grosseira e tendo em conta que o valor de  $R_{CT}$  para o filme obtido por voltametria cíclica é de 250 ohm, podemos assumir que a espessura do filme obtido é de cerca de 31 nm.

Observa-se que o aumento do tempo de deposição leva a um aumento da espessura do filme (estimado com base no aumento da carga da curva cronoamperométrica) e o correspondente aumento do valor de  $R_{CT}$ . Todavia o aumento de  $R_{CT}$  quando aumentamos o tempo de deposição de 30 segundos para 10 minutos, o aumento é de 30 %, muito inferior ao aumento da  $R_{Cd}$  quando passamos de 10 para 30 segundos (200 %). Estes dados parecem indicar que, apesar de muito mais espesso, o filme obtido ao fim de 10 minutos de eletrodeposição poderá ter mais defeitos.

Tendo em conta estes resultados, e o desempenho demonstrado pelos elétrodos, foi escolhido o método de cronoamperometria a um potencial de 2 V, durante 30 segundos, para realizar os ensaios subsequentes.

#### **5.2.4 Estudos da desnaturação e remoção proteica**

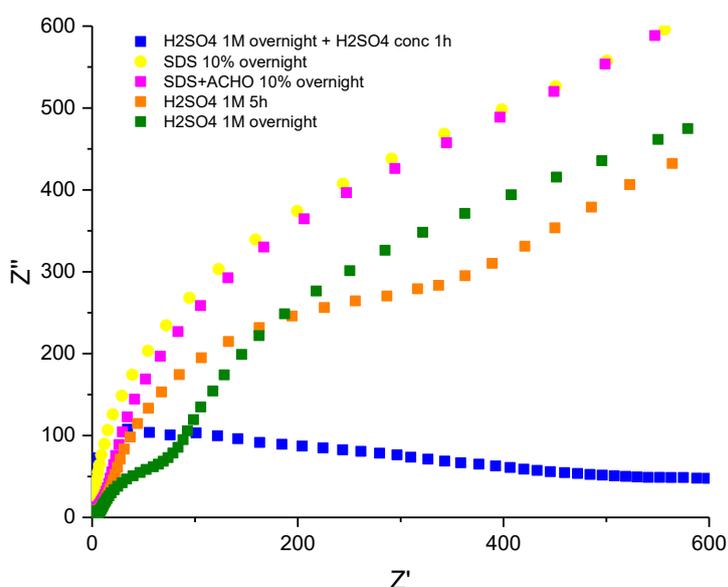
Diferentes estratégias para a remoção de proteínas impressas em redes poliméricas têm sido descritas na literatura. A grande maioria delas usa tratamentos químicos para induzir a desnaturação da proteína e a quebra da ligação amida [10, 11], no entanto existem também algumas estratégias bioquímicas que usam enzimas para partir as ligações peptídicas entre as proteínas impressas [5].

Neste trabalho diferentes métodos foram utilizados como estratégia para a remoção da proteína da rede polimérica de ácido cafeico sintetizada. Foram testados um conjunto de agentes químicos, e a variação do tempo de aplicação também foi estudada. A tabela 5.3 apresenta um resumo das diferentes estratégias utilizadas.

**Tabela 5.3 – Diferentes condições de remoção da proteína testadas.**

Agente químico	Concentração	Tempo de remoção
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Concentrado	5h
	1 mol/L	5h
		<i>overnight</i>
SDS	10% (m/V)	<i>overnight</i>
SDS + AcHO	10% (m/V) + 10% (V/V)	<i>overnight</i>

Após cada um dos ensaios, foi traçado um espectro de impedância e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 5.7.



**Figura 5.7 – Espectros de impedância obtidos em cada um dos elétrodos sujeitos aos diferentes métodos de remoção de proteína apresentados na Tabela 5.3**

A análise dos resultados permite observar que um ambiente ácido forte (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), com incubação durante a noite, foi a tentativa de remoção que obteve uma desnaturação da proteína à superfície do elétrodo mais efetiva, já que a análise dos espectros de impedância permitem concluir que há uma diminuição significativa da resistência de transferência de carga à superfície do elétrodo modificado, quando comparado não só com os resultados obtidos para menos

tempo de incubação, com o mesmo ácido sulfúrico 1 mol/L durante 5 horas, mas também com a incubação numa solução SDS 10% (m/V) e com uma solução com SDS 10% (m/V) juntamente com AcHO 10% (V/V). A utilização de ácido sulfúrico concentrado deteriora a superfície do eletrodo (afetando o próprio filme de carbono), que deixa de responder de forma adequada. Em alguns ensaios é possível observar que a camada impressa do eletrodo parece ter descolado.

Um ambiente ácido forte foi a estratégia escolhida para a remoção da proteína do filme de ácido cafeico, incubando os filmes impressos durante a noite em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1mol/L, de forma a assegurar a completa remoção proteica e a criação de condições para a formação das cavidades complementares. Estas condições foram usadas para o estudo do comportamento do biossensor de glucose oxidase e de amílase, descritos no próximo capítulo.

### 5.3 Bibliografia

1. Rebelo, T.S.C.R., et al., *Protein Imprinted Material electrochemical sensor for determination of Annexin A3 in biological samples*. *Electrochimica Acta*, 2016. **190**: p. 887-893.
2. Rebelo, T.S.C.R., et al., *Protein imprinted materials designed with charged binding sites on screen-printed electrode for microseminoprotein-beta determination in biological samples*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016. **223**: p. 846-852.
3. Panagopoulou, M.A., et al., *Impedimetric Biosensor for the Assessment of the Clotting Activity of Rennet*. *Analytical Chemistry*, 2010. **82**(20): p. 8629-8636.
4. Moreira, F.T.C., et al., *Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection*. *Electrochimica Acta*, 2013. **107**(0): p. 481-487.
5. Moreira, F.T.C., et al., *Protein-responsive polymers for point-of-care detection of cardiac biomarker*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014. **196**(0): p. 123-132.
6. Rebelo, T.S.C.R., et al., *Sarcosine oxidase composite screen-printed electrode for sarcosine determination in biological samples*. *Analytica Chimica Acta*, 2014. **850**(0): p. 26-32.
7. Karimian, N., A.P.F. Turner, and A. Tiwari, *Electrochemical evaluation of troponin T imprinted polymer receptor*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014. **59**(0): p. 160-165.
8. Panasyuk, T.L., et al., *Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymers as Receptor Layers in Capacitive Chemical Sensors*. *Analytical Chemistry*, 1999. **71**(20): p. 4609-4613.
9. Liao, H., et al., *Preparation of the molecularly imprinted polymers-based capacitive sensor specific for tegafur and its characterization by electrochemical impedance and piezoelectric quartz crystal microbalance*. *Electrochimica Acta*, 2004. **49**(24): p. 4101-4107.

10. Lin, H.-Y., J. Rick, and T.-C. Chou, *Optimizing the formulation of a myoglobin molecularly imprinted thin-film polymer—formed using a micro-contact imprinting method*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(12): p. 3293-3301.
11. Bonini, F., et al., *Surface imprinted beads for the recognition of human serum albumin*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007. **22**(9–10): p. 2322-2328.

## **6. Biossensor para proteínas**

## 6.1 Construção dos biossensores

Neste capítulo serão apresentados e discutidos de forma detalhada os resultados obtidos na resposta analítica de biossensores para duas proteínas em estudo: glucose oxidase e amilase.

### 6.1.1 Instrumentação

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas usando um potencióstato/galvanostato da Metrohm Autolab PGSTAT302N, equipado com um módulo FRA e controlado pelo software GPES.

Os *screen printed electrodes* de carbono (C-SPE), com um eléctrodo de trabalho e contra-eléctrodo de carbono e uma pseudo-referência de prata, foram comprados à DropSens (DRP-110), assim como a *switch box* que permite a interface entre o eléctrodo e o potencióstato/galvanostato.

Quando necessário, o pH foi medido por um eléctrodo combinado de vidro ligado a um medidor de pH MicropH 2000 Crison.

### 6.1.2 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes:

Glucose Oxidase a partir de *Aspergillus Niger*, Fluka

Alfa-Amilase VI a partir de pâncreas porcino, Sigma-Aldrich

Mioglobina a partir de coração equino, Sigma-Aldrich

Ácido cafeico, Sigma-Aldrich

Haxacianoferrato de Potássio (III), Fluka

Hexacianoferrato de Potássio (II) trihidratado, Fluka

Dihidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

Hidrogenofosfato de sódio, Sigma-Aldrich

A água foi desionizada usando um sistema de filtros Millipore (MilliQsystem) até uma resistividade de 18 MOhm.cm.

### 6.1.3 Soluções

Soluções de tampão fosfato  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L foram preparadas ajustando o pH a 7 por adição de volumes adequados de uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de hidrogenofosfato de sódio a uma solução  $1,0 \times 10^{-1}$  mol/L de dihidrogenofosfato de sódio.

Foram preparadas soluções *stock* de Glucose Oxidase  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em tampão fosfato. As soluções menos concentradas das enzimas foram preparadas por diluições precisas das soluções anteriores no mesmo tampão.

