



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento e caracterização de copolímeros produzidos a partir dos monômeros anilina e 4-aminofenol para aplicação em plataforma de biossensores

Aluno: Ariadne Fernandes Lacerda

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro

UBERLÂNDIA - MG 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Desenvolvimento e caracterização de copolímeros produzidos a partir dos monômeros anilina e 4-aminofenol para aplicação em plataforma de biossensores

Aluno: Ariadne Fernandes Lacerda

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química.

UBERLÂNDIA – MG 2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

L131 Lacerda, Ariadne Fernandes, 1996-
2020 Desenvolvimento e caracterização de copolímeros produzidos a partir dos monômeros anilina e 4-aminofenol para aplicação em plataforma de biossensores [recurso eletrônico] / Ariadne Fernandes Lacerda. - 2020.

Orientador: João Marcos Madurro.

Coorientadora: Ana Graci Brito-Madurro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.315>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. I. Madurro, João Marcos, 1961-, (Orient.). II. Brito-Madurro, Ana Graci, 1967-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP
38400-902
Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 314, PPGQUI				
Data:	vinte e oito de fevereiro de de dois mil e vinte	Hora de início:	14:00 h	Hora de encerramento:	17:45 h
Matrícula do Discente:	11812QMI003				
Nome do Discente:	Ariadne Fernandes Lacerda				
Título do Trabalho:	Desenvolvimento e caracterização de copolímeros preparados a partir dos monômeros anilina e 4-aminofenol para aplicação em plataforma de biossensores				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Eletroquímica Aplicada				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Desenvolvimento de biossensores para detecção de doenças				

Reuniu-se no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones , Campus Santa Mônica, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta: Professores Doutores: Valéria Almeida Alves, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro; Celso de Oliveira Rezende Júnior, da Universidade Federal de Uberlândia e João Marcos Madurro orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. João Marcos Madurro, apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **João Marcos Madurro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/03/2020, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celso de Oliveira Rezende Júnior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/03/2020, às 21:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Valéria Almeida Alves, Usuário Externo**, em 02/03/2020, às 18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1893910** e o código CRC **79152FCD**.

No caminho é que se vê
A praia melhor pra ficar

(Nação Zumbi)

Quem cultiva a semente do amor
Segue em frente e não se apavora
Se na vida encontrar dissabor
Vai saber esperar a sua hora

(Grupo Revelação)

Agradecimentos

A mim mesma que construí esse trabalho apesar de todas as dificuldades e dos momentos de raiva e frustração.

Aos meus pais Níria Maria Martins Fernandes e Antônio Júlio de Lacerda e por todo amor e suporte prestado nesses dois anos. A minha irmã Iris Fernandes Lacerda, pela maior amizade que eu poderia ter. A minha tia Nilma aparecida Fernandes pelo amor, incentivo e cuidado. Meus cachorros Cli e Gaia e meu coelho Valter. A toda minha família e pessoas que cruzaram minha vida e me fizeram ser quem eu sou.

A minha amiga e companheira de casa Letícia Mara Teixeira, por todos os momentos – bons e ruins – que passamos, vivemos e superamos juntas. Aos meus cachorros Robinho e Kiara.

Aos meus amigos da química – Gragas, Ale, Samuel, Ronaldo – e aos meus amigos da filosofia – Malu, Kubo, Pedroca, Ian, André – pelas conversas, suporte e amizade que foram muito importantes pra mim.

Aos meus amigos de Franca – Éder, Iza, Letícia, Thayna, Sarah – por todos esses anos de amizade e memórias.

Aos meus amigos e colegas de trabalho do LAFIP/BIOSENS – Mônica, Pedro, José, Anna, Luiz, Rafaela, Dayane, Zuffi, Jéssica, Bárbara – pela companhia e por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador João Marcos Madurro pela paciência e por todos os ensinamentos acrescentados a minha formação. A professora Ana Graci, pela co-orientação.

Ao Laboratório Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pela análise de imagens e ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT), um grupo de pesquisa apoiado pela FAPEMIG (APQ-00330-14), pelas análises do FTIR.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEMIG.

À banca examinadora pela disponibilidade e pela contribuição.

Índice de equações

Equação 1 20

Equação 2 20

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura de alguns polímeros condutores.	3
Figura 2: Esquema geral de uma polimerização eletroquímica.....	4
Figura 3: Estrutura molecular da anilina, monômero da polianilina	5
Figura 4: Estrutura molecular da polianilina.	6
Figura 5: Diferentes formas da polianilina	6
Figura 6: Formação do cátion radical e suas estruturas de ressonância	7
Figura 7: Mecanismo de polimerização oxidativa da anilina.....	8
Figura 8: Estrutura molecular do 4-aminofenol	9
Figura 9: Reação de eletro-oxidação do 4-aminofenol.....	10
Figura 10: Proposta de mecanismo para a polimerização do 4-aminofenol.....	11
Figura 11: Classificação dos copolímeros	12
<i>Figura 12: Número de publicações com termo “biosensor” de 1996 a 2019 na plataforma sciencedirect</i>	<i>14</i>
Figura 13: Configuração esquemática de um biossensor	15
Figura 14: Formas de aplicação do potencial para os dois tipos de voltametria	22
Figura 15: Esquema de um genossensor	23
Figura 16: Estrutura do brometo de etídio.....	23
Figura 17: Potenciostato CH instruments modelo 760C.	27
Figura 18: Ilustração esquemática da célula de três compartimentos com (a) eletrodo auxiliar de platina, (b) eletrodo de trabalho de grafite e (c) eletrodo de referência de Ag/AgCl	27
Figura 19: Eletrodo auxiliar de platina (b) e eletrodo de referência de Ag/AgCl (a).....	28
Figura 20: Preparação dos eletrodos artesanais.....	29
Figura 21 Eletrodos de grafite devidamente preparados acoplados a uma base condutora de latão.....	29
Figura 22: Espectrofotômetro FT-IR FRONTIER SINGLE RANGE - MIR da Perkin Elmer	31
Figura 23: MEV TESCAN modelo VEGA3 LMU (a) e revestidor de pulverização quorum 150 R (b)	32
Figura 24: Processo de preparo do eletrodo para detecção direta da sonda	33
Figura 25: Processo de preparo do eletrodo para detecção direta da sonda/alvo	34
Figura 26: Processo de preparo do eletrodo para detecção indireta da sonda e sonda/alvo	35

Figura 27: Exemplos de voltamogramas cíclicos apto para uso (a) e não apto (b) dos EG em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$), velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	36
Figura 28: Eletropolimerização da anilina, em concentração $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, 10 ciclos de varredura e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	37
Figura 29: Eletropolimerização de 4-aminofenol, em concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos de varredura de potencial, 50 mV s^{-1}	38
Figura 30: Eletropolimerização do copolímero 1, em concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dos monômeros, em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos de varredura de potencial, 50 mV s^{-1}	39
Figura 31: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} do eletrodo de grafite modificado com o copolímero 1 e os eletrodos de grafite modificados com a polianilina e o poli(4-aminofenol).	40
Figura 32 Últimos ciclos voltamétricos dos EG contendo do eletrodo de grafite modificado com o copolímero 1 e os eletrodos de grafite modificados com a polianilina e o poli(4-aminofenol), em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, 50 mv s^{-1}	41
Figura 33: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (vide Tabela 1).	43
Figura 34: Últimos ciclos voltamétricos dos EG contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polimerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1}	44
Figura 35: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 3, 4, e 5.	45
Figura 36: Voltamogramas de polimerização da etapa 1 – a) - e etapa 2 – b1, b2 e b3, dos copolímeros de número 3, 4 e 5, respectivamente.	46
Figura 37: Voltamograma de polimerização do copolímero 2.	47
Figura 38: Voltamogramas de polimerização do copolímero 6.	48
Figura 39: Espectro de infravermelho para polianilina (a) e poli(4-aminofenol) (b).	49
Figura 40: Espectro de infravermelho para os copolímeros poli(anilina-4-aminofenol), sendo copolímero 1 (a), copolímero 2 (b), copolímero 3 (c), copolímero 4 (d), copolímero 5 (e) e copolímero 6 (f).	51

Figura 41: Proposta de mecanismo para a formação do dímero entre os cátions radicais dos monômeros anilina e 4-aminofenol via acoplamento anel/anel e acoplamento anel/heteroátomo.	53
Figura 42: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para EG/polianilina (A), EG/poli(4-aminofenol) (B).	54
Figura 43: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para os copolímeros 3 (A), 4 (B) e 5 (C)	55
Figura 44: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para os copolímeros 1 (A), 2 (B) e 6 (C)	56
Figura 45: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ , 50mV s ⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 1, 2 e 6 e dos eletrodos de grafite modificados com o poli(4-aminofenol) e a polianilina.	57
Figura 46: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ , 50mV s ⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 3, 4 e 5 e dos eletrodos de grafite modificados com o poli(4-aminofenol) e a polianilina.	57
Figura 47: Eletropolimerização dos copolímeros utilizando as proporções 4:1 (a), 2:1 (b) e 1:1 (c) de 4-aminofenol:anilina.....	60
Figura 48: Eletropolimerização dos copolímeros utilizando as proporções 1:4 (a), 1:2 (b) e 1:1 (c) de 4-aminofenol:anilina.....	61
Figura 49: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ , 50mV s ⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros na metodologia 3	62
Figura 50: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L ⁻¹ , 50mV s ⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros na metodologia 4.	62
Figura 51: MEV de 10.000 e 30.000 vezes dos copolímeros feitos a partir das proporções 4AF1:4An (A), 4AF1:2An (B), 4AF1:1An (C), 4AF2:1An (D) E 4AF4:1An (E), feitas pela metodologia 3.	64
Figura 52: MEV de 10.000 e 30.000 vezes dos copolímeros feitos a partir das proporções 4AF1:4An (A), 4AF1:2An (B), 4AF1:1An (C), 4AF2:1An (D) E 4AF4:1An (E), feitas pela metodologia 4.	65
Figura 53: Histograma da corrente de pico da guanina em (µa) das detecções diretas de sonda e para todas as metodologias com respectivas barras de erro de desvio padrão e proporção entre os monômeros 4-aminofenol:anilina, sendo a) P-AF com 20 ciclos de varredura; b) P-AF 10 ciclos de varredura; c) copolímero na metodologia 3 na proporção 4:1; d) copolímero na metodologia 4 na proporção 4:1; e) copolímero na metodologia 3	

na proporção 2:1; f) copolímero na metodologia 4 na proporção 2:1; g) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:1; h) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:1; i) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:2; j) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:2; k) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:4; l) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:4; m) PANi com 10 ciclos de varredura; n) PANi com 20 ciclos de varredura.....	66
Figura 54: Corrente de pico da guanina em (μ A) das detecções diretas de sonda (1) e sonda/alvo (2) para metodologia 3 na proporção 1:1 e metodologia 4 na proporção 1:2 com excesso de anilina.	67
Figura 55: Picos de detecção direta de sonda e sonda/alvo para as metodologias 3 proporção 1:1 (a) e metodologia 4 proporção 1:2 com excesso de anilina (b).....	68
Figura 56: Detecção indireta de sonda e sonda/alvo via monitoramento do intercalador de DNA brometo de etídio, utilizando a plataforma com os copolímeros 1:1 metodologia 3 e 4AF1:2An metodologia 4.	69
Figura 57: Picos de detecção indireta de sonda e sonda/alvo utilizando brometo de etídio para as metodologias 3 proporção 1:1 (a) e metodologia 4 proporção 1:2 com excesso de anilina (b).....	69

Índice de tabelas

Tabela 1 metodologias adotadas para a eletropolimerização dos copolímeros.	42
Tabela 2: dados obtidos nos últimos ciclos de voltametria dos eletrodos de grafite contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polimerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹	44
Tabela 3: atribuições das principais absorções do espectro da polianilina.....	49
Tabela 4: atribuições das principais absorções do espectro do poli(4-aminofenol).....	50
Tabela 5: dados obtidos nos últimos ciclos de voltametria dos EG contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polimerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L ⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹	63

Lista de siglas e abreviaturas

4AF: 4-aminofenol

An: Anilina

BE: Brometo de Etídio

DNA: deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

EQM: Eletrodos Químicos Modificados

ECC: Eletroquímica-química-química

EG: Eletrodo de grafite

IQ-UFU: Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

IV: Infravermelho

LAFIP: Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia

MEV: Microscópio Eletrônico de Varredura

PAni: Polianilina

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

VC: Voltametria cíclica

VPD: Voltametria de pulso diferencial

ssDNA: Single stranded Deoxyribonucleic acid (fita simples de DNA)

dsDNA: Double stranded deoxyribonucleic acid (fita dupla de DNA)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Eletrodos modificados.....	1
1.2 Polímeros.....	2
1.2.1 Polianilina	5
1.2.2. 4-Aminofenol.....	9
1.2.3 Copolímeros.....	12
1.3 Biossensores	13
1.3.1 Origem dos biossensores	13
1.3.2 Definição e Classificação.....	14
1.4. técnicas eletroquímicas	19
1.4.1 voltametria	20
1.5 formas de detecção	22
2. Objetivos.....	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Procedimento experimental	25
3.1 Soluções preparadas para o desenvolvimento do trabalho.....	25
3.2 Materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do trabalho.....	25
3.3. Métodos.....	26
3.3.1 Preparação dos eletrodos utilizados e da célula eletroquímica.....	26
3.3.2. Seleção dos eletrodos de grafite.....	29
3.3.3. Eletropolimerização da polianilina	30
3.3.4. Eletropolimerização do poli(4-aminofenol).....	30
3.3.5. Eletropolimerização do copolímero	30
3.3.6. Caracterização eletroquímica do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)	30

3.3.7. Caracterizações estruturais e morfológicas do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol)	31
3.3.8. Detecção eletroquímica direta da sonda e sonda/alvo utilizando poliGA/poliCT	32
3.3.9. Detecção eletroquímica indireta da sonda e sonda/alvo utilizando poliGA/poliCT	34
4.Resultados e discussão	35
4.1 Seleção dos eletrodos de grafite	35
4.2 Caracterização eletroquímica dos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) e copolímero inicial.....	36
4.3 Primeira parte do estudo de diferentes parâmetros metodológicos de produção dos copolímeros.	41
4.3.1 produção dos filmes em diferentes Potenciais e ciclos de varreduras adotados e caracterização eletroquímica.....	41
4.3.2. Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV) dos Copolímeros poli(anilina-4-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol).	48
4.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do copolímero Poli(anilina-1-aminofenol) e dos filmes polianilina e poli(4-aminofenol)	54
4.3.4. Seleção das metodologias	56
4.4 Segunda parte do estudo de diferentes parâmetros metodológicos de produção dos copolímeros.	58
4.4.1 Variações de proporções dos monômeros anilina e 4-aminofenol para a polimerização dos filmes, utilizando as metodologias dos copolímeros 3 e 4 e caracterização eletroquímica.....	58
4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos copolímeros.....	64
4.5 Detecção direta.....	65
4.6 Detecção indireta.....	68
5. Conclusões.....	70

Resumo

Eletrodos modificados são uma alternativa simples e de baixo custo para a otimização dos eletrodos clássicos, ao melhorar a sensibilidade e seletividade e, por conseguinte, abrir maiores possibilidades de aplicações. A modificação por eletropolimerização é uma técnica baseada na utilização de polímeros condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse, para recobrimento da superfície do eletrodo, com o objetivo de ampliar a resposta eletroquímica, proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biomoléculas, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade. A polianilina (PAni), formada pelo monômero da anilina apresenta caráter condutor promissor para aplicação, além de boa termoestabilidade, baixo preço, alto rendimento e facilidade de síntese por vias químicas e eletroquímicas em vários solventes orgânicos ou mesmo em meio aquoso. O 4-aminofenol apresenta em sua estrutura dois grupos substituintes diferentes (-NH₂ e -OH) ligados em um anel aromático, desta forma, torna-se um grande candidato para sítios de ligação de biomoléculas. O presente trabalho teve como objetivo o estudo de parâmetros de produção de um copolímero formado por esses dois monômeros, bem como sua caracterização via eletroquímica, infravermelho e microscopia eletrônica de varredura. Foram usadas diferentes variáveis de proporção entre os copolímeros na solução monomérica e diferentes faixas de potenciais em voltametria cíclica para a eletropolimerização. Os copolímeros que apresentaram resultado mais promissor foram submetidos a teste de detecção de sonda e sonda/alvo por meio de metodologias direta e indireta, utilizando poliGA e poliCT. O estudo conseguiu determinar e caracterizar uma metodologia específica para o desenvolvimento da plataforma de EG/poli(4-aminofenol-anilina) que apresentou resultados mais satisfatórios que as plataformas EG/polianilina e EG/poli(4-aminofenol), com a finalidade futura de aplicação no desenvolvimento de biossensores.

Palavras-chave: Copolímero; Anilina; 4-Aminofenol; Genossensor; Biossensor.

Abstract

Modified electrodes are a simple and cheap alternative for optimization of classical electrodes by improving sensitivity and selectivity and thus opening greater possibilities of applications. Modification by electropolymerization is a technique based on the use of conductive or permeable polymers in the electrolyte support and the species of interest to cover the electrode surface, with the objective of increasing the electrochemical response, protecting the electrode surface from impurities, blocking interferences, immobilize biomolecules, incorporate mediators and provide biocompatibility. Polyaniline (PAni), synthesized by the aniline monomer, has a promising conductive character for application, besides good thermostability, low price, high yield and ease of synthesis by chemical and electrochemical routes in various organic solvents or even in aqueous. 4-Aminophenol has in its structure two different substituent groups (-NH₂ and -OH) linked in an aromatic ring, then it can be a great candidate for biomolecule binding sites. The present work aimed to study the parameters of production of a copolymer formed by these two monomers, such as their characterization via electrochemical, infrared and scanning electron microscopy. Different variables were used between the copolymers in the proportion of monomers in solution and different potential ranges in cyclic voltammetry for electropolymerization. The most promising copolymers were submitted to probe and probe / target detection test using direct and indirect methodologies with polyGA and polyCT. The study was able to determine and characterize a specific methodology for the development of the EG / Poly (4-aminophenol-aniline) platform which presented more satisfactory results than the EG / polyaniline and EG / poly (4-aminophenol) platforms for the future purpose of application in the development of biosensors.

Keywords: Copolymer; Aniline; 4-Aminophenol; Genosensor; Biosensor.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ELETRODOS MODIFICADOS

O termo eletrodos quimicamente modificados (EQM) foi primeiramente usado por Murray e colaboradores na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas em sua superfície de forma conveniente e estratégica tendo em vista o seu objetivo de funcionamento (MOSES; WLER; MURRAY, 1975). A modificação da superfície do eletrodo tem como finalidade a melhora da reatividade e seletividade dos eletrodos clássicos por meio de inserção de outras espécies com propriedades diferentes, a fim de manipular a natureza físico-química da interface eletrodo-solução e, assim, aumentar o leque de possibilidades de aplicações. Entre os principais elementos modificantes estão os filmes poliméricos, derivados de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, negro de fumo) e a imobilização de agentes bioativos como enzimas, materiais de tecido, bactérias, células e outros, acoplados com transdutores eletroquímicos.

Os eletrodos quimicamente modificados apresentam características vantajosas tais como baixo custo, facilidade na construção e possibilidade de miniaturização, o que os difere de instrumentos utilizados em outros métodos como os cromatográficos e espectrofotométricos (MORILLO, 2017). Desta forma, a modificação química dos eletrodos ganhou considerável atenção no meio científico, uma vez que proporciona propriedades únicas e aprimoradas que beneficiam a detecção eletroquímica em comparação com os eletrodos convencionais (BROWN, 2018). Essa modificação pode ser realizada por meio de ligações covalentes: modificador ligado covalentemente ao substrato; adsorção: eletrodo exposto a uma solução contendo o modificador, envolve o contato de espécies eletroativas com a superfície do eletrodo por determinado tempo para que ocorra interação, seja eletrostática, por forças de London ou ligações de hidrogênio, na interface; eletroadsorção: aplicação de um potencial ao eletrodo, no qual a quantidade do material depositado depende do tempo, nos métodos cronoamperométricos, ou do número de ciclos, nos métodos voltamétricos, muito utilizado no desenvolvimento de polímeros em superfícies eletródicas; imobilização por oclusão: imobilizando o agente modificador, produzindo materiais compósitos formados pela combinação de duas ou mais fases de diferentes naturezas (VIEIRA, 2011).

A modificação por eletropolimerização consiste na utilização de polímeros condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse, para recobrimento

da superfície do eletrodo, ampliando a resposta eletroquímica. O uso desses polímeros também tem como objetivo proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biomoléculas, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (WALLACE; ZHAO, 1999).

1.2 POLÍMEROS

Os polímeros, do uso diário aos plásticos de alta tecnologia, desempenham um papel fundamental na vida humana. Os avanços na concepção e comercialização de novas gerações de polímeros com arquitetura e microestrutura bem controladas deram maiores dimensões a seus usos potenciais (JOUYANDEH *et al.*, 2019). Os filmes poliméricos oferecem várias vantagens, tais como estabilidade química e física, inerentes a diversos meios e uma ampla faixa de pH, grupos funcionais reativos e estruturas controláveis (MACIEL *et al.*, 2019).

Os polímeros consistem de cadeias longas formadas pela repetição de unidades mais simples, chamadas monômeros, e são em geral materiais orgânicos conhecidos principalmente por serem excelentes isolantes térmicos e elétricos. Na década de 70, uma nova área de polímeros orgânicos, denominados polímeros condutores, foi descoberta e desde então permanece em constante desenvolvimento, devido sua importância relacionada à possibilidade de conduzir corrente elétrica (ROCHA, 2000).

Os polímeros de caráter não-condutor eletropolimerizados apresentam grande resistência elétrica, um crescimento autolimitado e o filme formado é muito mais fino que o os filmes poliméricos condutores (NAKABAYASHI; AKUDA; MAI, 1998). Já os polímeros condutores são formados por cadeias contendo duplas ligações conjugadas, permitindo o fluxo de elétrons em condições específicas de dopagem¹. Os orbitais π podem, facilmente, receber (redução) ou doar elétrons (oxidação) formando um íon. A partir desses processos, encontram-se cargas delocalizadas ao longo da cadeia polimérica, que são neutralizadas através da entrada e saída de cátions ou ânions. Esse fluxo de elétrons pode ser considerado como resultado de efeitos estruturais na cadeia polimérica, originados durante o processo de polimerização. Desta forma, os polímeros condutores apresentam propriedades elétricas, magnéticas e ópticas semelhantes às propriedades dos

¹ Os agentes de carga que efetuam a redução ou a oxidação do polímero, tornando-o, de isolante para condutor são chamados de dopantes, em analogia à dopagem em semicondutores.

semicondutores e até mesmo de alguns metais, sendo capazes de conduzir eletricidade (AUGUSTO, 2009). Alguns exemplos desses polímeros podem ser visualizados na Figura 1.

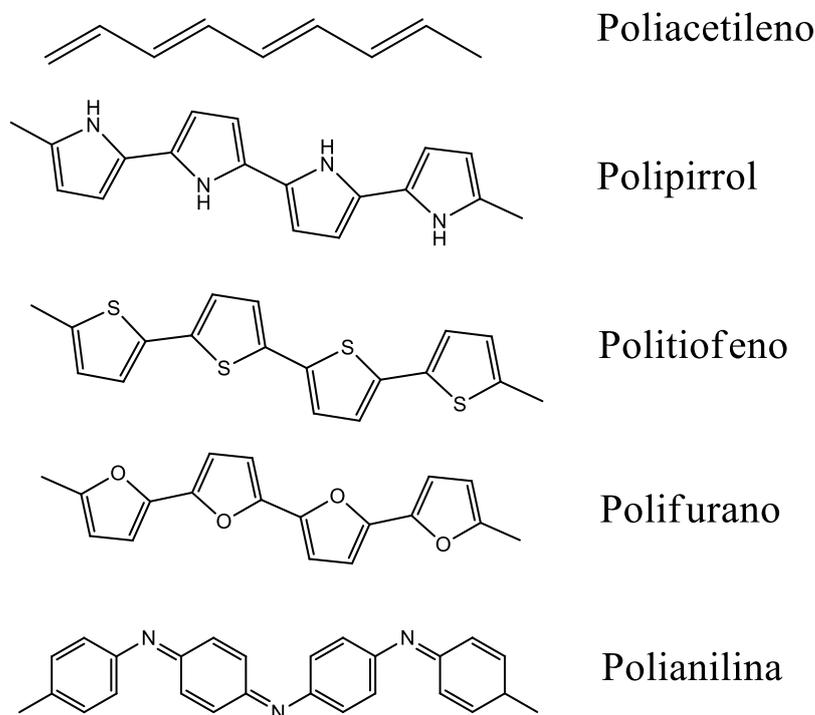


Figura 1: Estrutura de alguns polímeros condutores. Fonte: (AUGUSTO, 2009) adaptado.

Os polímeros podem ser sintetizados via eletroquímica a partir de seus monômeros, por meio de reações anódicas ou catódicas, sendo a polimerização anódica a mais adotada. Esse processo consiste em uma oxidação eletroquímica do monômero, resultando no recobrimento do eletrodo pelo polímero sintetizado. A eletropolimerização geralmente envolve uma reação eletroquímica-química-química (ECC), sendo o primeiro passo (eletroquímico) a eletro-oxidação do monômero utilizado ao seu correspondente cátion radical. As partes químicas são constituídas pela polimerização na solução e, por último, pela eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (INZELT *et al.*, 2000). Os cátion radicais formados no primeiro passo apresentam alta instabilidade, portanto grande reatividade, podendo promover outros tipos de reação. Quando ocorre uma ECC efetiva, a dimerização² é o primeiro passo da etapa química. O crescimento da cadeia e a formação do polímero provém da reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Entretanto, podem ocorrer reações de dimerização

² Processo corresponde a união de dois monômeros, formando um dímero.

paralelas, formando produtos diferentes ou polímeros com estruturas distorcidas, além da possibilidade de formação de um dímero neutro quando ocorre a reação de terminação entre dois cátions radicais. Pode ocorrer a reação do cátion com o eletrodo ou reações laterais com o solvente ou moléculas presentes na solução (MELO, 2009). O esquema geral da eletropolimerização é mostrado na Figura 2.

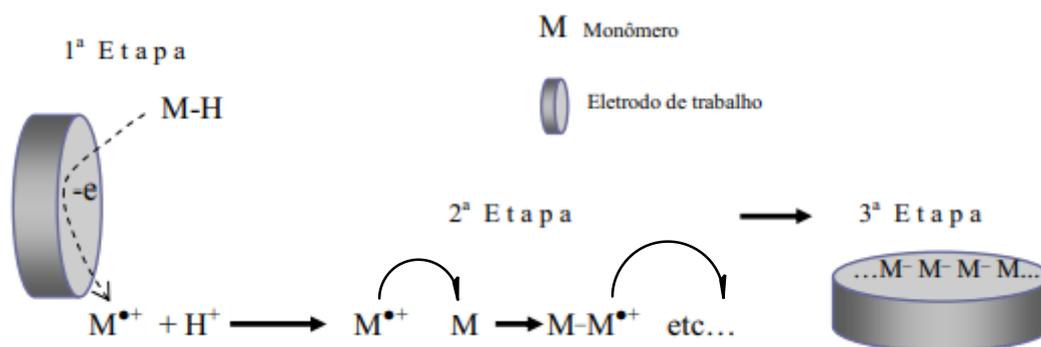


Figura 2: Esquema geral de uma polimerização eletroquímica. Fonte:(MELO, 2009) adaptado.

A síntese controlada de polímeros é possível por eletropolimerização, ajustando alguns parâmetros tais como número de varreduras de potencial, velocidade de varredura de potencial, potencial aplicado, caracterizando-se como um método simples, entretanto eficaz, para a modificação de eletrodos para aplicação em sensores (ATES, 2013). Além disso, as superfícies eletródicas modificadas com polímeros apresentam capacidade de compatibilidade dimensional e química com biomoléculas, possibilitando a catálise e reações, bem como promovendo reações de transferência de elétrons entre biomoléculas e substratos do eletrodo, fator que contribui para que sejam amplamente utilizadas na construção de biosensores (BARSAN; GHICA; BRETT, 2015).

Dentre os monômeros mais utilizado para a polimerização, a anilina e o fenol são alguns dos mais estudados pela literatura. As anilinas possuem maior solubilidade em meio aquoso, apresentando a característica de levarem à formação de polímeros com melhor processabilidade, enquanto os fenóis e derivados formam polímeros não condutores (LAPUENTE; CASES; GARCE, 1998; GENIÈS, 1990). Estudos indicam que monômeros que contém grupamentos aromáticos ligados diretamente ao oxigênio apresentam facilidade de polimerização, alta resistência mecânica e maior estabilidade para o eletrodo (LOFRANO; MADURRO; ROMERO, 2000; LOFRANO *et al.*, 2004).

1.2.1 POLIANILINA

Formada a partir da polimerização do monômero da anilina (Figura 3), a polianilina (PAni) foi sintetizada pela primeira vez por Lethby em 1862, utilizando o método de oxidação eletroquímica da anilina em meio de ácido sulfúrico. Apresenta caráter condutor, sendo muito estudada na literatura (SYED; DINESON, 1991). Além disso, a PAni tem boa termoestabilidade e pode ser facilmente sintetizada por via química ou eletroquímica em vários solventes orgânicos ou mesmo em meio aquoso (WANG *et al.*, 2017). Dentre outras vantagens, podem ser citados seu preço baixo, alto rendimento, boa estabilidade, excelentes propriedades ópticas e elétricas e boa propriedade anticorrosiva, que garantem sua ampla utilização em aspectos comerciais e tecnológicos (LIAO *et al.*, 2017).

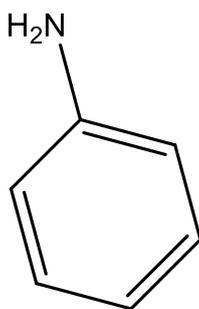


Figura 3: Estrutura molecular da anilina, monômero da polianilina, Fonte: a autora

A sua forma dopada promove grande estabilidade química combinada com níveis altos de condutividade elétrica que podem ser controlados (PRON; RANNOU; SYNTHÉ, 2002). PAni e seus derivados podem ser convertidos em materiais condutores a partir de seus estados isolantes através de técnicas de dopagem, como dopagem química por transferência de carga, dopagem eletroquímica por ácido protônico e fotodopagem por injeção de carga em uma interface de metal/polímero semiconductor (VENUGOPAL *et al.*, 1996).

As polianilinas (Figura 4) pertencem a uma classe de polímeros, cuja composição é dada por y e $(1-y)$ unidades repetitivas das espécies reduzidas e oxidadas respectivamente. O valor de y pode variar continuamente entre 1 para o polímero completamente reduzido, contendo somente nitrogênios amina, e zero para o polímero completamente oxidado, contendo somente nitrogênios na forma de iminas.

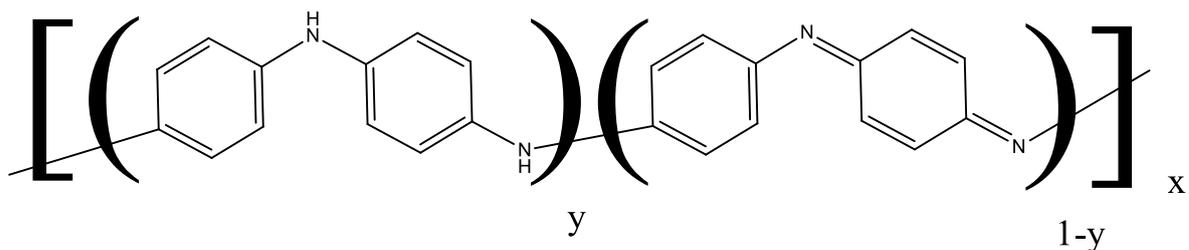
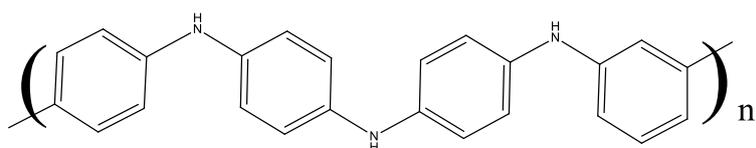
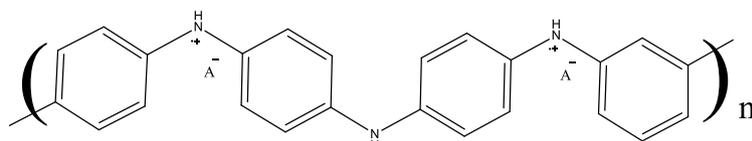


Figura 4: Estrutura molecular da polianilina, fonte: (MATTOSO, 1996) adaptado.

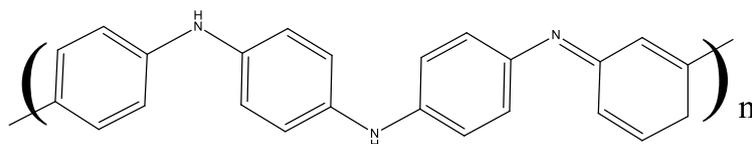
Os diferentes graus de oxidação da polianilina (Figura 5) são designados pelos termos leucoesmeraldina, protoesmeraldina, esmeraldina, nigranilina e pernigranilina quando y for igual a 1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0 respectivamente (MATTOSO, 1996). O sal esmeraldina é a forma da polianilina que apresenta os maiores valores de condutividade (10 a 103 S/cm) chegando até a apresentar um caráter metálico, enquanto as formas leucoesmeraldina e pernigranilina, apesar de também poderem ser protonadas, não formam espécies condutoras (DE CASTRO, 2004).