### 6.1.4 Eletrossíntese dos filmes molecularmente impressos

A eletrossíntese dos filmes foi realizada como descrito no capítulo 5.1.4 por eletropolimerização (2 V, 30 s) de uma solução de ácido cafeico na presença de diferentes concentrações de enzima para a síntese do polímero.

Em paralelo, foram produzidos NIPs de forma semelhante, mas a solução usada na fase de eletropolimerização não continha a enzima, apenas a solução de ácido cafeico e o tampão fosfato.

### 6.1.5 Medições eletroquímicas

Medições de espectroscopia de impedância electroquímica (EIS) e voltametria de onda quadrada (SWV) foram realizadas numa solução de 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  e 5 mmol/L  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  em tampão fosfato e diferentes concentrações de enzima, desde 1 ng/mL a 1 mg/mL.

Para a EIS, uma voltagem ac de 12 mV, num intervalo de frequências desde 0,1 a 100000 Hz, foi aplicada ao sistema e os dados de impedância foram depois representados sob a forma de diagramas de Nyquist, que foram ajustados a um circuito equivalente usando um módulo adequado no *software* FRA.

As medições de EIS foram também usadas para monitorizar as alterações de impedância que ocorrem à superfície do eléctrodo durante todo o processo de modificação.

Para a SWV, um intervalo de potencial de - 0,5 V a 0,6 V foi estudado aplicando pulsos de 10 mV com uma amplitude de onda quadrada 50 mV.

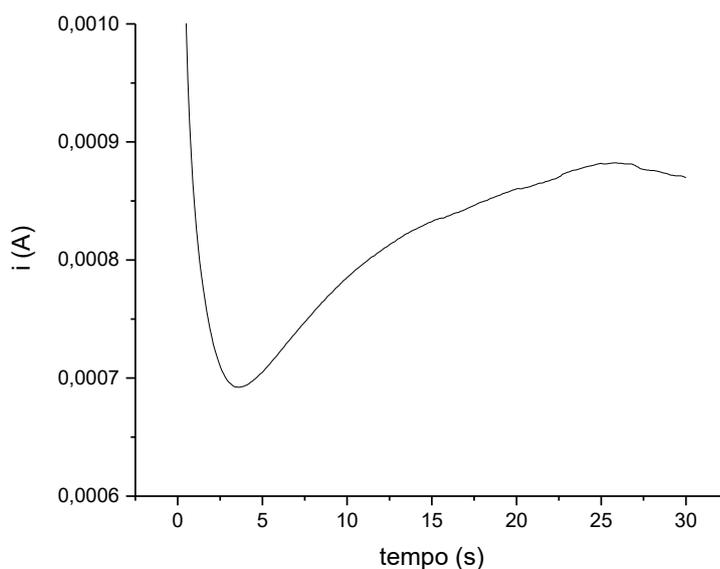
## 6.2 Biossensor para glucose oxidase

A construção dos filmes MIP foi realizada, nas condições descritas no capítulo 5, através da eletropolimerização do ácido cafeico na presença de diferentes quantidades de glucose oxidase à superfície do eléctrodo de carbono. Diferentes concentrações de glucose oxidase, resumidas na Tabela 6.1, foram usadas para a síntese do polímero.

**Tabela 6.1. – Diferentes concentrações das enzimas usadas para a construção dos sensores por impressão molecular.**

Biossensor enzimático	Concentração usada na impressão (mg/mL)
Glucose Oxidase	$1,0 \times 10^{-6}$
	$1,0 \times 10^{-5}$
	$1,0 \times 10^{-4}$

Com o objetivo de manter um bom controlo sobre as propriedades do filme, a técnica escolhida para realizar a eletropolimerização foi a cronoamperometria a 2 V durante 30 segundos. A Figura 6.1 representa um cronoamperograma, como exemplo dos cronoamperogramas obtidos durante a electrodeposição do ácido cafeico e da enzima.



**Figura 6.1 – Cronoamperograma obtido durante a electrodeposição do ácido cafeico e da glucose oxidase na superfície do SPE de carbono.**

Em paralelo, um controlo negativo foi também construído, usando um polímero não impresso (NIP). O NIP é produzido através da mesma estratégia de eletropolimerização do ácido cafeico à superfície do eletrodo, mas na ausência da enzima.

Tanto o cronoamperograma obtido durante a eletrodeposição como os resultados da espectroscopia de impedância são bastante semelhantes aqueles obtidos para os MIP.

A monitorização do processo de construção da membrana foi acompanhada por espectroscopia de impedância electroquímica, tal como descrito no capítulo anterior. No caso da impressão da proteína glucose oxidase, foram também realizados ensaios de AFM com o objetivo de estudar eventuais alterações de morfologia da superfície do eletrodo após cada um dos passos de modificação do SPE-C por imobilização da enzima no filme de ácido cafeico. As imagens obtidas corroboram a hipótese de formação do filme polimérico com os espaços complementares à proteína usada como molde. Na Figura 6.2 é possível observar as imagens AFM da superfície do SPE-C após limpeza do eletrodo, após polimerização e após remoção da glucose oxidase.

A análise da imagem permite observar diferentes morfologias para cada uma das fases de modificação da superfície. O eletrodo limpo (A) apresenta uma superfície rugosa típica dos filmes impressos de tinta de carbono usados no fabrico dos SPE e um RMS – medida da rugosidade da superfície – de 680 nm. Após a polimerização do ácido cafeico, contendo glucose oxidase, à superfície dos eletrodos, (B) é possível observar um filme que parece mais denso e compacto com grandes aglomerados e um valor de RMS de 174 nm, o que poderá ser interpretado como um preenchimento das imperfeições da superfície de carbono com a formação da rede polimérica. No ultimo passo, quando a proteína é removida, (C) o valor de RMS obtido volta a aumentar para 579 nm, o que indica que a remoção da glucose oxidase provoca um aumento da rugosidade do filme imobilizado à superfície do eletrodo. Todavia, observa-se a existência de pequenas estruturas e não largos aglomerados como no caso das imagens anteriores. Estas pequenas estruturas

devem estar relacionadas com a saída da enzima – desnaturada durante a incubação com ácido sulfúrico - que tinha sido codepositada na eletrodeposição do ácido cafeico.

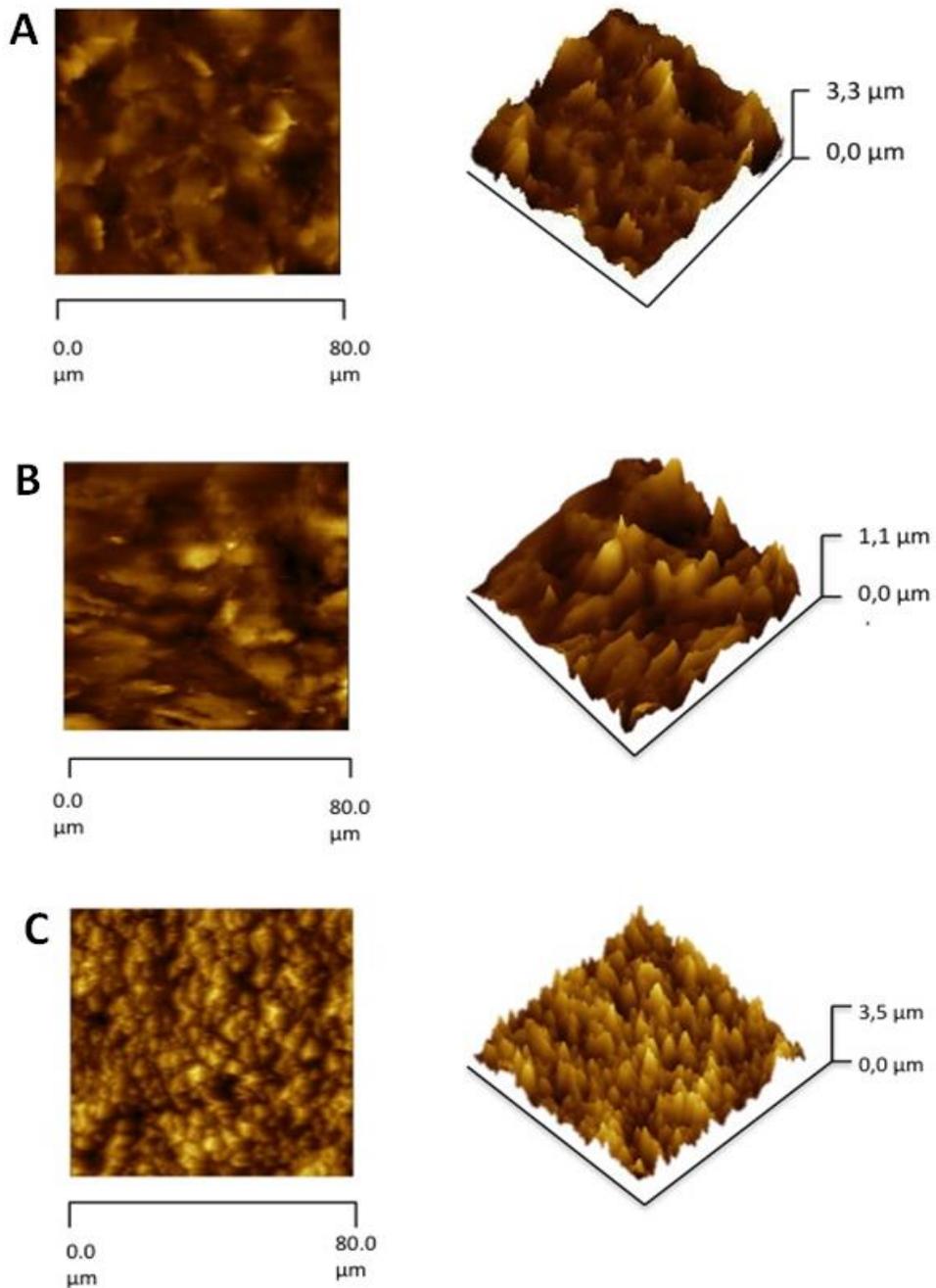


Figura 6.2 – Morfologia da superfície do SPE-C, obtida por AFM, após limpeza (A), após polimerização (B) e após remoção da glucose oxidase (C).

### 6.2.1 Resposta analítica do sensor de glucose oxidase

A resposta da superfície do MIP foi estudada através da avaliação do grau de religação (*rebonding*) da glucose oxidase no filme polimérico. Soluções tampão, contendo uma gama de concentrações de glucose oxidase de  $1 \times 10^{-9}$  g/mol a  $1 \times 10^{-3}$  g/mol e uma concentração constante e equimolar de  $5 \times 10^{-3}$  mol/L de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , foram adicionadas à superfície do eletrodo e ensaios de espectroscopia de impedância foram realizados para monitorizar a forma como a reação redox do par  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ocorre para os diferentes graus de ligação da enzima à superfície do MIP.

As curvas de calibração representam os valores da resistência de transferência de carga, obtidos a partir das representações de Nyquist, em função do logaritmo da concentração de glucose oxidase das soluções adicionadas. Tal como mostra a Figura 6.3, o aumento da concentração de glucose oxidase leva a um aumento da resistência de transferência de carga do sistema.

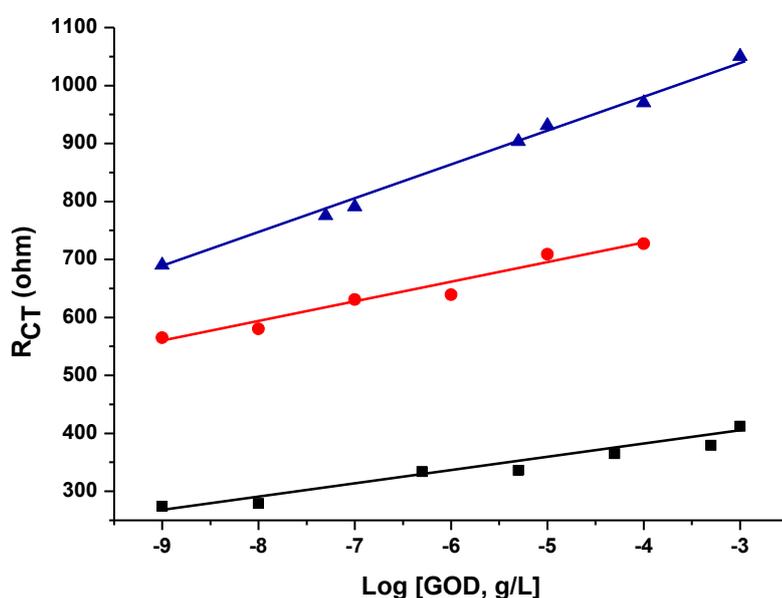


Figura 6.3 – Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) em função das diferentes concentrações de glucose oxidase adicionadas aos filmes poliméricos. Diferentes cores representam as diferentes concentrações de glucose oxidase usada durante a fase de impressão – azul  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL, vermelho  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL e preto  $1 \times 10^{-4}$  mg/mL.

Este aumento é linear – quando representado em função do logaritmo das concentrações – para todas as diferentes superfícies em estudo mas apresenta diferentes sensibilidades (medidas pelo valor dos declives das curvas de calibração) e coeficientes de correlação quando diferentes concentrações de proteína são usadas na fase de impressão. Estes valores estão resumidos na tabela 6.2.

**Tabela 6.2 – Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração a partir da Figura 6.3.**

Concentração de glucose Oxidase usada na fase de impressão (mg/mL)	Declive ( $\Omega$ )	Coefficiente de correlação $R^2$
$1 \times 10^{-4}$	21,6	0,94
$1 \times 10^{-5}$	34,4	0,95
$1 \times 10^{-6}$	60,3	0,99

Com o aumento da concentração, mais moléculas de proteína serão impressas e uma maior área superficial estará disponível, depois da remoção, para que o processo de transferência de carga possa ocorrer. Desta forma os valores de resistência de transferência de carga, determinados por espectroscopia de impedância, vão ser inversamente proporcionais à concentração de proteína usada durante o processo de impressão.

É possível concluir que a eletropolimerização na presença de glucose oxidase com uma concentração de  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL melhora a sensibilidade e a linearidade da resposta do biossensor.

A curva de calibração, obtida para esta concentração de enzima durante a eletropolimerização para o intervalo de concentrações de  $1 \times 10^{-11}$  a  $1 \times 10^{-3}$  g/L pode ser observada na Figura 6.4 e apresenta um coeficiente de correlação de 0,9932.

É possível observar a existência de duas zonas de resposta linear. O limite de detecção do sensor é estimado a partir da análise dos dados, através da intersecção das duas zonas lineares da resposta obtida. [1] O valor obtido foi de  $1,04 \times 10^{-10}$  g/L.

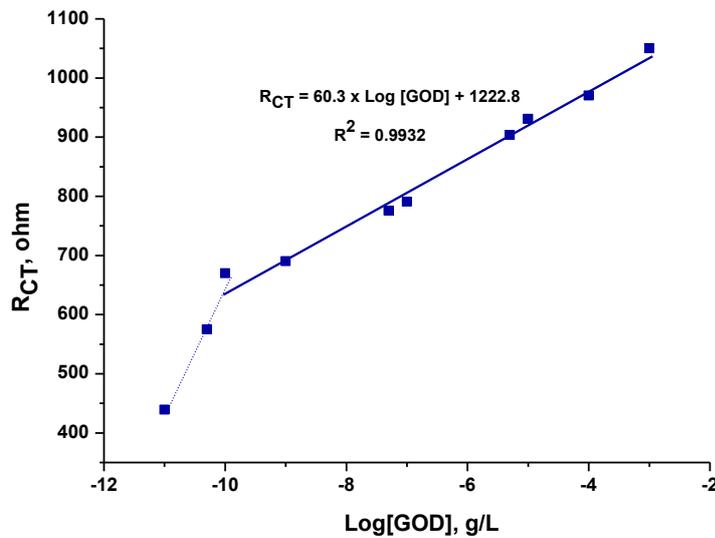


Figura 6.4 – Curva de calibração da glucose oxidase obtida para um intervalo de concentrações de  $1 \times 10^{-11}$  a  $1 \times 10^{-3}$  g/L

### 6.2.2 Afinidade de ligação da glucose oxidase

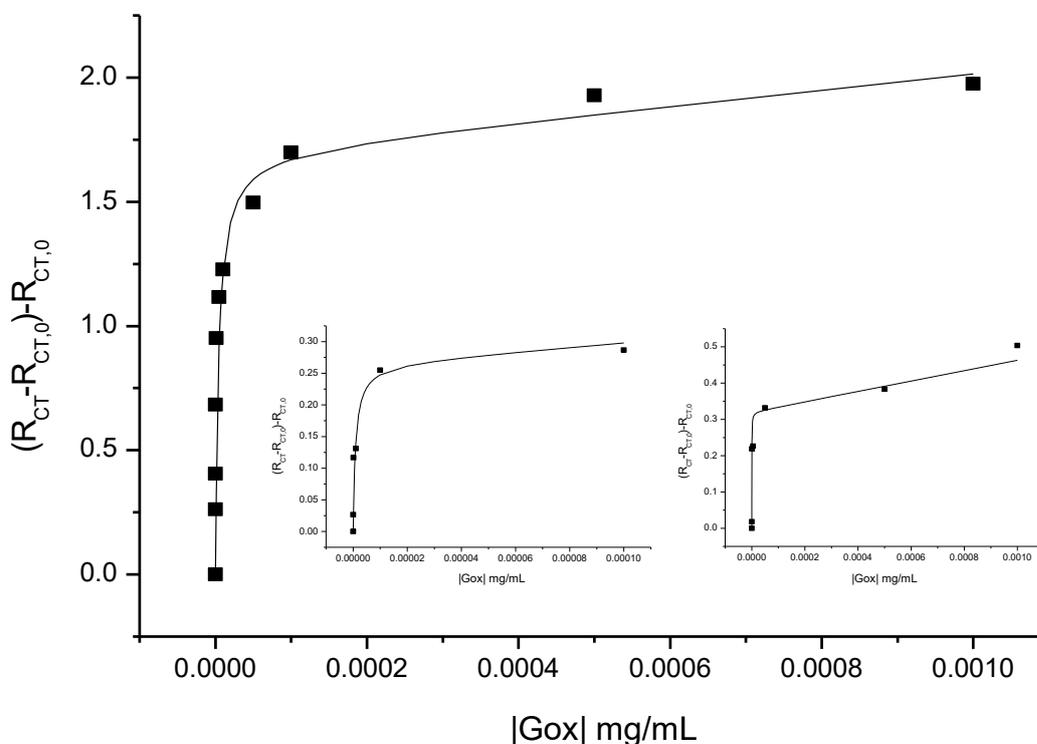
Tal como observado anteriormente, a resposta analítica do sensor está dependente da afinidade de ligação entre a molécula alvo e o MIP. Para medir o grau de afinidade de ligação entre a enzima-alvo e a superfície do MIP, foram estimados os valores da constante de dissociação ( $K_d$ ) e do número máximo de locais de ligação no filme ( $B_{max}$ ). [2]

Para esse fim, foi construída uma isotérmica de ligação da resposta do receptor MIP na presença da enzima, usando um modelo para dois tipos diferentes de ligação simultânea, em sítios de reconhecimento específico dentro do filme polimérico e devido a adsorção não-específica, à superfície do MIP:

$$\frac{R_{CT} - R_{CT.0}}{R_{CT.0}} = \frac{B_{max} \times c}{K_D + c} + N_s.c \quad (\text{Equação 6.1})$$

onde  $c$  é a concentração de enzima no seio da solução e  $N_s$  a constante de ligação para a adsorção não-específica.