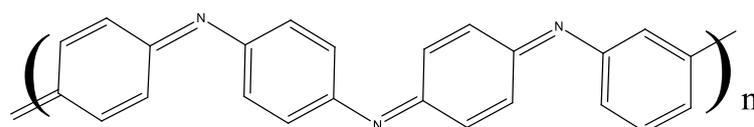
leucoesmeraldina: completamente reduzida



sal de esmeraldina: parcialmente oxidada



base esmeraldina: parcialmente oxidada



pernigranilina: completamente oxidada

Figura 5: Diferentes formas da polianilina, fonte: (MATTOSO, 1996; MEDEIROS, OLIVEIRA FILHO, 2012) adaptado

A primeira etapa de polimerização (Figura 6) envolve a oxidação da anilina, formando o cátion radical (cátion nitrenium), pela transferência de elétrons do nível de valência do átomo de nitrogênio da anilina, independente do pH do meio. O cátion radical da anilina possui três formas de ressonância, todavia a forma com o elétron na posição *para* é a mais reativa, devido ao efeito indutivo no substituinte e à ausência de impedimento estérico.

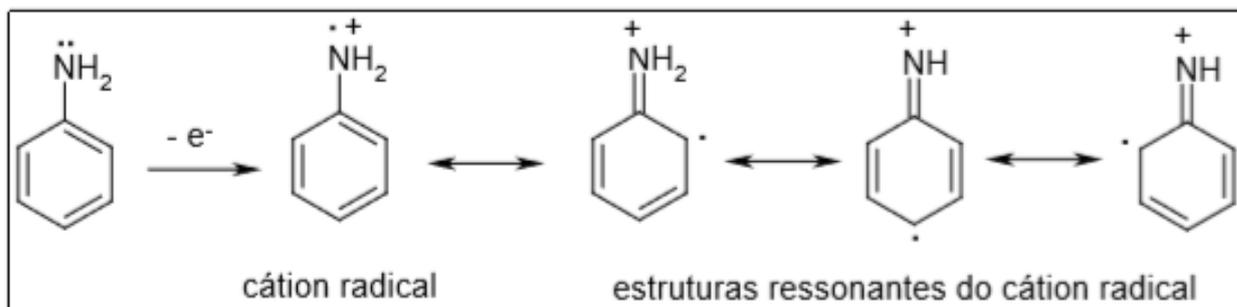
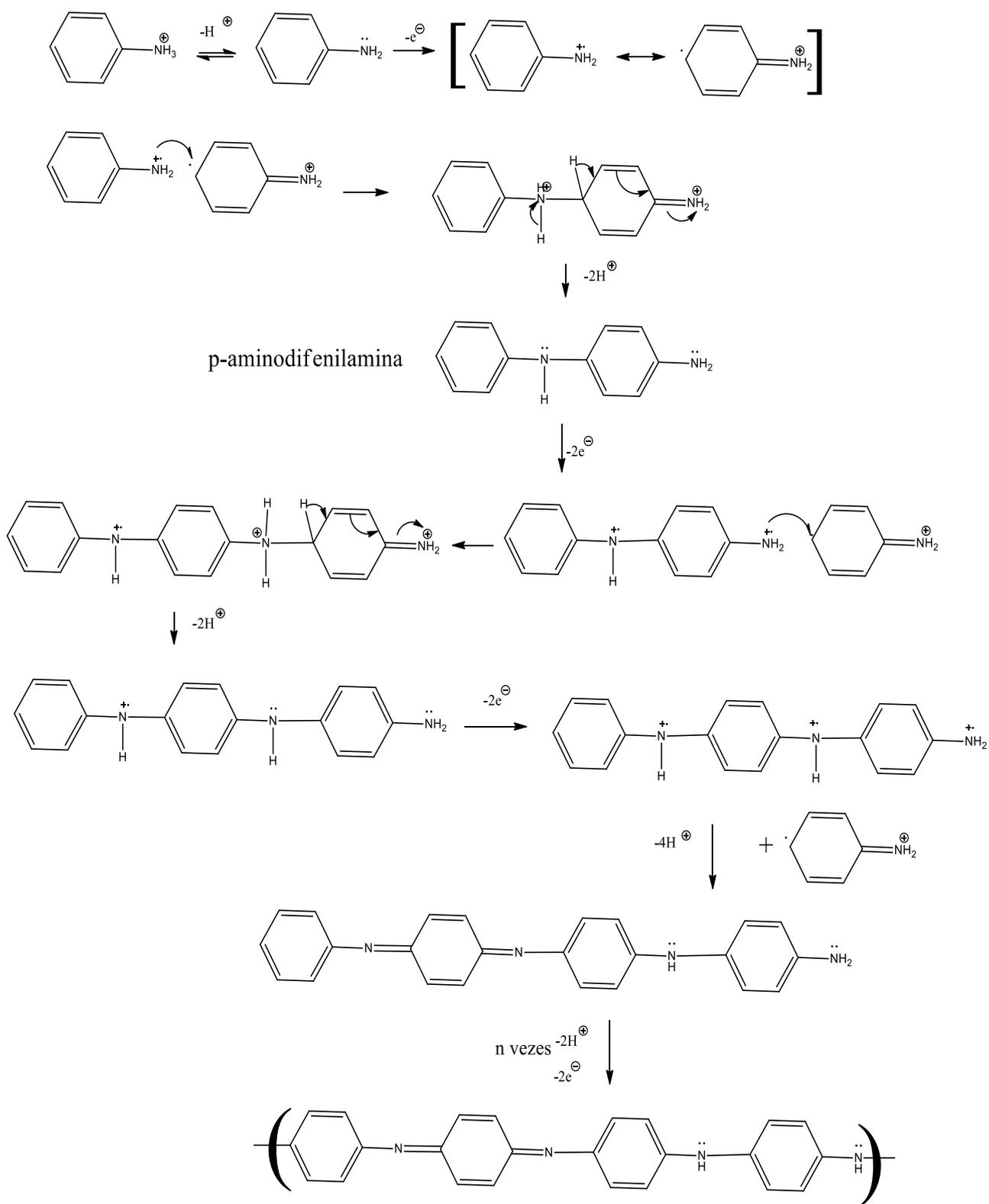


Figura 6: Formação do cátion radical e suas estruturas de ressonância, fonte: (RATES, 2006)

O cátion radical reage com uma outra estrutura de ressonância, formando assim o dímero *p*-aminodifenilamina. Em seguida, o dímero formado sofre oxidação e forma um novo cátion radical, que pode reagir tanto com um monômero cátion radical ou com um dímero cátion radical, para formar respectivamente um trímero ou um tetrâmero. Esse mecanismo, representado na Figura 7, ocorre *n* vezes até a formação da polianilina.



PAni

Figura 7: Mecanismo de polimerização oxidativa da anilina, fonte: (RATES, 2006; RAVINDRAKUMAR, 2014) adaptado.

1.2.2. 4-AMINOFENOL

Os aminofenóis (AF), considerados derivados de fenóis e anilinas, são compostos que apresentam em sua estrutura dois grupos substituintes diferentes (-NH_2 e -OH), ligados em um anel aromático, grandes candidatos para sítios de ligação de biomoléculas (VIEIRA, *et al.*, 2006). Apesar da diferença estrutural evidenciada nos isômeros de posição, 2-aminofenol, 3-aminofenol e 4-aminofenol, tanto a anilina quanto o fenol apresentam comportamento eletroquímico parecido, pois ambos são precursores na formação de filmes, com amplas aplicações em sensores e biossensores (SALAVAGIONE *et al.*, 2004). O 4-aminofenol (Figura 8) apresenta uma boa proposta para a formação dos filmes e para a imobilização das biomoléculas, uma vez que os seus dois grupos funcionais se encontram na posição para, o que deve promover menor impedimento estérico para o cumprimento das duas funções.

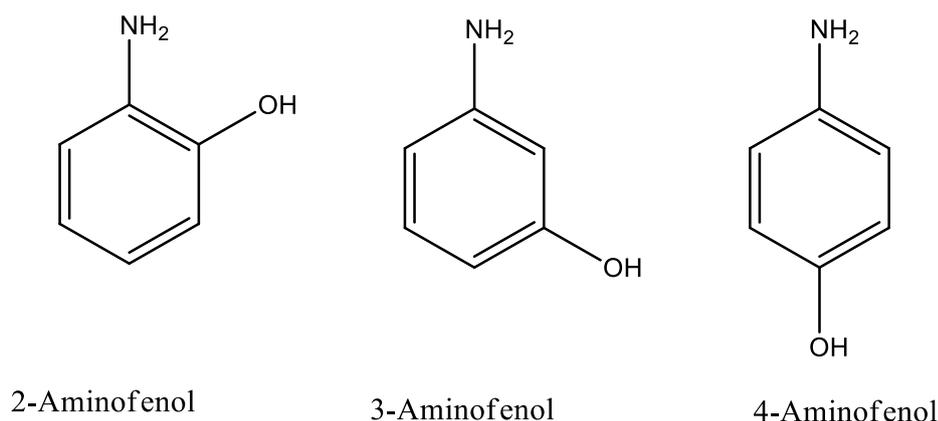


Figura 8: Estrutura molecular do 4-aminofenol, fonte: a autora

Durante o processo de síntese de polímeros, os monômeros são oxidados para formar cátions ou cátions radicais e, em seguida, reagem formando oligômeros que se depositam na superfície do eletrodo na forma de polímero.

Estudos sobre a eletro-oxidação do 4-aminofenol indicam a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo a quinoneimina e em seguida a 4-benzoquinona (Figura 9). Com valores de pH maiores, ocorre a segunda reação química entre 4-benzoquinona e 4-aminofenol, isto é, a reação de acoplamento 1,4 e a geração de filme sobre a superfície do eletrodo (HAWLEY E ADAMS, 1965).

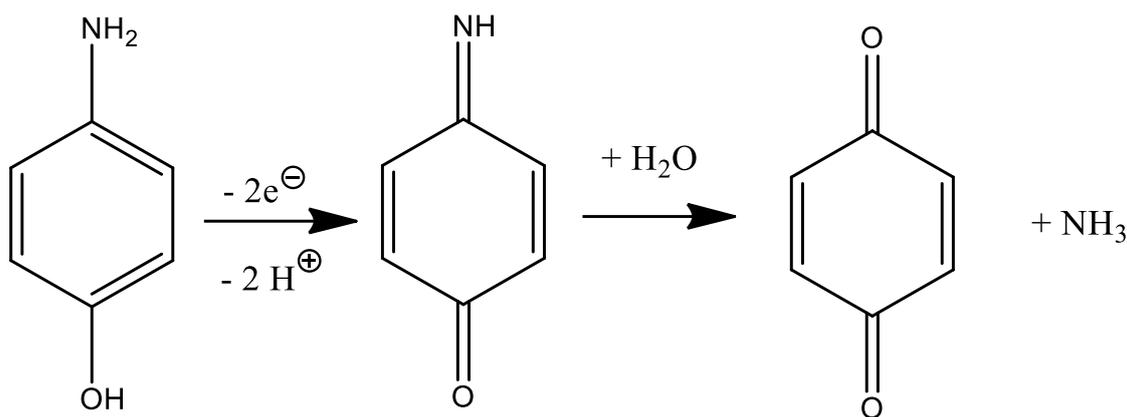


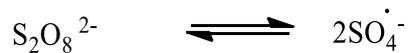
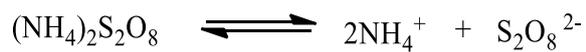
Figura 9: Reação de eletro-oxidação do 4-aminofenol, fonte: (HAWLEY E ADAMS, 1965) adaptado.

Outra possibilidade para o mecanismo de polimerização via química do 4-aminofenol é elucidado na Figura 10. A retirada de um elétron do monômero é feita pelo íon sulfato radical, assim como a retirada do próton é feita por uma base, a formar o cátion radical, em suas estruturas de ressonância.

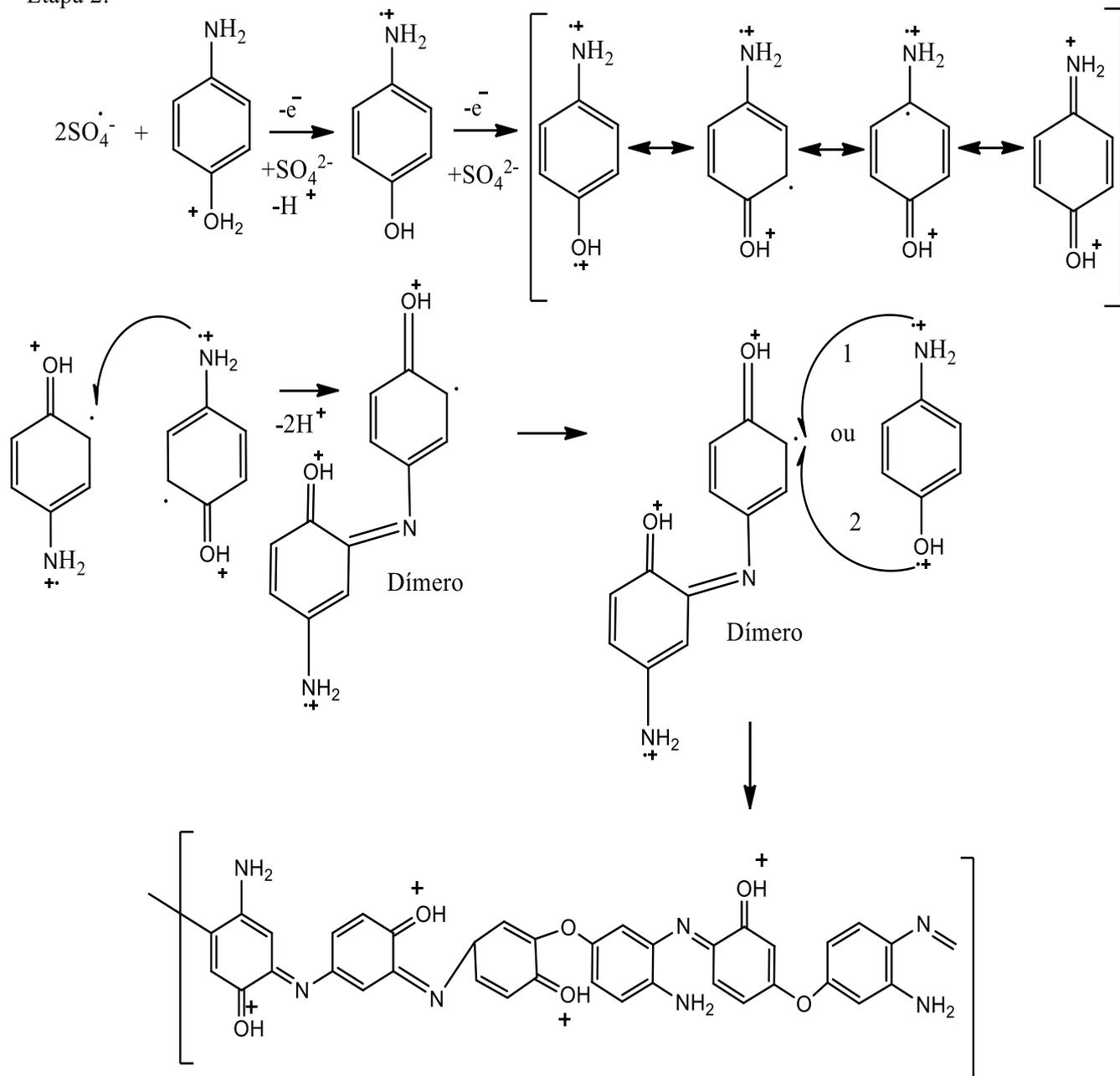
As estruturas em que o cátion radical se encontra no nitrogênio são mais estáveis que no oxigênio, pelo fato do nitrogênio ser menos eletronegativo que o oxigênio. O cátion radical reage com outra estrutura de ressonância formando o dímero, que, por conseguinte reage mais inúmeras vezes para formar a estrutura do poli(4-aminofenol).

Sendo assim, considera-se um fator interessante a influência do meio reacional em sua resposta eletroquímica, relatado sobre alguns polímeros eletroativos. Como o 4-aminofenol apresenta diferença na protonação dos grupos -OH e -NH₂, influenciado pelo pH, podem ser obtidos diferentes filmes poliméricos na superfície do eletrodo. Alguns estudos demonstraram que o polímero formado em meio ácido é eficiente na imobilização e detecção de material genético, adenosina trifosfato e guanosina trifosfato, no qual a amplitude do sinal de detecção foi vinte e quatro vezes maior quando comparado com um eletrodo de grafite não modificado com o polímero (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007)

Etapa 1:



Etapa 2:



Poli(4-aminofenol)

Figura 10: Proposta de mecanismo para a polimerização do 4-aminofenol. Fonte: (G. THENMOZHI, P. AROCKIASAMY, 2014) com modificações.

1.2.3 COPOLÍMEROS

Enquanto os polímeros que contêm apenas uma unidade monomérica são chamados de homopolímeros, aqueles que contêm duas ou mais unidades monoméricas diferentes são conhecidos como copolímeros (MALEICO; MAURANO; GALLAND, 1998). Os copolímeros podem ser classificados em quatro classes: em bloco, alternado, aleatório, e enxertado, de acordo com a disposição de seus monômeros, conforme mostra a Figura 11 (YOKOYAMA, 1992).