Na Figura 6.5 é possível ver o ajuste não linear feito através do *software* Igor Pro e a Tabela 6.3 apresenta os valores das diferentes propriedades de ligação assim como as diferentes condições usadas para obtê-las.



**Figura 6.5 – Isotérmica de ligação entre o recetor MIP e a glucose oxidase, para as diferentes concentrações de enzima usadas na fase de impressão:  $1 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  (inset A) and  $1 \times 10^{-5}$  (inset B). A linha sólida representa o ajuste para ligação específica e não-específica em simultâneo.**

É possível observar que a constante de dissociação aumenta quando se usou uma concentração menor  $1 \times 10^{-6}$  mg/mL de glucose oxidase durante a fase de impressão e o número máximo de locais de ligação também é maior, 1,71, do que para as outras concentrações testadas, 0,26 e 0,32 para  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL e  $1 \times 10^{-4}$  mg/mL, respetivamente.

**Tabela 6.3 – Propriedades de ligação do MIP, constante de dissociação ( $K_D$ ) e número máximo de locais de ligação ( $B_{max}$ ), obtidos a partir das isotérmicas de ligação.**

Recetor (MIP)	Parâmetros de ligação	
	$K_D$	$B_{max}$
<b>Gox</b> <b>1 x 10<sup>-6</sup> mg/mL</b>	4,21 x 10 <sup>-6</sup> mg/mL	1,71
<b>Gox</b> <b>1 x 10<sup>-5</sup> mg/mL</b>	8,99x 10 <sup>-7</sup> mg/mL	0,26
<b>Gox</b> <b>1 x 10<sup>-4</sup> mg/mL</b>	2,90 x 10 <sup>-7</sup> mg/mL	0,32

No elétrodo NIP não há alterações significativas nos dados de espectroscopia de impedância obtidos para as diferentes soluções de re-ligação de glucose oxidase. Devido à falta de resposta linear obtida no caso do NIP não foi possível efectuar o estudo sobre a afinidade de ligação.

### 6.2.3 Estudo de interferentes

Com o objetivo de avaliar a performance do biosensor, um estudo de interferentes foi realizado. Um dos possíveis problemas da resposta analítica do sensor seria o surgimento de falsos positivos na presença de outras proteínas na solução em análise, em particular a presença de outras enzimas. Bem como a presença de compostos de baixo peso molecular.

Como espécies interferentes foram escolhidas, a Mioglobina como modelo de uma proteína globular, a Amilase como enzima e a glucose como composto de baixo peso molecular.

Medições de espectroscopia de impedância eletroquímica, com soluções de diferentes concentrações de Mioglobina, Amilase e glucose, juntamente com o par redox hexacianoferrato, foram realizadas.

Os resultados obtidos para a Mioglobina mostram não haver alterações significativas na resistência de transferência de carga da superfície do biossensor, o que parece indicar que a superfície do MIP não reconhece esta

proteína. Para além disso, não é visível nenhum efeito de adsorção das proteínas à superfície, que poderia bloquear o acesso ao eléctrodo, levando a um aumento da resistência de transferência de carga à sua superfície.

O mesmo estudo foi realizado com diferentes concentrações da enzima Amilase e de glucose. Tal como observado para a Mioglobina, não é produzida nenhuma alteração na resposta por parte do receptor.

Estes resultados são apresentados na Figura 6.6 e sugerem a elevada especificidade da superfície criada através do método de impressão molecular proposto.

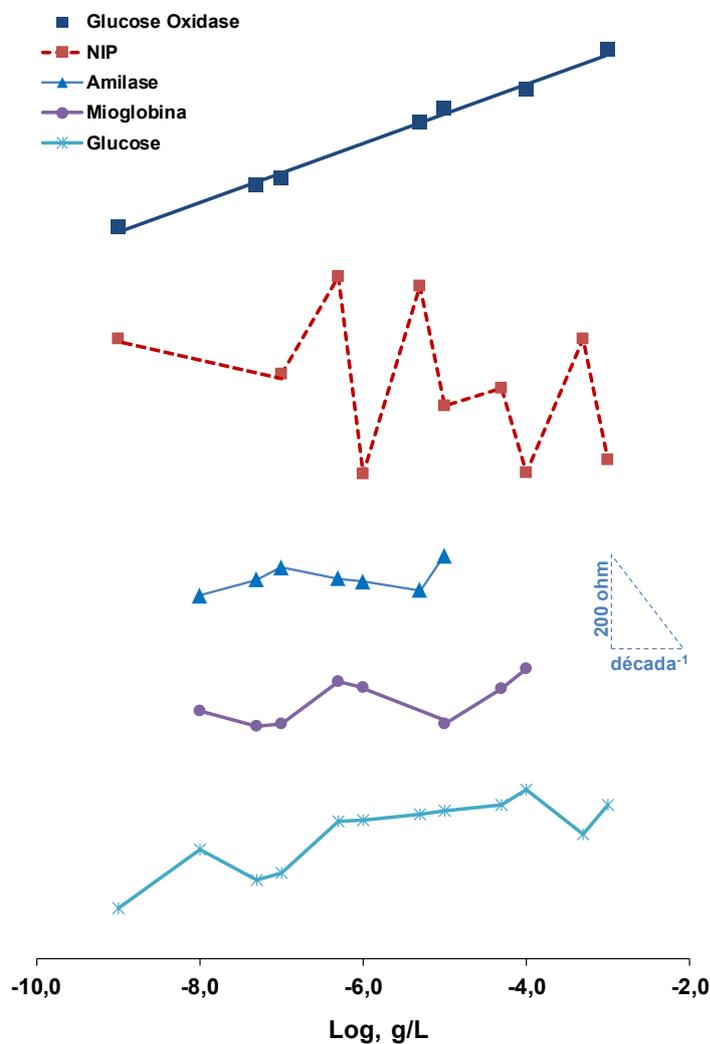


Figura 6.6 - Curvas de calibração da resistência de transferência de carga (R<sub>CT</sub>) em função das diferentes concentrações de glucose oxidase e dos interferentes em estudo, glucose, amilase e mioglobina.

### 6.2.4 Aplicação em ensaios de recuperação

O biossensor foi usado na determinação da concentração de glucose oxidase em soluções tampão PBS de 1 mol/L (pH 7). Para o efeito, foram adicionados incrementos de Glucose oxidase, a soluções tampão PBS, de forma a obter solução de concentração variável entre  $6,5 \times 10^{-9}$  e  $3,5 \times 10^{-4}$  g/L. Foram preparadas cinco soluções diferentes e os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 6.4.

**Tabela 6.4 – Determinação da concentração de glucose oxidase em solução tampão. Ensaios de recuperação.**

Amostra	Gox (mg/mL)	Concentração obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Erro relativo (%)
1	$6,5 \times 10^{-9}$	$6,8 \times 10^{-9}$	95,3	-4,9
2	$9,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-7}$	93,6	-6,8
3	$2,5 \times 10^{-7}$	$2,2 \times 10^{-7}$	113,9	12,2
4	$7,5 \times 10^{-6}$	$8,5 \times 10^{-6}$	87,9	-13,7
5	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,9 \times 10^{-4}$	117,6	15,0

Foi obtida uma boa concordância entre a concentração de glucose oxidase adicionada e medida com o biossensor. A percentagem de recuperação varia entre 87,9 e 117,6% com um erro relativo médio de 10,5%.

Os resultados obtidos mostram que a construção do sensor foi bem sucedida.

### 6.3 Biossensor de Amilase

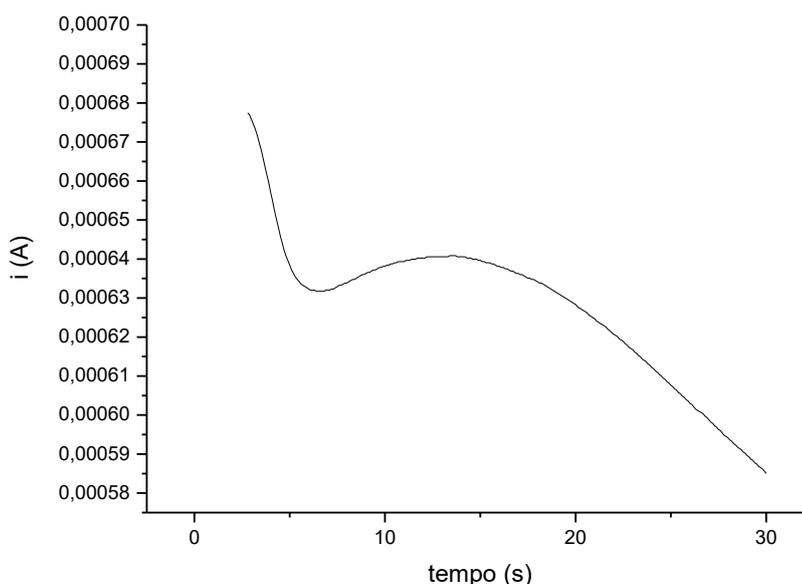
A construção dos filmes MIP foi realizada, nas condições usadas para o sensor de glucose oxidase e descritas no capítulo 4, através da eletropolimerização do ácido cafeico na presença de diferentes quantidades de amilase à superfície do eléctrodo de carbono. Com base nos resultados obtidos na preparação e caracterização do sensor para a glucose oxidase, na preparação do sensor de

amílase apenas foram usadas duas concentrações, resumidas na Tabela 6.5, foram usadas para a síntese do polímero.

Foram, também, mantidas as condições de eletropolimerização do ácido cafeico, descritas para a preparação do sensor de glucose oxidase, no sub-capítulo 6.2. O cronoamperograma obtido durante a electrodeposição do ácido cafeico e da amilase estão representados na Figura 6.7.

**Tabela 6.5 – Diferentes concentrações da enzima usadas para a construção dos sensores por impressão molecular.**

Biossensor enzimático	Concentração usada na impressão (mg/ml)
Amilase	$1.0 \times 10^{-6}$
	$1.0 \times 10^{-5}$



**Figura 6.7 – Cronoamperograma obtido durante a electrodeposição do ácido cafeico e da amilase na superfície do SPE de carbono, a 2V durante 30 segundos.**

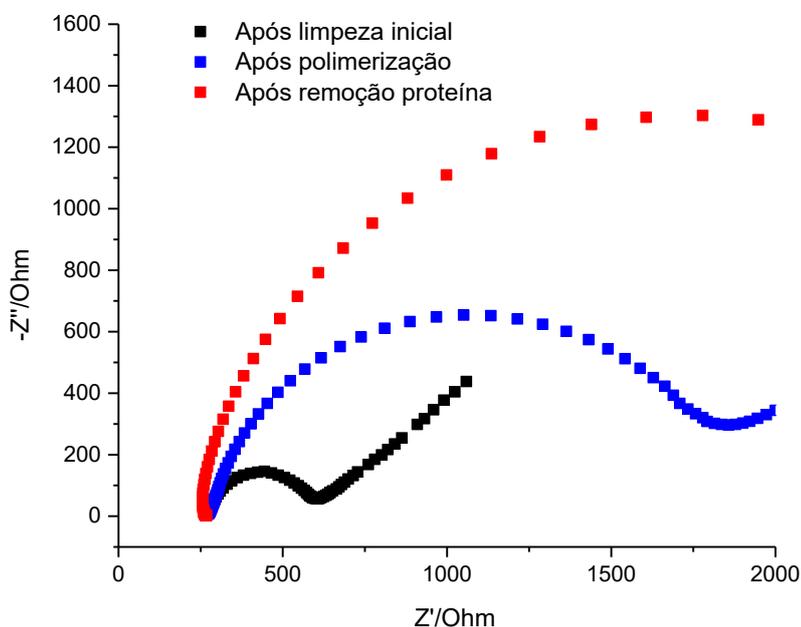
O pico inicial de corrente corresponde à carga da dupla camada, durante a formação do filme polimérico. Após 7 segundos há uma diminuição da corrente e a formação de um pico mais largo com uma intensidade de corrente mais

baixa que indica que o processo de eletropolimerização está limitado pela difusão dos reagentes.

Por análise da área de integração do cronoamperograma, e através do mesmo método referido no capítulo anterior (equação 5.1) foi possível estimar em 11,7 nm a espessura do filme de ácido cafeico e amilase depositada eletroquimicamente à superfície do eletrodo. [3, 4]

O processo de remoção da enzima, por incubação em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e a monitorização de todo o processo de construção da membrana foi acompanhada por espectroscopia de impedância electroquímica, tal como descrito no capítulo anterior e já realizados para o biossensor de glucose oxidase.

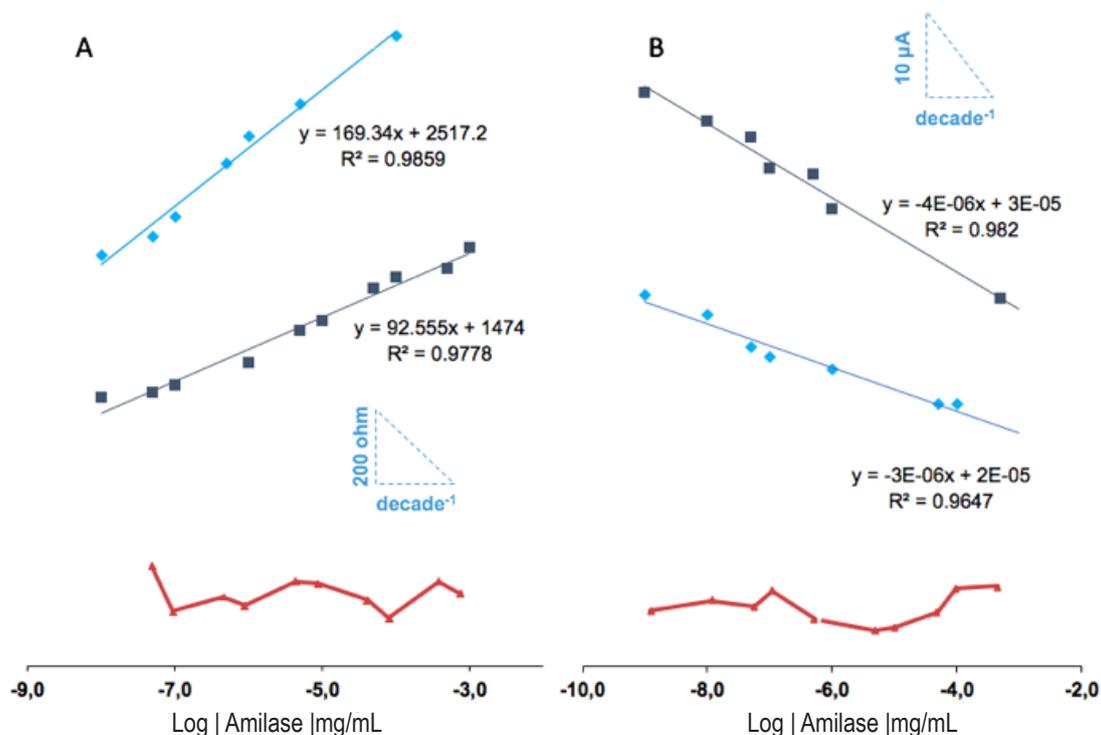
Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 6.8 e mostram o diagrama de impedâncias obtidos quando estudamos a superfície de carbono limpa (preto), após a polimerização (azul) e após a remoção da proteína (vermelho).



**Figura 6.8 – Diagramas de Nyquist de impedância eletroquímica obtidos depois dos diferentes estágios da preparação do MIP. Depois da limpeza inicial (preto), depois da polimerização (vermelho) e depois do processo de remoção proteica (azul), para a construção de um biossensor de amilase.**

### 6.3.1 Resposta analítica do sensor de Amilase

A resposta analítica da superfície do MIP foi, também, estudada através da avaliação do grau de religação da amilase no filme polimérico. Soluções tampão, contendo diferentes concentrações de amilase, de  $1 \times 10^{-9}$  g/mL a  $1 \times 10^{-3}$  g/mL e uma concentração constante de  $(5 \times 10^{-3}$  mol/L) de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , foram adicionadas à superfície do eletrodo e ensaios de espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria de onda quadrada foram realizados para monitorizar a forma como a reação redox do par  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ocorre para os diferentes graus de ligação da enzima à superfície do MIP.



**Figura 6.9. - Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) – A – e intensidade de corrente de pico – B – em função das diferentes concentrações de amilase adicionadas aos filmes poliméricos. A azul as diferentes concentrações de amilase usadas na fase de impressão ( $1 \times 10^{-6}$  mg/mL– azul escuro e  $1 \times 10^{-5}$  mg/mL – azul claro) e a vermelho a calibração do NIP.**

As curvas de calibração representam os valores da resistência de transferência de carga, obtidos a partir da das representações de Nyquist, em função do logaritmo das concentrações de amilase das soluções adicionadas. Tal

como mostra a Figura 6.9, o aumento da concentração de amilase leva a um aumento da resistência de transferência de carga do sistema – visível nos resultados obtidos por espectroscopia de impedância (A) - e a uma diminuição da intensidade de corrente de pico da reação redox em estudo – visível nos resultados obtidos por voltametria de onda quadrada (B).