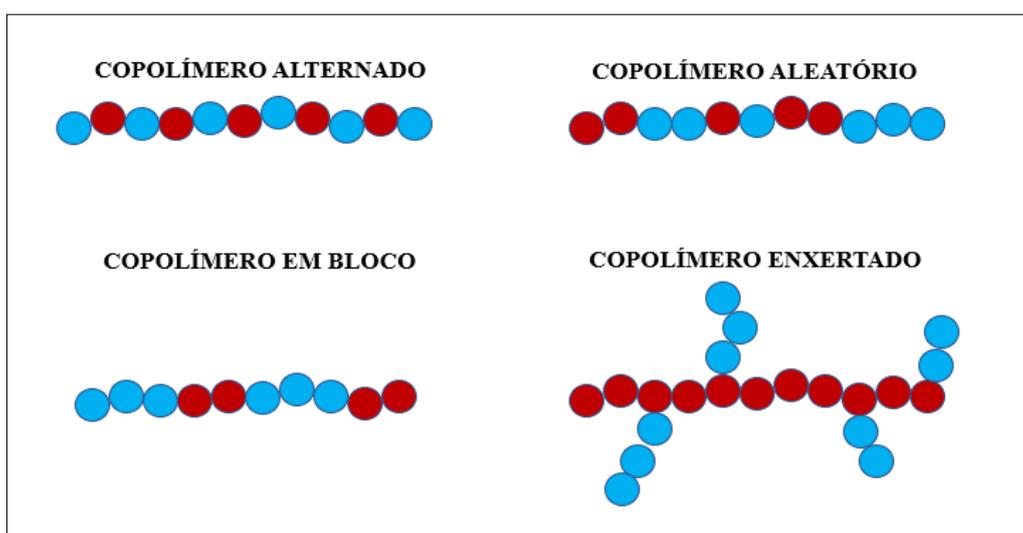


Figura 11: Classificação dos copolímeros, fonte: (YOKOYAMA, 1992), adaptado.

A partir do arranjo de monômeros contendo diferentes naturezas e propriedades, vislumbra-se a obtenção de um copolímero com características que atendam as condições desejadas. Sendo assim, o intuito do uso do 4-aminofenol e anilina neste trabalho é o desenvolvimento do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) com características estratégicas para imobilização, pela possibilidade de combinação das propriedades desses monômeros, uma vez que a polianilina apresenta facilidade de polimerização e boa estabilidade e o poli(4-aminofenol) apresenta considerável biocompatibilidade com diferentes tipos de biomoléculas, pelos seus grupos funcionais.

1.3 BIOSSENSORES

1.3.1 ORIGEM DOS BIOSSENSORES

O termo “biossensor” foi primeiramente proposto por Cammann no ano 1977, em um artigo cujo princípio fundamental proposto é o embasamento em determinações indiretas que podem ser mensuráveis (CAMMANN, 1977). Entretanto, o primeiro biossensor foi desenvolvido em 1956 por Leland C. Clark, considerado como o “pai dos biossensores”, com o objetivo de detectar oxigênio no sangue, por meio da correlação e análise da redução de oxigênio em um eletrodo de platina (CLARK, 1956). Após a falha da primeira tentativa de seu biossensor devido à adsorção dos componentes do sangue na superfície do eletrodo, ocasionando distorção do sinal, Clark utilizou um polímero de celulose (invólucro de celofane), realizando assim a separação das biomoléculas, possibilitando que apenas substâncias de baixo peso molecular, principalmente o oxigênio, pudessem chegar ao eletrodo para serem mensuradas (RENNEBERG *et al.*, 2008). Alguns anos depois, em 1962, Clark desenvolveu outro trabalho com Lyons, no qual adicionava a enzima glicose oxidase concentrada entre a solução e o eletrodo, contidas em camadas de membranas interpostas, fornecendo fundamentos essenciais para os biossensores (CLARK; LYONS, 1962).

Desta forma, Leland Clark abriu as portas para o desenvolvimento de pesquisas em biossensores, principalmente os enzimáticos, possibilitou que, no ano de 1969, George Guilbault publicasse sua pesquisa sobre um eletrodo produzido, utilizando como base a imobilização da enzima urease e um sensor de pH, a fim de realizar detecção potenciométrica de uréia (GUILBAULT; MONTALVO, 1969). Logo após, em 1973, Mindt e Racine elaboraram o primeiro sensor de lactato, cujo sinal da enzima era independente da concentração de oxigênio da amostra, marco que representou um grande avanço no aprimoramento dos biossensores (RACINE; MINDT; SCHLAEPF, 1973). Por fim, no ano de 1975, com base nos estudos publicados por Clark, o primeiro biossensor comercial foi desenvolvido pela Yellow Spring Instruments (YSI) para detecção de glicose (RENNEBERG *et al.*, 2008).

Desde então, os biossensores vem sendo uma grande área de desenvolvimento e pesquisa multidisciplinar continuamente crescente, envolvendo diversos domínios do conhecimento, como Ciências Exatas, Ciências Biológicas, Nanotecnologia e Eletrônica, podendo ser aplicados em várias âmbitos de interesse e melhoria da qualidade de vida humana, como monitoramento ambiental (UMAR; ALEXANDER; WIEST, 2015),

análise de alimentos (NIKOLELI, 2019), descobrimentos de drogas (CHEN *et al.*, 2018), detecção de doenças como o câncer (ZHOU *et al.*, 2019) e outras doenças com alta taxa de mortalidade (REBELO *et al.*, 2019). Na Figura 12 é possível visualizar gráfico com o número de publicações por ano no intervalo de 1996 e 2019, de acordo com os dados obtidos ao pesquisar a palavra “biossensor” na plataforma *sciencedirect*. A partir desses dados, nota-se o aumento quase exponencial do número de publicações sobre biossensores, evidenciando o enorme avanço e importância dessa área no cenário científico atual.

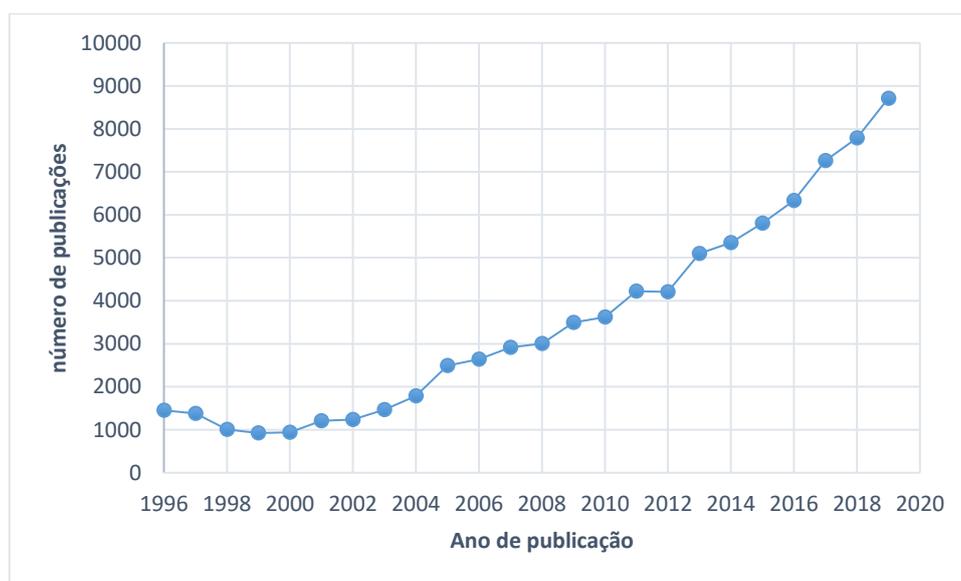


Figura 12: Número de publicações com termo “biossensor” de 1996 a 2019 na plataforma *sciencedirect*.

Elaborado em 04/02/2020 por autoria própria.

O interesse em produção de biossensores está centrado em algumas vantagens desses dispositivos, como a possibilidade de construção de sistemas miniaturizados, a utilização de frações reduzidas de amostras para análises, capacidade de produção com baixo custo, tempo rápido de análise, independência de mão de obra especializada para seu manuseio, além da perspectiva de análises com alta sensibilidade e especificidade (CECCHETTO, 2014).

1.3.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Segundo a definição disponível no relatório técnico da IUPAC, entende-se por biossensores aqueles sensores químicos³ cujo sistema de reconhecimento utiliza de

³ Para a IUPAC os sensores químicos são dispositivos que transformam informação química em um determinado sinal analítico utilizável, contendo em sua estrutura dois componentes básicos em séries: um sistema de reconhecimento químico (receptor) e um transdutor físico-químico.

reações bioquímicas específicas e envolve o uso ou o reconhecimento de moléculas biológicas em sua interface, mediadas por enzimas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras isoladas, a fim de detectar um analito através de um transdutor. Desta forma, os biossensores podem ser classificados de acordo com elemento de biorreconhecimento, modo de transdução do sinal ou pela combinação desses dois elementos (THEAVENOT *et al.*, 1999). O esquema geral de um biossensor está representado na Figura 13.

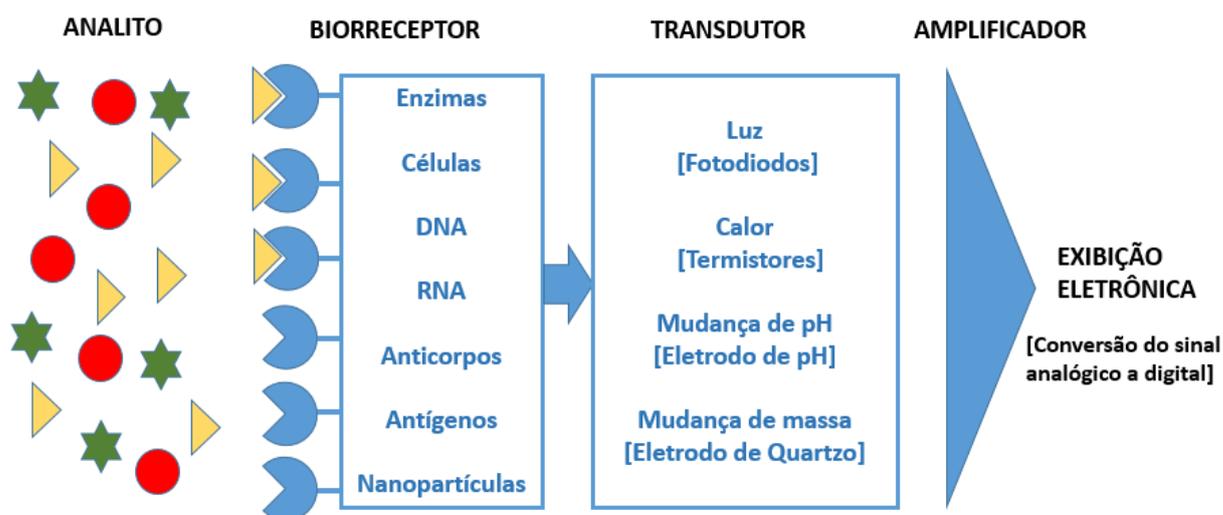


Figura 13: Configuração esquemática de um biossensor, fonte: a autora

Biossensor é caracterizado como um dispositivo analítico composto de um elemento de reconhecimento biológico, denominado biorreceptor que, em contato com um transdutor, converte a concentração de um analito em um sinal elétrico proporcional a esta concentração (XIA; WEI; WAN, 2010). Esse princípio básico de proporcionalidade entre a concentração de um analito e um sinal elétrico do biossensor tem sua origem remota no trabalho de M. Cremer em 1906, que, mesmo antes do conceito de pH, evidenciou que a concentração de um ácido em um líquido é proporcional ao potencial elétrico localizado em lados opostos de uma membrana de vidro (KADEN, 2010).

Alguns biocomponentes são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de micro-organismos, organelas e tecidos (vegetais, animais e fúngicos) (SILVA, 2011). O sistema de biorreconhecimento apresenta uma biomolécula, também denominada de “sonda”,

imobilizada em sua interface que fornece um sinal ao entrar em contato com o analito de interesse da *amostra* “álvo”. Por conseguinte, o elemento biológico de reconhecimento deve apresentar uma elevada especificidade, estabilidade em condições normais de armazenamento e ensaios com pequena ou nenhuma alteração entre si, a fim de compor um biossensor com alta reprodutibilidade e qualidade (RIBOVSKI, 2015). Desta forma, o sistema de transdução é capaz de transformar esse sinal produzido pela interação biológica sonda-alvo em um sinal elétrico que, por fim, fornecendo a resposta analítica útil para um processador de sinal, completando os três sistemas que compõem o funcionamento do biossensor (LUONG; MALE; GLENNON, 2008).

O sistema de transdução é um fator importante na hora de desenvolver um biossensor, dependente do tipo de evento de biorreconhecimento, pois exerce a função de distinguir as alterações causadas pela interação entre o receptor biológico e seu analito, e converte-las num sinal analiticamente mensurável, visualizado, amplificado e armazenado (CASTILLO *et al.*, 2004). Portanto de acordo com o sistema elaborado e o tipo de energia produzida, devem ser utilizados diferentes tipos de transdutores, tais como os transdutores ópticos, transdutores eletromagnéticos, transdutores calorimétricos e transdutores eletroquímicos.

Os transdutores ópticos operam medindo sinal em forma de luz, por exemplo, baseados nos fenômenos da fluorescência e difração óptica (ABDULHALIM; ZOUROB; LAKHTAKIA, 2008). Sendo assim, o produto de reação do biossensor modifica a intensidade da luz emitida ou ele próprio gera um sinal óptico detectável (VELASCO-GARCIA, 2009).

Os transdutores eletromagnéticos, também chamados piezoelétricos ou sensitivos à massa, funcionam com base na medida da alteração da frequência de vibração de um cristal oscilante pela presença de um analito alvo (SKLÁDAL, 2003). O fundamento se encontra na utilização de propriedades piezoelétricas⁴ de materiais que não possuem centro de simetria, tal como o quartzo, principal componente piezoelétrico utilizado nos biossensores (ALDER; MCCALLUM, 1983). Sendo assim, com a aplicação de um sinal elétrico, com frequência específica, oscilam, sendo que a frequência de oscilação é dependente da frequência elétrica aplicada e da massa do cristal e, uma vez

⁴ O efeito piezoelétrico aparece quando é aplicada uma pressão capaz de deformar a rede cristalina de materiais dielétricos, causando uma separação dos centros de gravidade das moléculas carregadas de maneira oposta, gerando momentos dipolares em cada molécula.

que ocorre o aumento da massa causado pela ligação às biomoléculas, a frequência de oscilação do cristal também muda, de forma a ser mensurada eletricamente para determinar a massa adicional (CULLUM, 2008).

Os transdutores calorimétricos ou termométricos são aqueles que, levando em consideração a geração ou diminuição de calor provenientes das reações de biorreconhecimento, que ocorrem quando o analito se liga à biomolécula imobilizada na superfície do sensor termal, baseiam-se quantitativamente nessas mudanças de temperatura para gerar um sinal que é proporcional à entalpia molar e ao número total de moléculas na reação (ZHANG; TADIGADAPA, 2004). Esse transdutor pode ser considerado seletivo porque a medida da temperatura ocorre por meio de termistores e são insensíveis às propriedades ópticas e eletroquímicas da amostra, sendo utilizados na análise de componentes de processos industriais como na indústria alimentícia (BHAND *et al.*, 2010; KOUGIANOS, 2006).

Por fim, nos transdutores eletroquímicos utiliza-se como base o monitoramento das espécies eletroativas, sendo que as reações químicas ocorridas entre o analito e a biomolécula, mediante a aplicação de um potencial ou corrente, alteram a magnitude do sinal padrão observável por meio da produção ou consumo de íons ou elétrons (THÉVENOT *et al.*, 2001). Devido às suas características vantajosas, tais como baixo custo de produção, portabilidade, alta sensibilidade e compatibilidade com as tecnologias de microfabricação, além da relativa facilidade e variedade na modificação, os transdutores eletroquímicos destacam-se no meio acadêmico e comercial em relação aos outros três (MAHATO *et al.*, 2018). Os biossensores eletroquímicos utilizam sistemas eletroquímicos formados por três ou dois eletrodos. Um sistema eletroquímico típico consiste em um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo. O eletrodo de trabalho consiste em um material condutor sólido quimicamente estável, como platina, ouro ou carbono; o eletrodo de referência geralmente consiste de um fio ou placa de prata metálica revestida com uma camada de cloreto de prata (Ag/AgCl); e um fio de platina é normalmente usado como eletrodo auxiliar (MOON *et al.*, 2018).