Este aumento da intensidade de corrente de pico é linear – quando representado em função do logaritmo da concentração – para as diferentes superfícies em estudo mas apresenta diferentes sensibilidades (medidas por valores de declive) e coeficientes de correlação quando diferentes concentrações de proteína são usadas na fase de impressão. Estes valores estão resumidos na tabela 6.6.

**Tabela 6.6 – Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração apresentadas na Figura 6.9.**

<b>Técnica Analítica</b>	<b>Concentração de Amilase usada na fase de impressão molecular (mg/mL)</b>	<b>Declive (A e Ω)</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>
EIS	$1 \times 10^{-6}$	92,6	0,978
	$1 \times 10^{-5}$	169,3	0,986
SWV	$1 \times 10^{-6}$	$-4,0 \times 10^{-6}$	0,982
	$1 \times 10^{-5}$	$-3,0 \times 10^{-6}$	0,965

### 6.3.2 Afinidade de ligação da Amilase

Assim como para a glucose oxidase, também para a amilase foi estudada a afinidade de ligação entre a molécula-alvo e a superfície do MIP criado, através da estimativa os valores da constante de dissociação ( $K_d$ ) e do número máximo de locais de ligação no filme ( $B_{max}$ ). [2]

A isotérmica de ligação foi da mesma forma construída usando o modelo que contempla os dois tipos diferentes de ligação simultânea, em sítios de reconhecimento específico dentro do filme polimérico e devido a adsorção não-específica, à superfície do MIP (Equação 6.1)

$$\frac{R_{CT} - R_{CT.0}}{R_{CT.0}} = \frac{B_{max} \times c}{K_D + c} + Ns \times c \quad \text{(Equação 6.1)}$$

Na Figura 6.10 é possível ver o ajuste não linear feito através do *software* Igor Pro e a tabela 6.7 apresenta os valores das diferentes propriedades de ligação assim como as diferentes condições usadas para obtê-las.

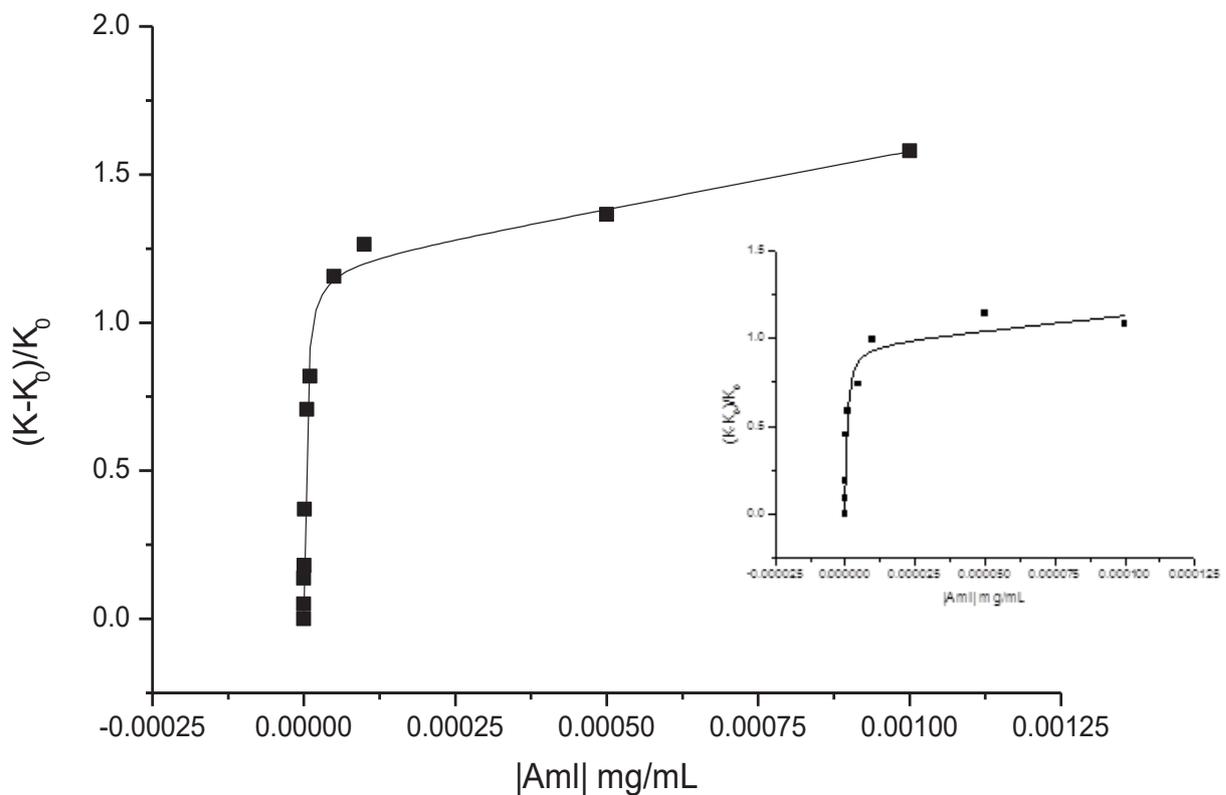


Figura 6.10 – Isotérmica de ligação entre o recetor MIP e a amilase, para as diferentes concentrações de enzima usadas na fase de impressão: 1 x 10<sup>-6</sup>, 1 x 10<sup>-5</sup> (inset). A linha sólida representa o ajuste para ligação específica e não-específica em simultâneo.

Tabela 6.7 – Propriedades de ligação do MIP, constante de dissociação (K<sub>D</sub>) e número máximo de locais de ligação (B<sub>max</sub>), obtidos a partir das isotérmicas de ligação.

Recetor (MIP)	Parâmetros de ligação	
	K <sub>D</sub> (mg/mL)	B <sub>max</sub>
Amilase 1 x 10 <sup>-6</sup> mg/mL	3,19x10 <sup>-6</sup>	1,20
Amilase 1 x 10 <sup>-5</sup> mg/mL	6,24x10 <sup>-7</sup>	0,97

É possível observar uma diminuição da constante de dissociação e um aumento no número máximo de ligações para a concentração mais baixa de amilase.

Os valores de ambos os parâmetros ligação obtidos para o sensor de amilase são semelhantes aos obtidos, e já apresentados, para o sensor de glucose oxidase. No entanto no caso da glucose oxidase a diferença entre os valores obtidos para as diferentes concentrações era maior do que a que podemos observar para a amilase.

#### **6.3.4 Aplicação em ensaios com amostras reais**

A enzima alfa-amilase pode ser encontrada na saliva humana, sendo a sua libertação controlada pelo sistema nervoso simpático e variável com factores de stress interno e externo, como desregulações metabólicas, dor crónica, temperatura ou prática de exercício físico. [5-7] No entanto os seus níveis são bastante dependentes do metabolismo interno individual.

O sensor de amilase construído foi também testado com uma solução obtida a partir de uma amostra real de saliva à qual foram acrescentadas adições-padrão de amilase comercial.

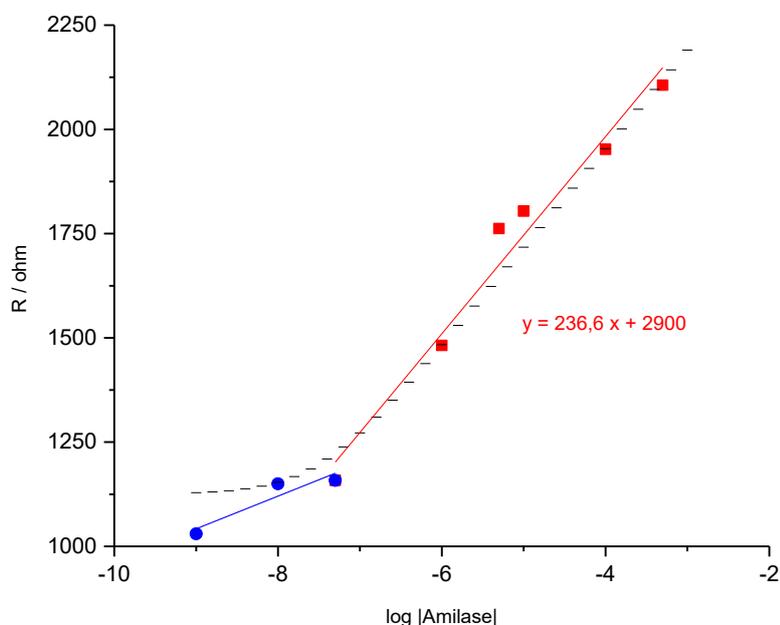
A solução de amilase foi diluída em tampão fosfato e foram preparadas diferentes soluções por adição de padrões com concentrações variáveis entre  $1 \times 10^{-9}$  mg/mL e  $1 \times 10^{-3}$  mg/mL.

Os resultados obtidos podem ser observados, a azul e a vermelho, na Figura 6.11.

A análise dos resultados sugere a existência de duas zonas lineares distintas que se cruzam a uma concentração aproximada de  $1 \times 10^{-7,5}$  mg/mL. Esse foi o valor estimado para a concentração de amilase presente na amostra de saliva.

Usando esse valor estimado e a regressão linear obtida a partir dos ensaios reais da zona linear correspondente às concentrações mais elevadas – cujos

valores se encontram resumidos na Tabela 6.8 – foi simulada uma nova curva de calibração com as concentrações de amilase corrigidas e o resultado obtido pode ser também observado na Figura 6.11, a preto.



**Figura 6.11 - Curvas de calibração da resistência de transferência de carga ( $R_{CT}$ ) em função das diferentes concentrações de amilase, na presença de amostras reais de saliva. Simulação da curva de calibração para uma adição de saliva com  $|amilase| = 1 \times 10^{-7,5}$  mg/mL.**

**Tabela 6.8 – Sumário dos dados obtidos a partir da regressão linear da curva de calibração apresentada na Figura 6.11.**

Soluções padrão de amilase com adição de amostra de saliva	Declive	Interseção com o eixo dos yy	Coefficiente de correlação
	236,6	2900	0.972

## 6.4 Bibliografia

1. R.P. Buck, E.L., *Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC Recommendations 1994)* Pure and Applied Chemistry, 1994. **66**: p. 2527-2536.
2. Karimian, N., A.P.F. Turner, and A. Tiwari, *Electrochemical evaluation of troponin T imprinted polymer receptor*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. **59**(0): p. 160-165.
3. Panasyuk, T.L., et al., *Electropolymerized Molecularly Imprinted Polymers as Receptor Layers in Capacitive Chemical Sensors*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(20): p. 4609-4613.
4. Liao, H., et al., *Preparation of the molecularly imprinted polymers-based capacitive sensor specific for tegafur and its characterization by electrochemical impedance and piezoelectric quartz crystal microbalance*. Electrochimica Acta, 2004. **49**(24): p. 4101-4107.
5. Yorbik, O., et al., *Salivary alpha amylase levels in youths with anxiety disorders*. Psychiatry Research.
6. Shirasaki, S., et al., *Correlation Between Salivary  $\alpha$ -Amylase Activity and Pain Scale in Patients With Chronic Pain*. Regional Anesthesia and Pain Medicine, 2007. **32**(2): p. 120-123.
7. Nater, U.M. and N. Rohleder, *Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research*. Psychoneuroendocrinology, 2009. **34**(4): p. 486-496.

## **7. Considerações Finais**

O objetivo inicial deste trabalho de doutoramento era a síntese de materiais compósitos contendo nanopartículas de ouro e um polímero condutor, a polianilina, que pudessem ser introduzidos em eléctrodos de carbono de forma a melhorar o desempenho dos biossensores. A primeira fase de síntese destes compostos foi bem sucedida, como demonstram os resultados apresentados no capítulo 2. desta tese. No entanto, quando foram utilizados como modificante em superfícies de carbono, juntamente com a enzima glucose oxidase, e testados como sensor eletroquímico de glucose, os resultados obtidos não revelaram uma alteração significativa no comportamento do biossensor – nomeadamente melhorias a nível dos limites de detecção ou da gama de linearidade - e novas estratégias de construção tiveram de ser repensadas.

A percepção de que existe uma crescente utilização de enzimas na indústria alimentar e que não existem métodos expeditos e económicos para a determinação das enzimas, juntamente com a experiência que o grupo começou a adquirir na preparação de eléctrodos molecularmente impressos, levou a um ajuste do objectivo inicial.

Deste forma surge o trabalho principal desta tese, a preparação e caracterização de polímeros molecularmente impressos e o seu uso como biossensor enzimático.

Um novo polímero, preparado electroquimicamente a partir do ácido cafeico foi usado para a construção da rede polimérica em que as enzimas (glucose oxidase e amilase) foram incorporadas. As características electroquímicas da construção do filme foram estudadas de forma detalhada, foram determinados os parâmetros ótimos de construção dos filmes e numa fase posterior os filmes molecularmente impressos obtidos foram utilizados para a determinação electroquímica das enzimas em estudo, e a sua resposta analítica foi analisada. Os resultados permitem perceber que os biossensores construídos oferecem uma resposta sensível e seletiva à presença das enzimas, com limites de detecção de  $1,04 \times 10^{-10}$  g/L para a glucose oxidase. Foram determinadas as constantes de dissociação da ligação enzima-biossensor e os valores obtidos mostram uma boa interação.

Foram ainda testadas a determinação de uma série de interferentes de diferentes tamanhos e características e a seletividade do sensor construído é bastante elevada.

A construção destes MIPs é importante para o desenvolvimento deste tipo de sensores uma vez que é ainda escassa a literatura que revela este tipo de detecção eletroquímica para moléculas tão complexas quanto enzimas. Quando comparadas com outros métodos bioquímicos, como os ensaios ELISA e outras interações anticorpo-antígeno, os MIPs com detecção eletroquímica permitem a possibilidade de desenhar biossensores muito mais rápidos, baratos, com uma elevada facilidade de miniaturização e automatização do processo de quantificação, características preciosas em áreas como a medicina, ambiental ou indústrias alimentares.

Um dos principais problemas detetados ao longo de todo este trabalho é a baixa reprodutibilidade da formação dos filmes poliméricos – o que vai necessariamente trazer variabilidade no desempenho final do biossensor. As condições aplicadas à síntese dos filmes foram sempre as mesmas, pelo que os motivos desta baixa reprodutibilidade não estão ainda totalmente entendidos. No entanto, o facto de estarmos na presença de espessuras de polímero muito baixas, volumes muito pequenos de solução de trabalho e o uso de atmosfera aberta sem controle de temperatura poderá estar na origem de parte destes problemas, já que o sistema poderá ser muito sensível a qualquer variação ambiental.

Este foi o principal problema detectado ao longo do trabalho e desta forma a principal preocupação para um trabalho futuro. Seria desejável conseguir termostatar e confinar os *screen printed electrodes* de forma a controlar a temperatura do sistema, conseguir manter um fluxo de oxigénio constante e evitar perdas de volume de solução.

Outro passo mais à frente no desenvolvimento deste projeto seria a incorporação dos nanocompósitos estudados na construção dos polímeros molecularmente impressos para quantificação de enzimas.

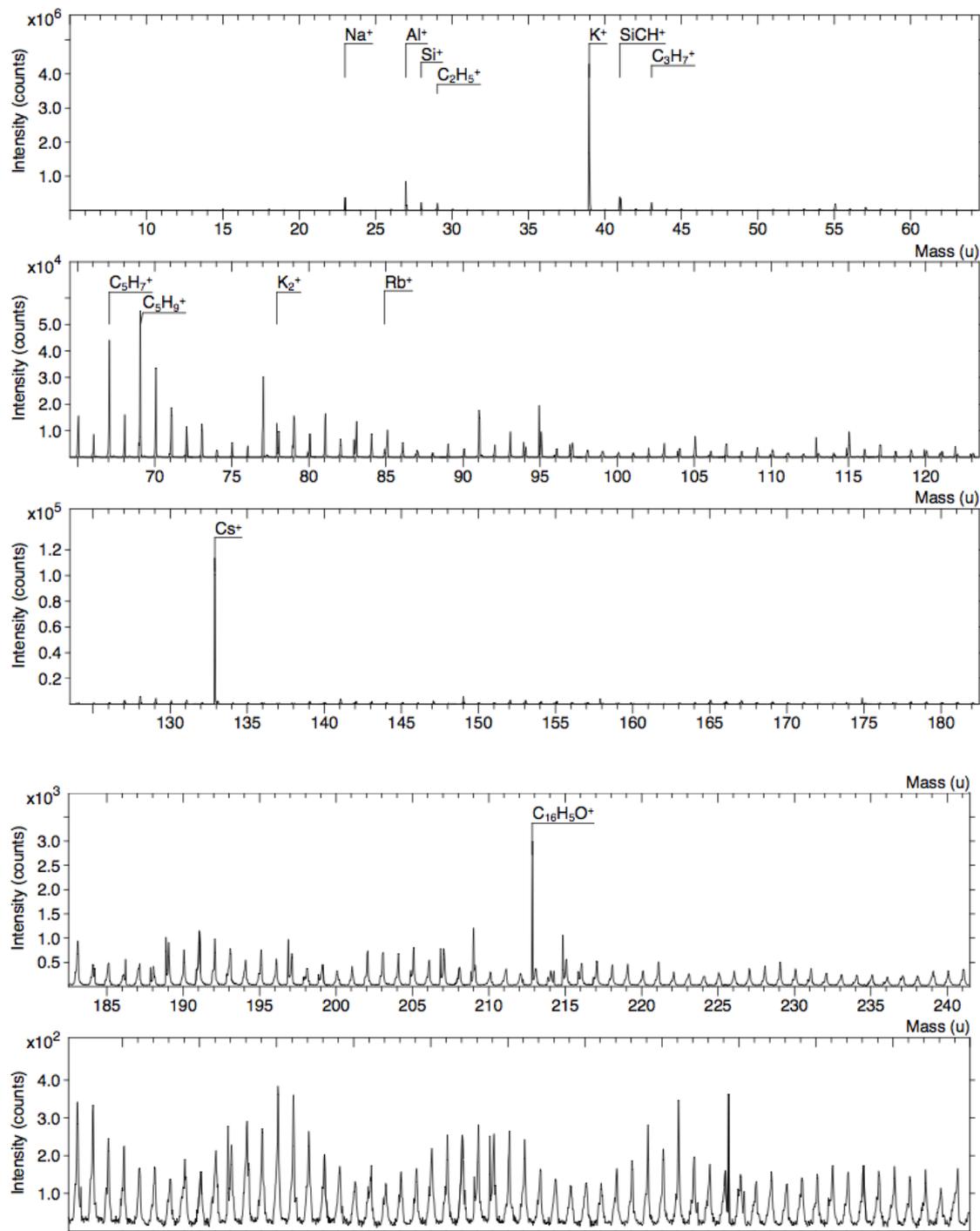
Seria interessante avaliar a prestação da polianilina como polímero molecularmente impresso e o efeito que a incorporação das nanopartículas de ouro na cadeia polimérica poderiam trazer ao sistema.