Outra forma de classificação dos biossensores é pelo seu tipo de biorreconhecimento, os quais podem ser biossensores enzimáticos, biossensores baseados em receptores proteicos, imunossensores, biossensores de DNA (genossensores) ou biossensores celulares. Nos biossensores enzimáticos, como o biossensor de glicose

produzido por Clark em 1962, as enzimas imobilizadas funcionam como catalisadores biológicos nas reações de conversão de substratos, tornando o produto final (inibidores, moduladores da reação catalítica ou outros produtos reacionais detectáveis) em geradores de sinal (MARCO; BARCELÓ, 1996). Os receptores proteicos apresentam um sensoriamento natural, tornando-os vantajosos na aplicação em biossensores, uma vez que são compostos por proteínas não-catalíticas presentes nas membranas celulares, cuja função é conectar o espaço extracelular e intracelular e, deste modo, exercem um papel como sensores químicos responsáveis pela comunicação célula-célula, por ligações específicas reversíveis de neurotransmissores e hormônios que coordenam a atividade celular (PADDLE, 1996). Os imunossensores tem o biorreconhecimento efetuado por meio da ligação entre antígenos e anticorpos⁵, promovendo alta seletividade e especificidade, devido à formação de um complexo estável, no qual o antígeno, que funciona como o analito, é o único componente que se liga exatamente no sítio de ligação do anticorpo (FELIX; ANGNES, 2017). Nos biossensores celulares, os elementos de biorreconhecimento podem ser células ou micro-organismos inteiros ou componentes celulares específicos, que, por possuírem diversos componentes de membrana, ligam-se com o analito com maior frequência, proporcionando baixos limites de detecção, todavia pouca seletividade (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012) . Por fim, os genossensores são aqueles biossensores que utilizam fragmentos de DNA como forma de biorreconhecimento, apresentando baixo custo, estabilidade e rapidez na resposta (LUCARELLI *et al.*, 2004). Tanto o DNA quanto o RNA são polímeros de nucleotídeos compostos por adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C). No RNA, a timina é substituída pela Uracila (U) (LEHNINGER, 2006). A molécula de DNA possui ligações entre seus pares de bases de maneira específica, sendo assim, o mecanismo se dá por meio da interação entre os pares de bases, produzindo um sinal analítico detectável, isto é, o biossensor atua distinguindo o evento de hibridização entre a sonda imobilizada (oligonucleotídeos) e o alvo na amostra, identificando o sinal do analito quando é formada dupla-fita de DNA após a hibridização (dsDNA ou duplex), ou a ausência desse sinal (fitas simples de DNA – ssDNA) (AVRAHAM; HEROLD, 2008). Para que haja essa interação sonda-alvo, é preciso um sucesso efetivo na etapa de imobilização da biomolécula sonda, na qual o desenvolvimento de um copolímero pode apresentar um

⁵ O anticorpo, ou imunoglobulina, é uma molécula glicoproteica complexa capaz de se ligar a antígenos para evitar que uma partícula invasora cause danos à saúde.

perfil vantajoso ao propor combinações de características úteis de diferentes monômeros (MARQUES, 2013).

1.4. TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

A Eletroquímica é um ramo da Físico-Química que compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas do analito alvo, usando como instrumento uma célula eletroquímica. A partir dessas técnicas eletroanalíticas, é possível estabelecer baixos limites de detecção, além de outras informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, tais como: estequiometria, velocidade de transferência de carga interfacial e de massa, entre outras (BARD; FAULKNER, 1983). Desta forma, o uso da eletroquímica oferece várias vantagens para a aplicação em biossensores, uma vez que apresenta as principais características para o desenvolvimento de dispositivos *point-of-care* (PoC): possibilidade de miniaturização de transdutores, baixo custo na produção, fácil manuseio e interpretação, promovendo maior possibilidade de comunicação entre o desenvolvimento acadêmico e a aplicação comercial, uma vez que a maioria dos biossensores comerciais utilizam transdutores eletroquímicos (TELES, 2006).

As técnicas eletroquímicas podem ser organizadas de acordo com o tipo de medida, divididas em técnica amperométrica, que investiga reações que geram uma corrente mensurável; a técnica potenciométrica, que investiga reações que geram potencial mensurável ou acúmulo de cargas; a técnica condutimétrica, que explora as alterações mensuráveis das propriedades condutivas de um meio entre os eletrodos; a técnica impedimétrica, que mede a impedância, tanto a resistência quanto reatância (SKOOG, 2005).

O princípio que permite a análise quantitativa por meio das técnicas está relacionado com a relação entre concentração e corrente. Na Equação 1 a corrente faradaica “ I ” é determinada pelo número “ n ” de elétrons envolvidos na reação multiplicada pela constante de Faraday “ F ”, pela área do eletrodo “ A ” e pelo fluxo do analito nos limites interfaciais “ j ”. Na Equação 2, é possível calcular a taxa da reação, sendo k_0 a constante de taxa heterogênea da transferência de elétrons, a qual descreve a cinética da transferência e c_0 que corresponde à concentração do analito na interface eletrodo/eletrólito que, por sua vez, é dependente do transporte de massa do analito para a interface (HAMMOND *et al.*, 2016).

$$= \text{Equação 1}$$

$$= 0 \ 0 \ \text{Equação 2}$$

A dependência entre a concentração do analito e a corrente constrói o fundamento de funcionamento dos biossensores eletroquímicos, que se dá a partir da variação de alguma grandeza elétrica, devido aos processos redox que ocorrem na superfície do eletrodo por meio da troca de elétrons, correlacionada com a concentração do analito, (DIAMOND, 1999). Através do controle dos fatores que influenciam a velocidade da reação: concentração do analito e outras espécies na matriz e nos limites interfaciais; transporte de massa⁶ das espécies da solução até os limites interfaciais; transferência de elétrons nos limites interfaciais; outras reações químicas que podem ocorrer dentro da amostra-matriz; outras interações com os eletrodos (adsorção, eletrodeposição); fatores externos, como temperatura e pressão, é possível minimizar erros e interferências a fim de melhorar a performance do biossensor (HARRIS, 2007).

1.4.1 VOLTAMETRIA

A voltametria é uma técnica qualitativa e quantitativa capaz de produzir informações sobre os processos redox das espécies eletroativas, através do registro de corrente em função do potencial aplicado. A medida de corrente é dada em uma célula eletroquímica em condições de completa polarização de concentração, cuja velocidade de oxidação e redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo (SKOOG, 2005). Na célula eletroquímica, encontram-se três eletrodos imersos em uma solução que contém o analito e excesso de um eletrólito não reativo (eletrólito suporte). No eletrodo de trabalho, o potencial em relação ao eletrodo de referência varia linearmente com o tempo. O eletrodo de referência

⁶ O analito pode alcançar o eletrodo por difusão através de um gradiente de concentração, por convecção com movimentos na solução governados por fenômenos físicos (ebulição, agitação) e por migração, que se dá pela atração ou repulsão de uma superfície carregada.

tem um potencial constante. A corrente medida é aquela que flui entre o eletrodo de trabalho e o terceiro eletrodo, o eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo. As correntes geradas pelas reações redox na superfície do eletrodo de trabalho e do fluxo do contra-eletrodo são correntes faradaicas (HARRIS, 2007). No presente trabalho serão adotadas as técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. A Figura 14 apresenta essas duas técnicas com referentes sinais de excitação e correntes resultantes.

A voltametria cíclica proporciona informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos. Durante a varredura de potencial, o potenciostato mede a corrente versus o potencial aplicado (I vs E) no eletrodo de trabalho em forma de ciclo, das regiões mais positivas (anódicas) para as mais negativas (catódicas) ou vice-versa. As espécies oxidadas geradas no sentido direto são reduzidas no sentido inverso – quando apresentam um processo reversível –, gerando picos separados para a reação de oxidação e de redução, respectivamente, e cada uma delas pode ser caracterizada por um potencial e corrente de pico. Desse modo, a varredura do potencial em ambas as direções fornece informações sobre o comportamento eletroquímico das espécies geradas no eletrodo de trabalho (KISSINGER; LAFAYETTE; HEINEMAN, 1983).

Na técnica de voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho. A corrente é medida antes da aplicação do pulso e depois da aplicação e, instrumentalmente, a primeira é subtraída da segunda. A diferença das correntes é dada versus o potencial aplicado e o voltamograma resultante possui picos de corrente de forma gaussiana onde a concentração do analito é diretamente proporcional à área do pico. Por meio da subtração das duas correntes medidas, é possível corrigir a corrente capacitiva (não-faradaica) gerada. Então, a corrente total de ocorrência na interface eletrodo-solução é medida minimizando a contribuição de correntes de fundo indesejáveis, o que proporciona o aumento de sensibilidade da técnica e justifica a popularidade desse método na detecção em biossensores eletroquímicos (BARD; FAULKNER, 2001).

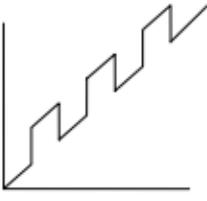
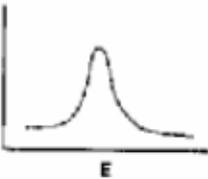
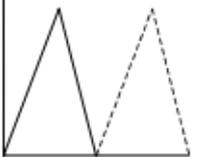
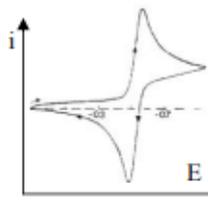
Tipo de voltametria	Sinal de excitação	Corrente resultante
pulso diferencial		
Voltametria cíclica		

Figura 14: Formas de aplicação do potencial para os dois tipos de voltametria. Fonte: (SKOOG, 2005)

1.5 FORMAS DE DETECÇÃO

Os ensaios eletroquímicos para a detecção da biomolécula do biossensor podem ser ministrados de duas formas: direta e indireta. A detecção direta baseia-se na interação direta da molécula bioativa de reconhecimento com o analito (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016). Nesse caso, essa interação biológica é mensurada de forma direta, isto é, a mudança de sinal químico observada na técnica é referente à interação. O método direto apresenta como vantagens tempo de operação mais curto, maior sensibilidade e custos mais baixos (VITORETI, 2014). Nos métodos indiretos, utiliza-se biomoléculas conjugadas como elementos catalíticos, indicadores de interação ou moléculas fluorescentes (STRATIS-CULLUM, 2009). Entretanto, com uma etapa adicional de produção do biossensor, esse método demanda maior custo na síntese e, conseqüentemente maior tempo e possibilidade de perda de reprodutibilidade (ALFONTA; SINGH; WILLNER, 2001).

Nos genossensores, a fita simples (ssDNA), após o processo de interação com o alvo complementar, regenera a dupla fita (dsDNA), num processo denominado de hibridização (Figura 15). Este sinal pode ser detectado de forma direta por meio da oxidação das bases nitrogenadas presentes no DNA. Já a detecção de forma indireta se dá através de intercaladores/indicadores, complexos de coordenação de metais, antibióticos, e outros que formam complexos com as bases nitrogenadas, como o brometo de etídio

(BE), um dos mais conhecidos agentes intercaladores, primeiramente sintetizado por Watkins e Woofle em 1952 (WATKINS, 1952).

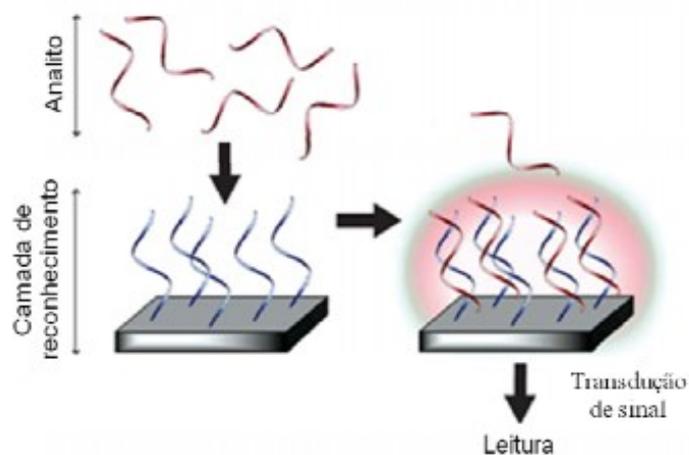


Figura 15: Esquema de um genossensor, fonte: (DRUMMOND; HILLS, 2003)

O BE (Figura 16) é uma substância de baixo custo e possibilita um sistema de fácil construção, visto que a intercalação é imediata e não precisa de mudanças na estrutura do DNA (BUGS, 2001). Seu efeito na detecção ocorre à medida que se liga aos polinucleotídeos por intercalação no par das bases da estrutura de dupla hélice do DNA. (LIU *et al.*, 1996; ERDEM; KERMAN; MERIC, 2000). Isso acontece porque o BE apresenta melhor interação com a dupla fita do DNA (dsDNA), devido ao seu efeito intercalante sobre o DNA hibridizado, no qual ele se encaixa mais facilmente entre os pares de bases da estrutura, sendo deste modo promissor na detecção indireta. Desta forma, com o uso desses elementos, ocorre a detecção, de forma indireta, dos eventos de hibridização por meio da variação dos sinais dos intercaladores (SANTOS, 2014).

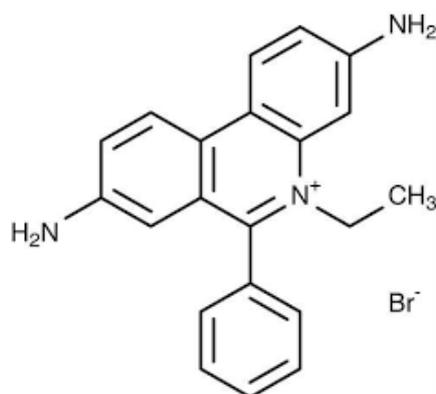


Figura 16: Estrutura do brometo de etídio, fonte: a autora

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de genossensor eletroquímico, baseado em eletrodos de grafite modificados com um copolímero formado a partir da eletropolimerização com os monômeros 4-aminofenol e anilina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

³⁵₁₇ Eletropolimerização de monômeros de 4-aminofenol e anilina, separadamente e em copolímero, sobre eletrodos de grafite;

³⁵₁₇ Estudo e caracterização eletroquímica dos eletrodos de grafite modificados com os polímeros e os copolímeros, pela técnica de voltametria cíclica;

³⁵₁₇ Imobilização e detecção da sonda poliGA⁷ na superfície dos eletrodos de grafite modificados pela técnica de voltametria de pulso diferencial;

³⁵₁₇ Detecção do sinal de hibridização da onda PoliGA com o alvo PoliCT na superfície dos eletrodos de grafite modificados pela técnica de voltametria de pulso diferencial;

³⁵₁₇ Avaliação da resposta eletroquímica do pico da guanina nos eletrodos modificados contendo a sonda, a fim de selecionar qual apresenta melhor resultado para imobilização de biomoléculas;

³⁵₁₇ Determinação dos parâmetros analíticos do genossensor.

⁷ Biomolécula modelo contendo um fragmento de DNA somente com as bases Guanina e Adenina que se ligam especificamente com as bases Citosina e Timina, respectivamente, presente na biomolécula modelo PoliCT, usada como alvo específico.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 SOLUÇÕES PREPARADAS PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

- ³⁵₁₇ Solução estoque⁸ de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,1 mol L⁻¹;
- ³⁵₁₇ Solução de cloreto de potássio (KCl, 99,89%, Neon) 3 mol L⁻¹;
- ³⁵₁₇ Solução de ferro/ferrocianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 99,5%, Fluka Analytical e K₃Fe(CN)₆, 99,0%, Acros Organics) 5 mmol L⁻¹ em meio de solução de KCl 0,1 mol L⁻¹;
- ³⁵₁₇ Solução monomérica de anilina na concentração de 0,1 mmol L⁻¹ em meio de ácido sulfúrico (0,1 mol L⁻¹);
- ³⁵₁₇ Solução monomérica de 4-aminofenol na concentração de 0,1 mmol L⁻¹ em meio de ácido sulfúrico 1 mol L⁻¹;
- ³⁵₁₇ Soluções do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) na concentração de 0,1 mmol L⁻¹, em meio de H₂SO₄ 1 mol L⁻¹, na proporção dos monômeros 1:1, 1:2, 1:4, 2:1, 4:1 para 4-aminofenol:anilina.
- ³⁵₁₇ Solução estoque de tampão fosfato⁹ (monohidrogenofosfato, Na₂HPO₄, 98%, Neon, e dihidrogenofosfato, NaH₂PO₄, 98%, Neon) 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4;
- ³⁵₁₇ Solução estoque de glicina (C₂H₅NO₂) 100,0 mmol L⁻¹.

Todas as soluções mencionadas acima foram preparadas com água deionizada.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

- ³⁵₁₇ Autoclave modelo Vitali 21 L;
- ³⁵₁₇ Deionizador MasterSystem Gehaka;
- ³⁵₁₇ Balança Analítica modelo Shimadzu AY220;
- ³⁵₁₇ Sonicador ultrassônico, modelo Maxclean 1600;
- ³⁵₁₇ Balões volumétricos de volumes apropriados;

⁸ Soluções descritas como estoque foram mantidas sob resfriamento (-12° C para as soluções de biomoléculas e 4° C para as demais soluções). As demais soluções foram preparadas no momento de sua utilização.

⁹ Para o preparo dessa solução, a água utilizada foi previamente autoclavada

- ³⁵/₁₇ *Eppendorf* de volume apropriado;
- ³⁵/₁₇ Micropipetas volumétricas de diferentes volumetrias;
- ³⁵/₁₇ Béqueres;
- ³⁵/₁₇ Espátulas;
- ³⁵/₁₇ Pisseta;
- ³⁵/₁₇ Célula eletroquímica de três compartimentos com capacidade de 25 mL;
- ³⁵/₁₇ Eletrodo auxiliar de platina;
- ³⁵/₁₇ Eletrodo de referência de Ag/AgCl/Cl⁻ (3,0 mol L⁻¹);
- ³⁵/₁₇ Base condutora de latão;
- ³⁵/₁₇ Discos de grafite;
- ³⁵/₁₇ *Lixas d'água 400 e 2000*;
- ³⁵/₁₇ Peça de latão de formato cilíndrico;
- ³⁵/₁₇ Cola adesiva epóxi;
- ³⁵/₁₇ Cola de prata;
- ³⁵/₁₇ Suporte de Teflon;
- ³⁵/₁₇ Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer;
- ³⁵/₁₇ Microscópio eletrônico de varredura (MEV) Tescan modelo Vega3 LMU de emissão de campo;
- ³⁵/₁₇ Metalizador Quorum, modelo Q150ES;
- ³⁵/₁₇ Potenciostato CH *Instruments* modelo 760C.

3.3. MÉTODOS

3.3.1 PREPARAÇÃO DOS ELETRODOS UTILIZADOS E DA CÉLULA ELETROQUÍMICA

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da CH *Instruments* modelo 760C (Figura 17). O potenciostato foi acoplado a um computador contendo *softwares* específicos para o controle dos parâmetros durante a realização dos experimentos e aquisição de dados. As respostas eletroquímicas foram obtidas por meio das técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.



Figura 17: Potenciostato CH instruments modelo 760C.

O sistema eletroquímico usado é composto por uma célula eletroquímica de três compartimentos, para eletrodo de trabalho, referência e contra-eleto, com capacidade de aproximadamente 25mL (Figura 18)

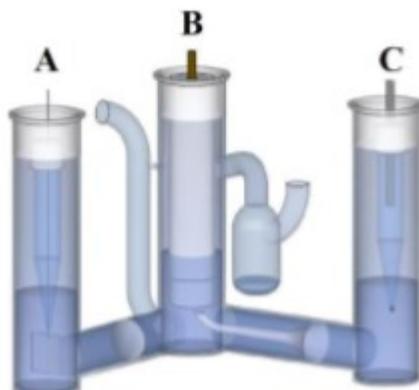


Figura 18: Ilustração esquemática da célula de três compartimentos com (A) eletrodo auxiliar de platina, (B) eletrodo de trabalho de grafite e (C) eletrodo de referência de Ag/AgCl (RODOVALHO, 2014).

O eletrodo de referência (Figura 19a) foi um eletrodo de Ag/AgCl, onde o sal insolúvel de AgCl foi eletrodepositado sobre a prata. A placa foi imersa em solução de KCl 3 mol L⁻¹ contida em uma ponteira azul, revestida em sua ponta com uma membrana

semipermeável de bateria e todo o sistema isolado com Teflon®. O contra-eletródo (Figura 19b) foi artesanalmente fabricado por meio de uma placa de platina, 2 cm² de área geométrica. O contato elétrico foi feito por um fio de cobre colocado no interior de uma ponteira de capacidade de 1 mL (ponteira azul).

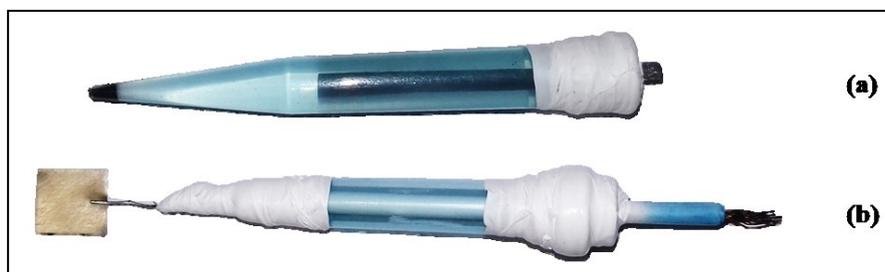


Figura 19: Eletrodo de referência de Ag/AgCl (a) e eletrodo auxiliar de platina (b) e. Fonte: (SEGATTO, 2017)

Os eletrodos de trabalho de grafite foram confeccionados a partir do corte de barras de grafite com pureza de 99,9995% adquiridas da Alfa Aesar. Os discos de grafite resultantes (6 mm de diâmetro e espessura entre 1 – 3 mm) foram colados com cola de prata na superfície de uma peça de latão de formato cilíndrico contendo uma rosca em uma das extremidades e aguardada secagem completa¹⁰. Após a colagem dos discos de grafite, foi feita a verificação da passagem de corrente, utilizando um multímetro. A peça então foi acoplada em um suporte de material polimérico politetrafluoretileno (PTFE) (Teflon®) e fixada com cola epóxi (Araldite®), preenchendo as lacunas entre o latão e o teflon com o auxílio de uma agulha e, por fim, aguardado o tempo da secagem completa. O esquema de produção dos eletrodos é mostrado na Figura 20.



¹⁰ Segundo as instruções contidas na embalagem da cola epóxi (Araldite®), o tempo de secagem completa é de 24 horas.

Figura 20: Preparação dos eletrodos artesanais, fonte: a autora.

O polimento de grafite foi realizado por meio de duas lixas d'água, 400 e 1200 (3M®) e feltro embebido de suspensão de alumina 0,3 μm (Micropolish A, Buehler). Os eletrodos foram lavados com água deionizada e sonicados em banho de ultrassom três vezes por 5 minutos, trocando a água cada vez. Esse procedimento teve o objetivo de remoção da alumina ou quaisquer outros interferentes aderidos à superfície do grafite. A secagem dos eletrodos foi realizada com nitrogênio ultra-puro e posteriormente, para as análises eletroquímicas, foram rosqueados em uma base metálica revestida com teflon para contato elétrico. Os eletrodos prontos foram acoplados a uma base condutora para a realização das análises (Figura 21).



Figura 21 Eletrodos de grafite devidamente preparados acoplados a uma base condutora de latão. Fonte: (SEGATTO, 2017)

Com o intuito de garantir a reprodutibilidade e padronização da área superficial dos eletrodos para procedimentos posteriores, foi feito o pré-condicionamento eletroquímico por voltametria cíclica em solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,1 mol L^{-1} como eletrólito suporte, nas velocidades de 1V s^{-1} , 0,5V s^{-1} , 0,25V s^{-1} , 0,1V s^{-1} e 50 mV s^{-1} , na janela de potencial entre 0,00 V a + 1,20 V, com 10 ciclos de varredura em cada.

3.3.2. SELEÇÃO DOS ELETRODOS DE GRAFITE

Os eletrodos de grafite foram condicionados eletroquimicamente por meio de varreduras de potencial em solução do eletrólito suporte H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} , na qual foram realizados ciclos de potencial até estabilização da corrente não-faradaica, na faixa de potencial de -0,1 V a +1,2 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Os eletrodos foram lavados em água deionizada e secos em fluxo de nitrogênio.

Foi estabelecido, por meio de estudos realizados pela equipe LAFIP – Laboratório de Filmes Poliméricos - que para a obtenção de resultados eletroquímicos reprodutíveis, os valores de corrente entre diferentes eletrodos devem ser próximos a 25

μA . Dessa forma, os eletrodos de grafite que apresentaram diferenças significativas de correntes foram descartados dos testes futuros.

3.3.3. ELETROPOLIMERIZAÇÃO DA POLIANILINA

Os eletrodos de grafite devidamente preparados e selecionados de acordo com o critério estabelecido no item 3.3.2, foram imersos na célula eletroquímica contendo a solução de anilina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), preparada em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um balão volumétrico de 25 mL. A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de $-0,1 \text{ V}$ a $+1,2 \text{ V}$. Foram realizadas as leituras em triplicata, sendo utilizado um eletrodo diferente para cada leitura.

3.3.4. ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO POLI(4-AMINOFENOL)

Os eletrodos de grafite devidamente preparados e selecionados foram imersos na célula eletroquímica contendo a solução de 4-aminofenol ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$), preparada em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) em um balão volumétrico de 25 mL. A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato da CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , na faixa de potencial de $0,0 \text{ V}$ a $+0,8 \text{ V}$. Foram realizadas as leituras em triplicata, sendo utilizado um eletrodo diferente para cada leitura.

3.3.5. ELETROPOLIMERIZAÇÃO DO COPOLÍMERO

Inicialmente, o copolímero foi eletropolimerizado nos eletrodos de grafite utilizando uma solução monomérica contendo uma proporção 1:1 dos monômeros, na concentração de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Posteriormente, foram adotadas diferentes metodologias e proporções (1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1) dos monômeros 4-aminofenol:anilina, a fim de otimizar os resultados.

A eletropolimerização foi realizada em um potenciostato da CH *Instruments* modelo 760C com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} e foram realizadas as leituras em triplicata de cada concentração.

3.3.6. CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DO COPOLÍMERO POLI(ANILINA-4-AMINOFENOL) E DOS POLÍMEROS POLIANILINA E POLI(4-AMINOFENOL)

Após cada etapa de modificação, os eletrodos de grafite foram submetidos a varreduras de potencial em H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) fazendo-se ciclagens até estabilização da

corrente, na faixa de potencial inicialmente realizada no eletrodo de grafite (EG) antes da modificação (-0,1 V a +1,2 V). Essa varredura permitiu efetuar a avaliação do perfil eletroquímico dos EG modificados, que passaram a ser usados como critérios para a escolha dos eletrodos a serem utilizados nas próximas etapas, sendo que os eletrodos que apresentaram um perfil distorcido foram descartados.

Também foi realizada voltametria cíclica em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ 5 mmol L⁻¹ após cada etapa de modificação da superfície com os filmes. Os parâmetros como faixa de potencial, velocidade de varredura e número de ciclos foram os mesmos utilizados nos estudos com o eletrodo de grafite sem modificação.

3.3.7. CARACTERIZAÇÕES ESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS DO COPOLÍMERO POLI(ANILINA-4-AMINOFENOL) E DOS POLÍMEROS POLIANILINA E POLI(4-AMINOFENOL)

A leitura das medidas de infravermelho foi realizada em um espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range - MIR da PerkinElmer (Figura 22), pertencente ao Grupo de Materiais Inorgânicos do Triângulo (GMIT) localizado no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM) do Instituto de Química da UFU. As análises das amostras foram feitas no estado sólido, com a utilização do acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) com cristal de diamante. Foram obtidos espectros na região compreendida entre 4000 e 400 cm⁻¹.



Figura 22: Espectrofotômetro FT-IR FRONTIER SINGLE RANGE - MIR da Perkin Elmer, fonte: a autora.

Análises da morfologia do copolímero e dos polímeros foram efetuadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura Tescan modelo Vega3 LMU de emissão de campo (Figura 23a), do Laboratório Multiusuário do IQ-UFU, onde ampliações de até 30 000 vezes foram registradas. As amostras foram metalizadas com ouro por um revestidor de pulverização Quorum 150 R (Figura 23b). Para realizar a análise de microscopia eletrônica de varredura, os EG modificados foram armazenados em atmosfera de nitrogênio até o momento da análise.

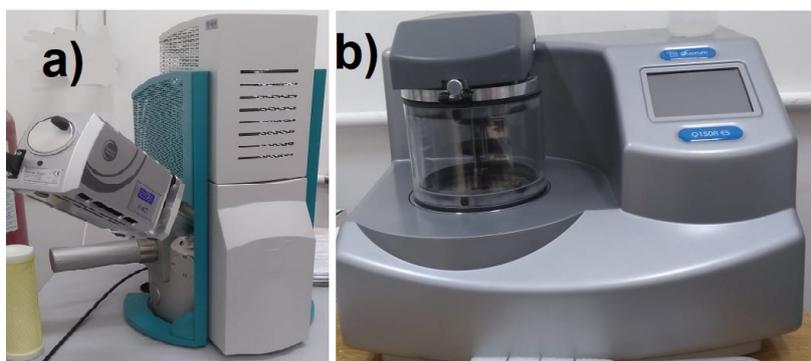


Figura 23: MEV TESCAN modelo VEGA3 LMU (a) e revestidor de pulverização quorum 150 R (b),
fonte: a autora

3.3.8. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DIRETA DA Sonda E Sonda/ALVO UTILIZANDO POLIGA/POLICT

As soluções estoque de poliGA e poliCT na concentração 10^{-4} g/mL foram diluídas em tampão citrato de sódio ($0,03 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{NaCl } 0,3 \text{ mol L}^{-1}$) na concentração de 10^{-5} e 3×10^{-5} g/mL, respectivamente. Nos eletrodos modificados com o copolímero foram gotejados $10 \mu\text{L}$ da solução da sonda de forma uniforme na superfície e mantidos hermeticamente fechados em temperatura ambiente por 30 minutos, tempo esse para que ocorra adsorção física da sonda à plataforma de EG/poli(4-aminofenol-anilina). Seguidamente, os eletrodos EG/poli(4-aminofenol-anilina) foram lavados por 5 segundos cronometrados, imersos em tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), de modo que haja remoção de sondas que não adsorveram na plataforma. Após a lavagem, os eletrodos foram secos em temperatura ambiente e gotejados $20 \mu\text{L}$ de solução de glicina 1% (100 mmol L^{-1}), que atua como bloqueio da sonda na superfície do eletrodo, e deixados na estufa em temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Após esse tempo, outra lavagem de 5

segundos foi realizada. No final dessa primeira etapa, foi feita a detecção da sonda por meio do monitoramento do pico da guanina por voltametria de pulso diferencial (VPD) antes e após hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de $30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ em solução de tampão fosfato de sódio. O processo de preparo do eletrodo para a detecção direta da sonda é mostrado na Figura 24.

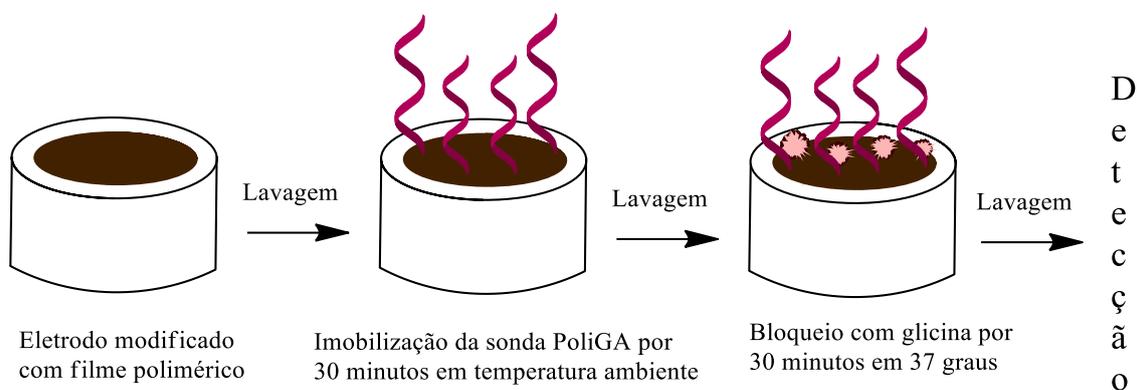


Figura 24: Processo de preparo do eletrodo para detecção direta da sonda, fonte: a autora.

Para a detecção do alvo, foi efetuado o mesmo procedimento anterior, entretanto, depois de finalizar a lavagem da glicina, os eletrodos foram deixados secar a temperatura ambiente e, então, já sensibilizados com a sonda, foram gotejados $20 \mu\text{L}$ do alvo de forma uniforme na superfície e submetidos a 55°C por 20 minutos, permitindo que o sistema esteja em temperatura ótima de anelamento entre sonda e alvo, isto é, que ocorra a hibridização. Após esse período, os eletrodos foram lavados por 5 segundos imersos em tampão fosfato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), para remoção de biomoléculas que não se anelaram à sonda. No final dessa segunda etapa, foi feita a detecção do alvo através do monitoramento do pico da guanina por voltametria de pulso diferencial (VPD) antes e após hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de $30 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ em solução de tampão fosfato de sódio. O processo de preparo do eletrodo para a detecção direta da sonda/alvo é mostrado na Figura 25.

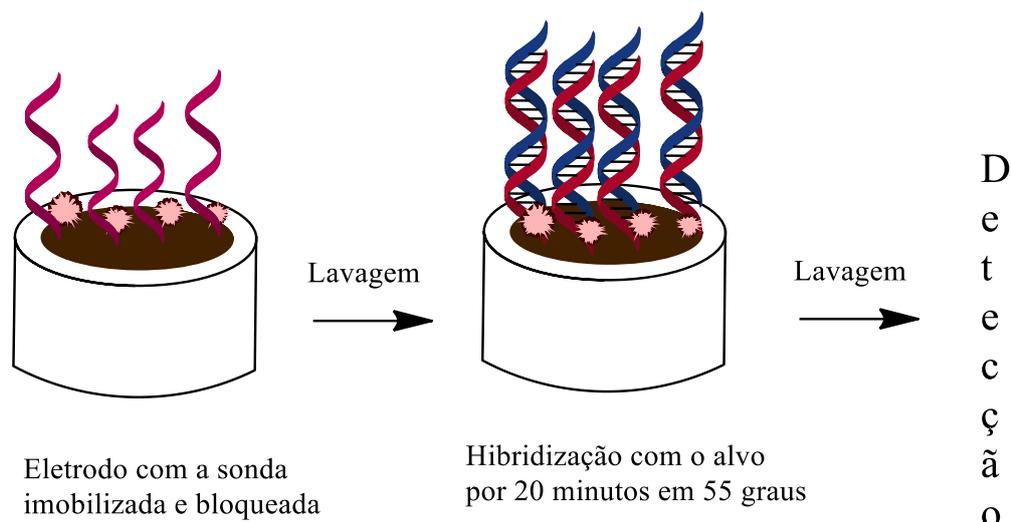


Figura 25: Processo de preparo do eletrodo para detecção direta da sonda/alvo, fonte: a autora.