**Anexos**

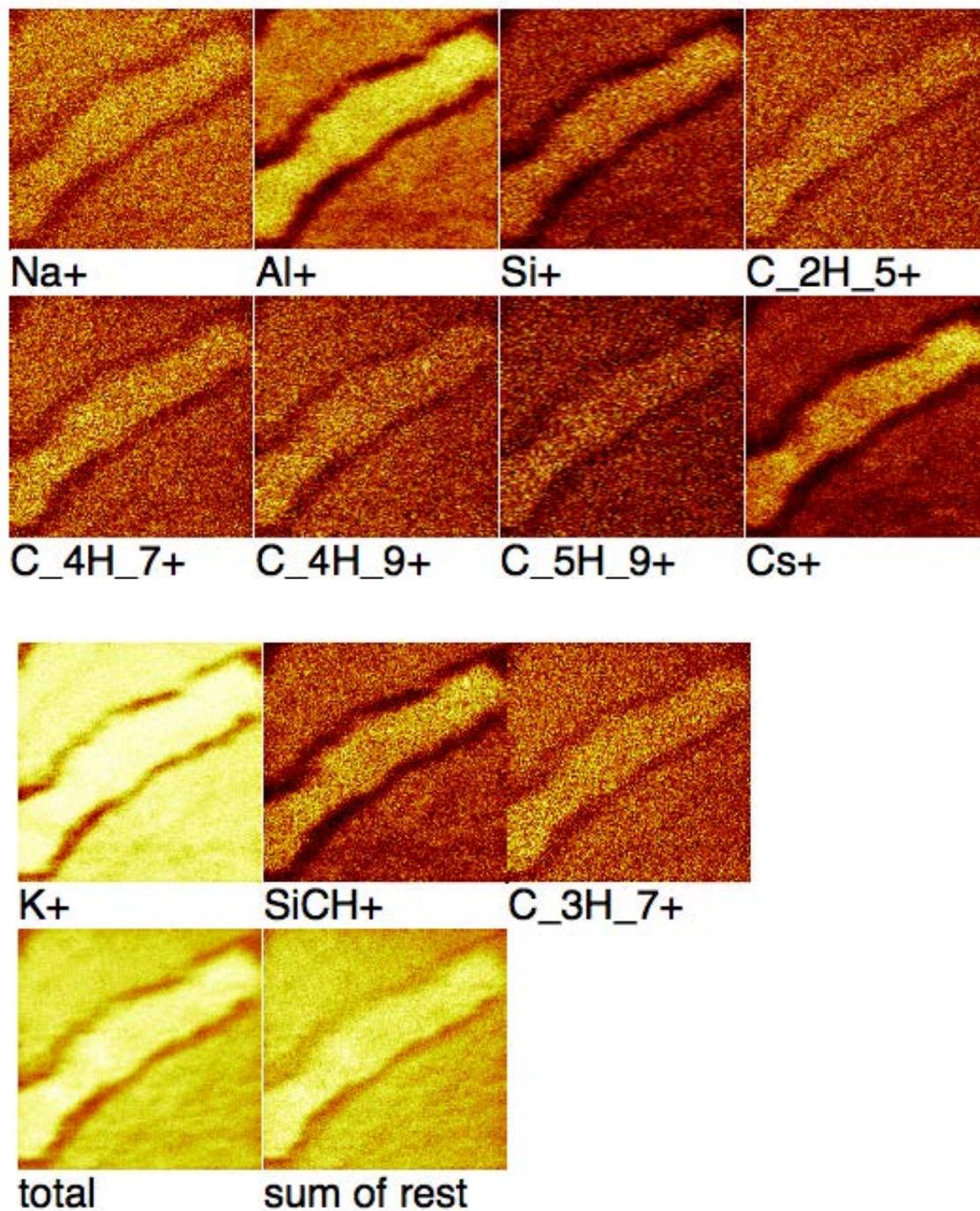
## Resultados obtidos na Universidade Comenius em Bratislava

### Espectroscopia de massa de iões secundários

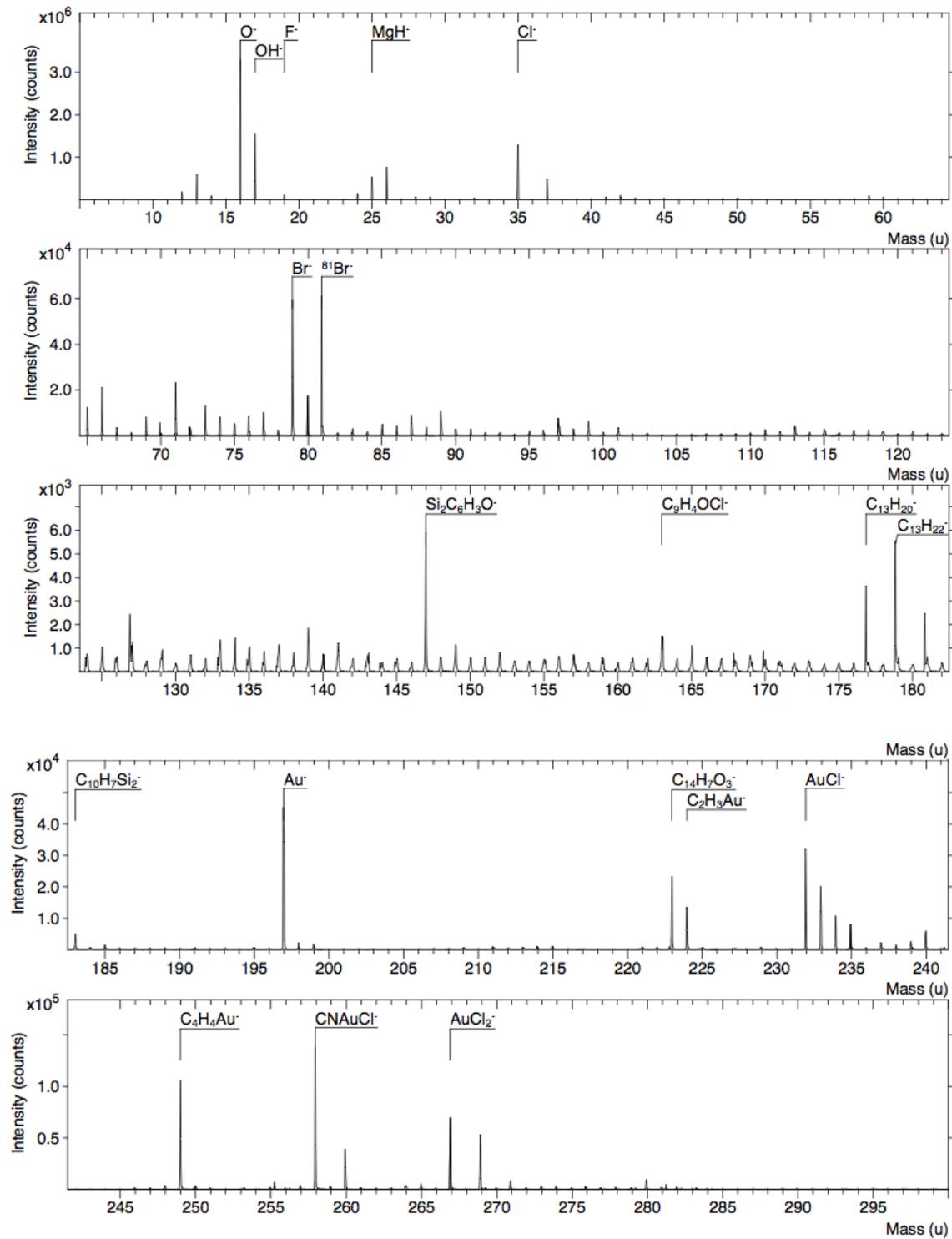
Espectros de emissão obtidos, e a respetiva análise elemental, em amostras de mica modificada com PANI.



Mapas de superfície dos elementos de interesse detetados, em amostras de mica modificada com PANI – 250x250  $\mu\text{m}$ .



Espectros de emissão obtidos, e a respectiva análise elemental, em amostras de mica modificada com PANI+AuNPs.



Mapas de superfície dos elementos de interesse detetados, em amostras de mica modificada com PANI+AuNPs - 250x250  $\mu\text{m}$ .