Ambos os testes de detecção da sonda e sonda/alvo foram realizados para os eletrodos modificados com os polímeros poli(4-aminofenol) e polianilina, utilizando as metodologias de polimerização por voltametria cíclica de 10 ciclos de varredura e 20 ciclos de varredura, visando comparação de resultados.

3.3.9. DETECÇÃO ELETROQUÍMICA INDIRETA DA SONDA E SONDA/ALVO UTILIZANDO POLIGA/POLICT

O mesmo procedimento de imobilização de sonda e sonda/alvo nos eletrodos modificados com dois dos copolímeros que apresentaram melhor resultado na detecção direta, proporção 1:1 dos monômeros e metodologia com 10 ciclos de varredura na segunda parte e proporção 1:2 com excesso de anilina e metodologia com 20 ciclos de varredura de potencial na segunda parte, foi realizado para a detecção indireta. Para isso, foi utilizado o intercalador brometo de etídio, sendo gotejados 20 μL na superfície do eletrodo após as etapas um (imobilização da sonda e bloqueio) e dois (imobilização da sonda bloqueio e imobilização do alvo), para detecção da sonda e da sonda/alvo. Depois do gotejamento, os eletrodos foram deixados no escuro em temperatura ambiente por dez minutos e, por fim, lavados por 5 segundos imersos em água deionizada e detectados. Foi monitorado o pico do brometo de etídio por voltametria de pulso diferencial (VDP) antes e após hibridização com modulação de amplitude de 25 mV, intervalo de pulso 0,2 s e velocidade de 30 mV s^{-1} em solução de tampão fosfato de sódio. O processo de preparo do eletrodo para a detecção indireta da sonda e da sonda/alvo é mostrado na Figura 26.

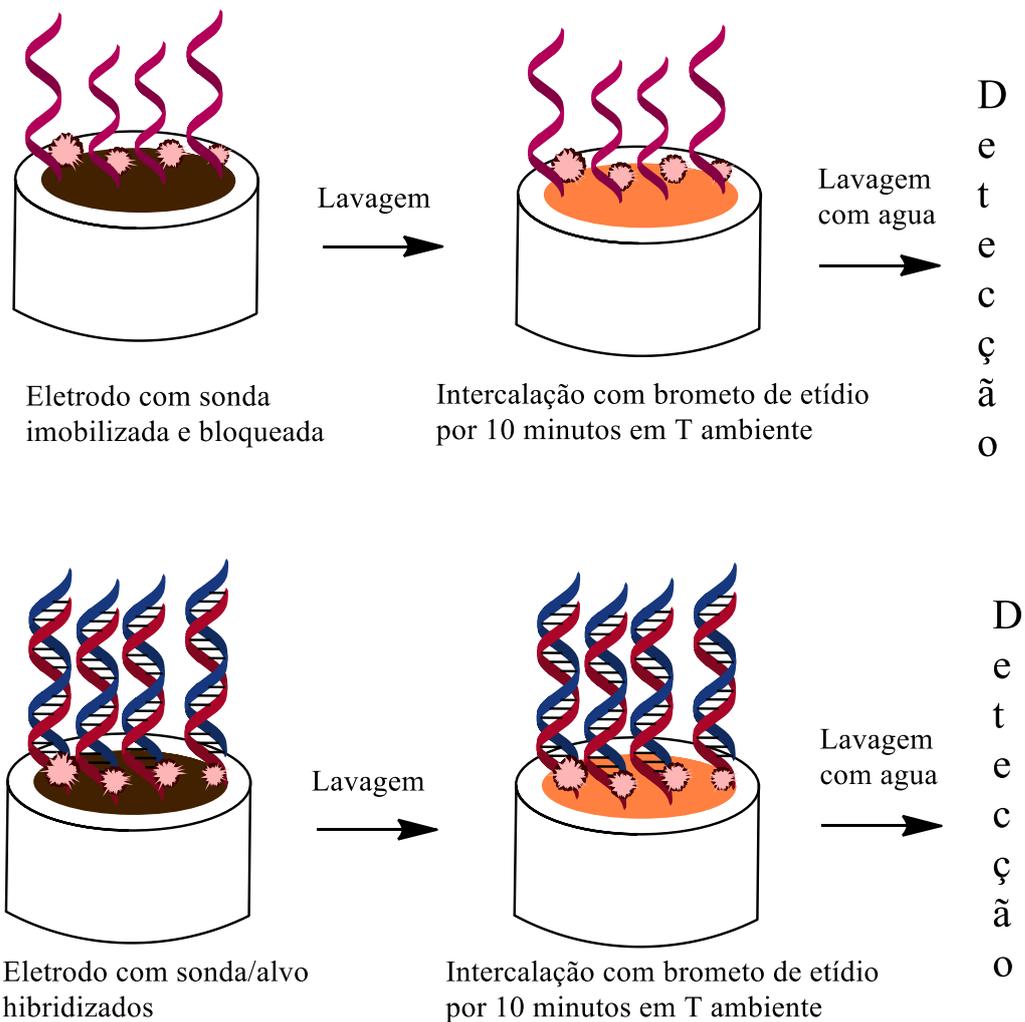


Figura 26: Processo de preparo do eletrodo para detecção indireta da sonda e sonda/alvo, fonte: a autora.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS ELETRODOS DE GRAFITE

Conforme abordado em Materiais e Métodos (item 3.3.2), para que os eletrodos de grafite estejam aptos para trabalho, é necessário que os valores de corrente entre diferentes eletrodos sejam próximos a $25 \mu\text{A}$ e apresentar um perfil voltamétrico o mais linear possível, sem picos. Para avaliar o perfil eletroquímico dos eletrodos, além de eliminar possíveis interferentes, impurezas que eventualmente possam estar adsorvidas nas superfícies dos eletrodos e que sejam eletroativas na faixa de potencial trabalhada e

que possam, de alguma forma, comprometer os resultados do presente trabalho, foi utilizado o pré-condicionamento eletroquímico através de voltametrias cíclicas em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O perfil típico dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite aptos para uso e não aptos estão expressos na Figura 27a e 27b, respectivamente.

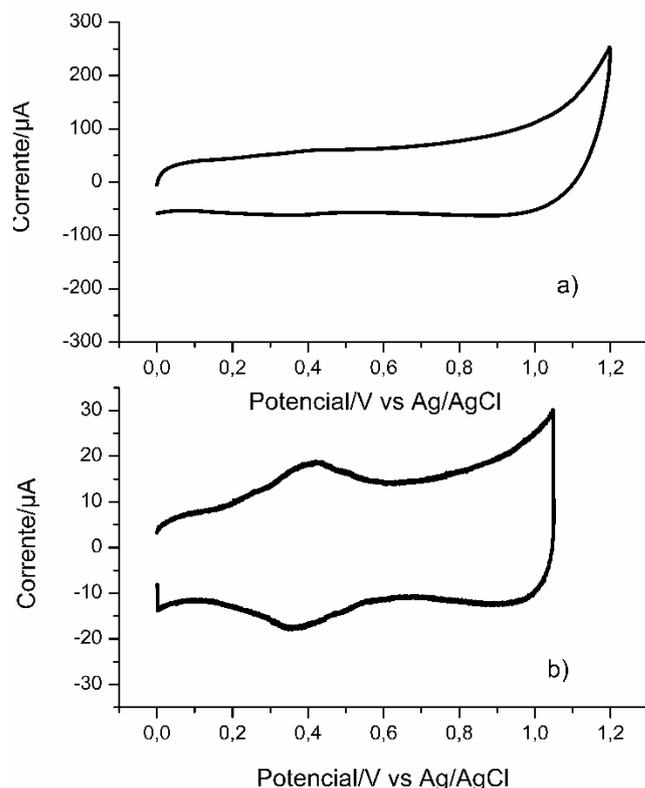


Figura 27: Exemplos de voltamogramas cíclicos apto para uso (a) e não apto (b) dos EG em solução de H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$), velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

Durante o desenvolvimento do trabalho, somente os eletrodos de grafite que apresentaram o perfil eletroquímico típico da Figura 27b foram escolhidos para a realização dos testes, com o intuito de promover a padronização e reprodutibilidade dos resultados posteriores.

4.2 CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA DOS POLÍMEROS POLIANILINA E POLI(4-AMINOFENOL) E COPOLÍMERO INICIAL

Foi realizada a eletropolimerização dos filmes em triplicata, sendo um primeiro procedimento partindo da solução com o monômero de 4-aminofenol $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, um

segundo procedimento partindo da solução monomérica de anilina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e um terceiro partindo dos dois monômeros numa proporção molar de 1:1, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 10 ciclos de varredura. O perfil voltamétrico de polimerização da polianilina está elucidado na Figura 28.

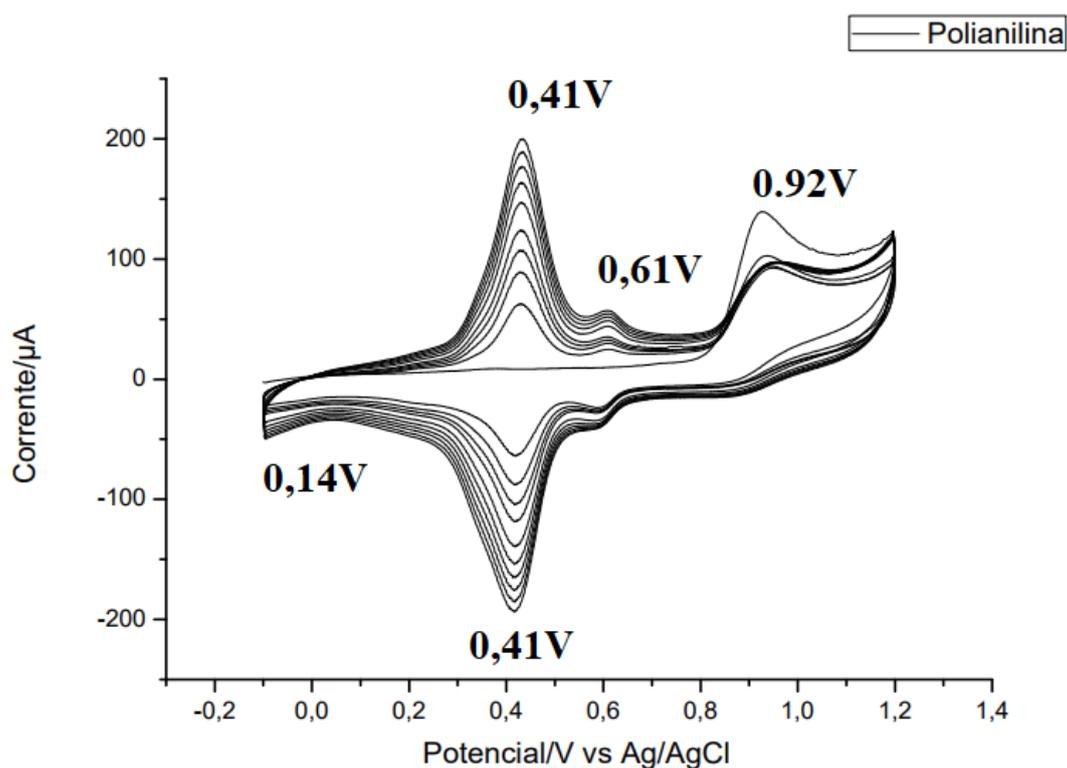


Figura 28: Eletropolimerização da anilina, em concentração $1,0 \text{ mmol l}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, 10 ciclos de varredura e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} .

A partir da análise do voltamograma da polimerização da anilina, mostrado na figura 28, pode-se observar um pico em $+0,92 \text{ V}$, referente a oxidação do monômero e picos característicos, com pares de oxi-redução em $+0,41 \text{ V}$ e $+0,41 \text{ V}$, além de um pico largo e de baixo valor de corrente centrado em $+0,61 \text{ V}$, valores similares aos encontrados na literatura (ZARAGOZA et al., 2006). O perfil voltamétrico de polimerização do poli(4-aminofenol) está elucidado na Figura 29.

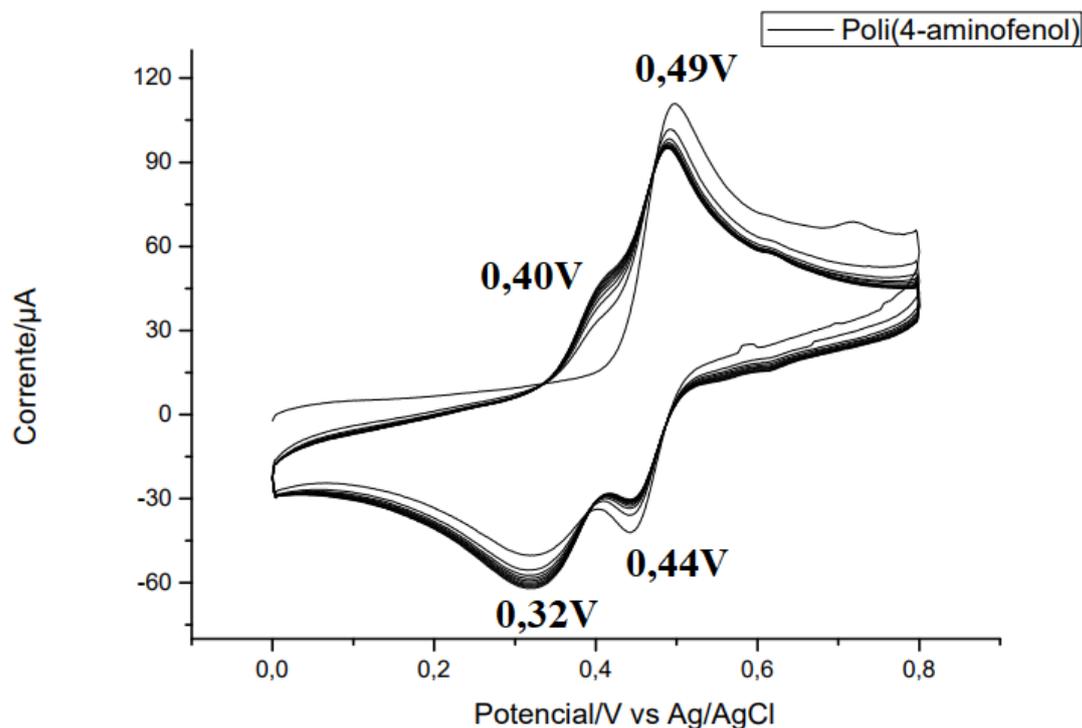


Figura 29: Eletropolimerização de 4-aminofenol, em concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando como eletrólito suporte ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos de varredura de potencial, 50 mV s^{-1} .

Já na eletropolimerização do 4-aminofenol, observa-se o par redox em $+0,49 \text{ V}$ e $+0,44 \text{ V}$, referentes ao processo reversível de oxirredução do 4-aminofenol e outro par nos potenciais de $+0,40 \text{ V}$ e $+0,32 \text{ V}$, alusivos à formação do poli(4-aminofenol).

A partir desses dados eletroquímicos dos polímeros sintetizados com os monômeros separadamente, também foi produzido um copolímero inicial utilizando a mesma metodologia, 10 ciclos de varredura e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} , e as mesmas concentrações monoméricas citadas anteriormente, $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, numa mistura de proporção molar de 1:1 em meio de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Esse copolímero foi denominado copolímero 1 e teve como finalidade a análise e comparação propedêutica com os polímeros polianilina e poli(4-aminofenol) nas mesmas condições, para embasar o estudo aprofundado do desenvolvimento dos próximos copolímeros.

O copolímero inicial, cujo voltamograma de polimerização está expresso na Figura 30, apresentou um perfil de eletropolimerização bastante similar ao da polianilina, porém com a presença do pico de oxidação do 4-aminofenol e o alargamento do pico em $0,4 \text{ V}$ referente à sobreposição dos picos de oxidação e redução da polianilina e do poli(4-aminofenol).

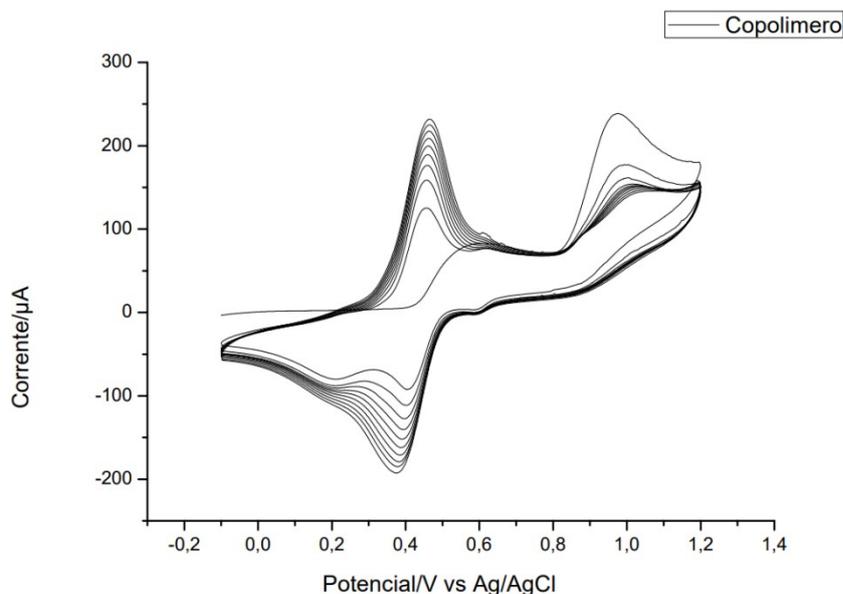


Figura 30: Eletropolimerização do copolímero 1, em concentração $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ dos monômeros, em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 10 ciclos de varredura de potencial, 50 mV s^{-1} .

É possível visualizar um leve alargamento e um aumento significativo no valor de corrente, visto na Figura 31, na qual estão relacionados os perfis dos três filmes produzidos, considerando apenas o décimo voltamograma cíclico de eletrodo de grafite em H_2SO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pós polimerização. Esse aumento no valor de corrente condiz com o esperado pela proposta de modificação e potencialização da superfície do eletrodo utilizando a junção dos monômeros, isto é, indica que a presença da anilina e do 4-aminofenol na proporção 1:1 favorece o processo de eletropolimerização do filme poli(anilina-4-aminofenol), uma vez que a anilina teoricamente possui uma melhor polimerização devido ao menor impedimento estérico na sua estrutura, possibilitando maior disposição para sofrer ataque dos monômeros. Esse resultado pode ser observado pelo aumento da área do voltamograma, como mostra o aumento na intensidade de corrente, sugerindo a formação de uma maior quantidade de filme polimérico eletroativo.

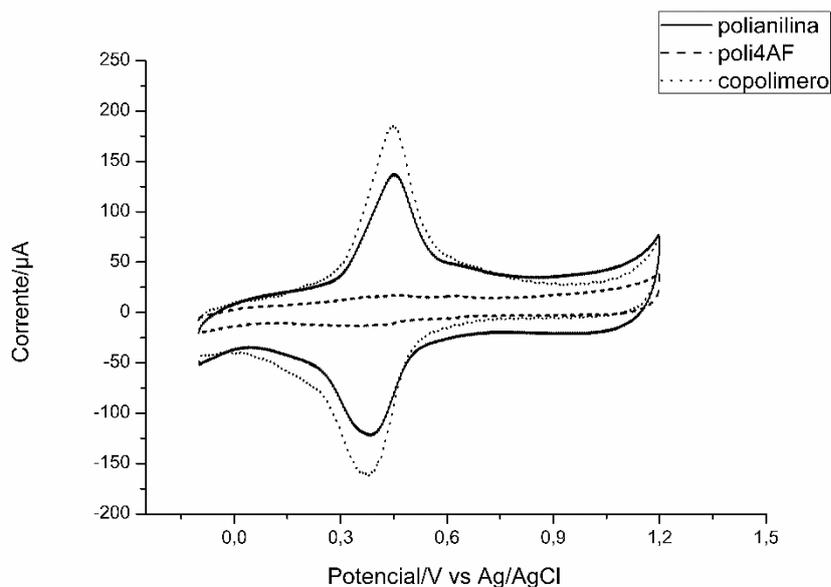


Figura 31: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} do eletrodo de grafite modificado com o copolímero 1 e os eletrodos de grafite modificados com a polianilina e o poli(4-aminofenol).

Para avaliar o processo de transferência de elétrons foram obtidos por voltametria cíclica os voltamogramas em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para os EG/polianilina, EG/poli(4-aminofenol) e EG/poli(anilina-4-aminofenol) (Figura 32). A avaliação do processo de transferência eletrônica utilizando a sonda aniônica mostrou que a combinação dos monômeros no copolímero leva a um eletrodo modificado com o copolímero que se apresenta como intermediário entre a polianilina e o poli(4-aminofenol), quanto a transferência eletrônica entre o par redox e o eletrodo modificado, resultante da junção dos dois polímeros iniciais. Desta forma, o copolímero se torna promissor para a aplicação em modificação de eletrodos, porque, além de apresentar uma transferência eletrônica adequada, também apresenta maior quantidade de grupos funcionais expostos, o que otimiza a etapa de biofuncionalização ao ter maior possibilidade de interação entre superfície do eletrodo e biomoléculas, ou seja, melhor imobilização de biomoléculas.

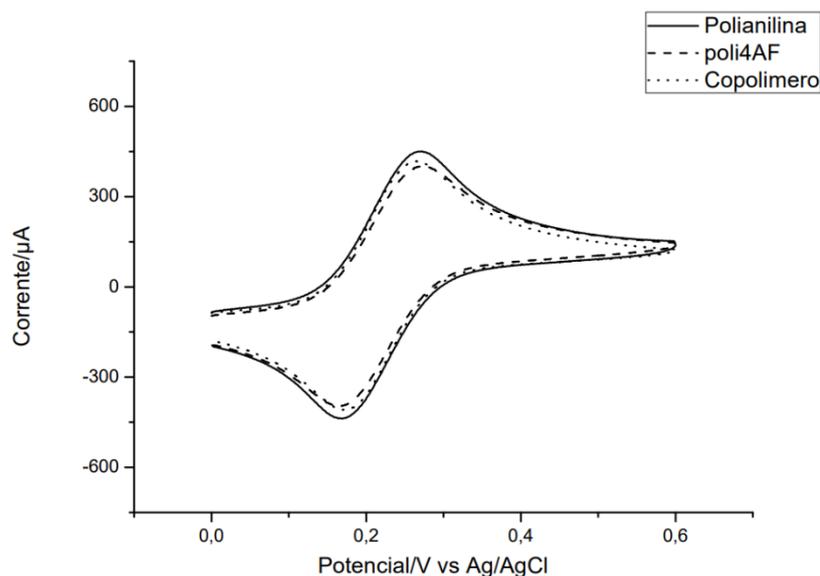


Figura 32 Últimos ciclos voltamétricos dos EG contendo do eletrodo de grafite modificado com o copolímero 1 e os eletrodos de grafite modificados com a polianilina e o poli(4-aminofenol), em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mmol l-1 em meio de KCl 0,1 mol l-1, 50 mv s-1

Com base nesses dados, foi possível embasar o estudo de otimização de produção dos copolímeros com maior profundidade no perfil eletroquímico, elucidado a seguir.

4.3 PRIMEIRA PARTE DO ESTUDO DE DIFERENTES PARÂMETROS METODOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DOS COPOLÍMEROS.

4.3.1 PRODUÇÃO DOS FILMES EM DIFERENTES POTENCIAIS E CICLOS DE VARREDURAS ADOTADOS E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.

Para o estudo dos copolímeros seguintes foi adotado o intervalo de varredura de potencial entre 0,0V a +1,05V e entre 0,0V a +0,65V, intervalo escolhido por meio da análise de voltamogramas de eletropolimerização do poli (4-aminofenol), da polianilina e do copolímero nas mesmas condições, a fim de restringir o intervalo de potencial que delimita a formação apenas do copolímero e evitar a redução e oxidação de outros elementos. Essa otimização foi aplicada no copolímero inicial para fins de padronização. Desta forma, foi efetuado um estudo com diferentes ciclos de varredura e intervalo de potencial para avaliar as propriedades dos copolímeros produzidos, cada metodologia adotada está expressa na Tabela 1:

Copolímero	Intervalo de potencial (V)	Número de ciclos de varredura (n)
1 [inicial]	0,0V – 1,05V	10
2	0,0V – 0,65V	10
3	Etapa 1: 0,0V – 1,05V Etapa 2: 0,0V – 0,65V	Etapa 1: 3 Etapa 2: 10
4	Etapa 1: 0,0V – 1,05V Etapa 2: 0,0V – 0,65V	Etapa 1: 3 Etapa 2: 20
5	Etapa 1: 0,0V – 1,05V Etapa 2: 0,0V – 0,65V	Etapa 1: 3 Etapa 2: 50
6	Etapa 1: 0,0V – 0,65V Etapa 2: 0,0V – 1,05V	Etapa 1: 5 Etapa 2: 5

Tabela 1: Metodologias adotadas para a eletropolimerização dos copolímeros.

Nas eletropolimerizações 3 a 6 foram adotadas duas etapas, uma com o intervalo de potencial que finda ao atingir o potencial de oxidação do 4-aminofenol e a outra com o potencial até a oxidação do monômero da anilina. Ao restringir a faixa de potencial até a oxidação do 4-aminofenol em uma solução que contém os dois monômeros, o objetivo foi propiciar a formação do poli(4-aminofenol), entretanto com a possibilidade de moléculas de anilina serem atacadas e incorporadas à estrutura polimérica. Por outro lado, ao aumentar a faixa de potencial até a oxidação da polianilina, ambos os monômeros são oxidados e ambos atacam na formação do polímero.

Quando se compara todos os voltamogramas finais em solução de ácido sulfúrico pós polimerização (Figura 33), é possível observar o aumento da área eletroativa nos eletrodos 1 e 6, indicando maior condutividade em relação aos outros eletrodos, resultado justificado por uma melhor formação e distribuição superficial dos filmes na área do eletrodo. O aumento da área eletroativa é visualizado pelo alongamento dos picos de oxirredução do copolímero, proporcionando um perfil voltamétrico semelhante ao da polianilina, sendo um indicativo de maior concentração dos monômeros da anilina do que

do 4-aminofenol na estrutura polimérica. Como o intuito da utilização da anilina no processo de polimerização é distanciar os monômeros do 4-aminofenol para melhor alocação das biomoléculas entre eles, atuando como um espaçador, e considerando que a estrutura idealizada do copolímero seria os dois monômeros diferentes intercalados, uma concentração maior de monômeros da anilina poderia influenciar negativamente a imobilização de biomoléculas, uma vez que é o 4-aminofenol que apresenta melhor potencial para fazê-la por conter dois grupos funcionais em sua estrutura: grupo amino e a hidroxila.

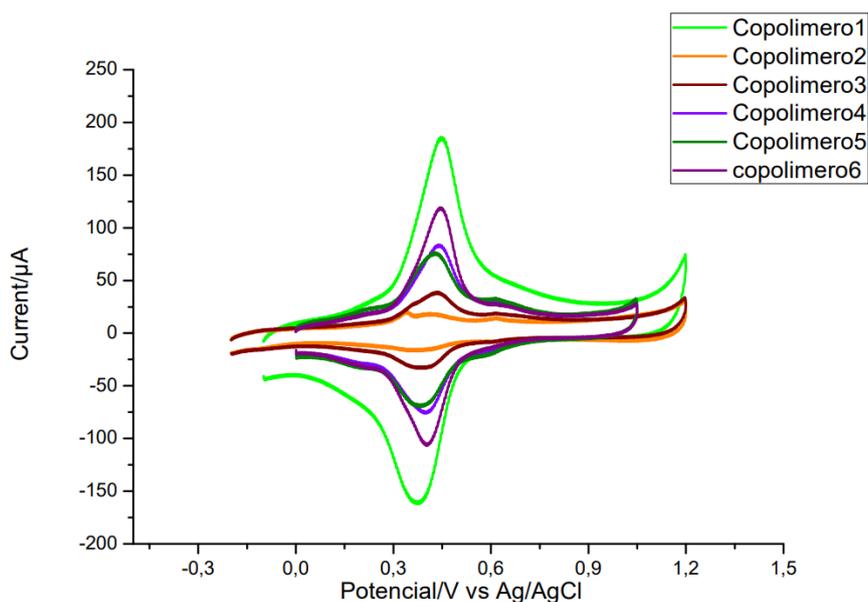


Figura 33: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (vide Tabela 1).

A partir do teste de transferência de elétrons, realizado em solução $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} (Figura 34), foi observado um caráter mais condutor, principalmente do filme produzido do copolímero 2, mas também nos copolímeros 1 e 3. Os filmes dos copolímeros 4 e 5 apresentaram maior resistência a transferência de elétrons, o que indica maior formação de filme na superfície, já que ambos apresentaram um perfil em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ muito similar, sendo que o copolímero 6, foi o terceiro mais resistivo.

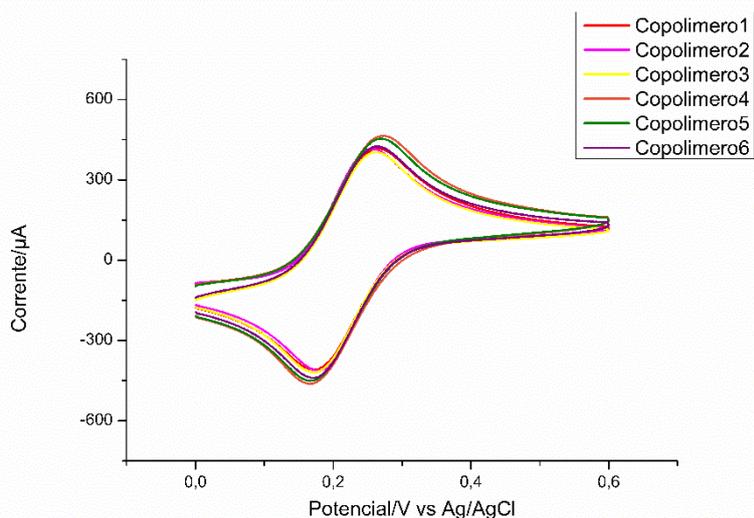


Figura 34: Últimos ciclos voltamétricos dos EG contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polimerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1}

Os valores de potencial dos picos e respectivas correntes são mostrados na Tabela 2. Com esses valores é possível calcular o intervalo de potencial entre um pico e outro para avaliar o caráter resistivo dos copolímeros.

Copolímero	Potencial do pico anódico (V)	Corrente do pico anódico (A)	Potencial do pico catódico (V)	Corrente do pico catódico (A)
1	0.266	$4.490 \cdot 10^{-4}$	0.173	$-4.485 \cdot 10^{-4}$
2	0.256	$4.562 \cdot 10^{-4}$	0.176	$-4.580 \cdot 10^{-4}$
3	0.262	$4.120 \cdot 10^{-4}$	0.170	$-4.593 \cdot 10^{-4}$
4	0.271	$4.671 \cdot 10^{-4}$	0.165	$-4.762 \cdot 10^{-4}$
5	0.271	$4.610 \cdot 10^{-4}$	0.165	$-4.760 \cdot 10^{-4}$
6	0.267	$4.263 \cdot 10^{-4}$	0.168	$-4.717 \cdot 10^{-4}$

Tabela 2: Dados obtidos nos últimos ciclos de voltametria dos eletrodos de grafite contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polimerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1}

Analisando os voltamogramas em solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ após a polimerização dos copolímeros 3, 4 e 5 foi observada uma área eletroativa mediana quando adota-se 10 ciclos na segunda etapa da polimerização, seguido por um aumento

da área eletroativa ao adotar 20 ciclos e uma estabilização em 50 ciclos de potencial na segunda etapa de polimerização (Figura 35)

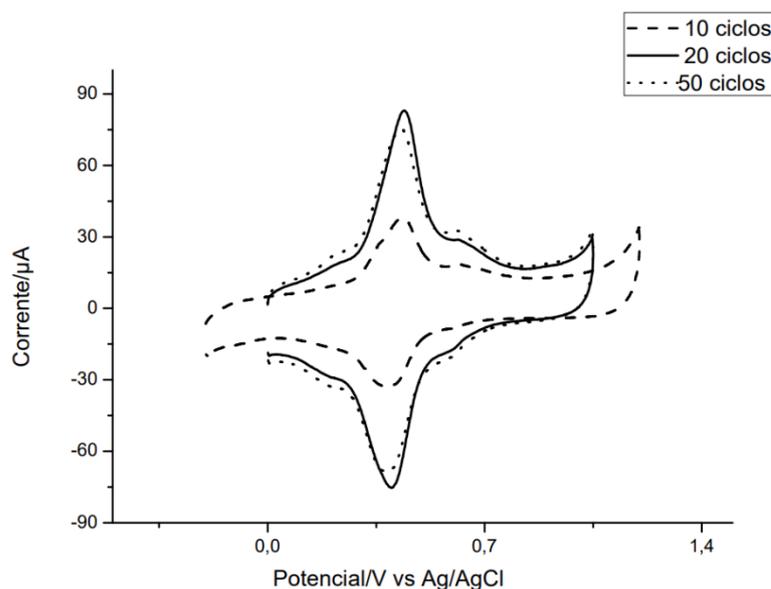


Figura 35: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 3, 4, e 5.

Esse resultado condiz com o esperado devido a maior quantidade de filme formado com o aumento do número de varreduras de potencial. Entretanto, pode-se dizer que ocorreu uma estabilização da área superficial entre os 20 e 50 ciclos de potencial, pois ambos apresentaram perfis semelhantes. O voltamograma de polimerização da primeira etapa está expresso na Figura 35a e as segundas etapas nas Figuras 36b1, 36b2 e 36b3 para 10, 20 e 50 ciclos, respectivamente. Na Figura 36a, observa-se uma diminuição na corrente do pico de oxidação da anilina e do 4-aminofenol nas varreduras, o que indica o consumo do monômero na solução, enquanto nos picos redox do poli(4-aminofenol) e polianilina, que estão sobrepostos, aumenta-se a intensidade da corrente, indicando a maior produção de filme. Nos voltamogramas b1, b2 e b3 da Figura 36, o mesmo comportamento é observado para os picos redox da polianilina e poli(4-aminofenol), que tem a intensidade de corrente aumentada.

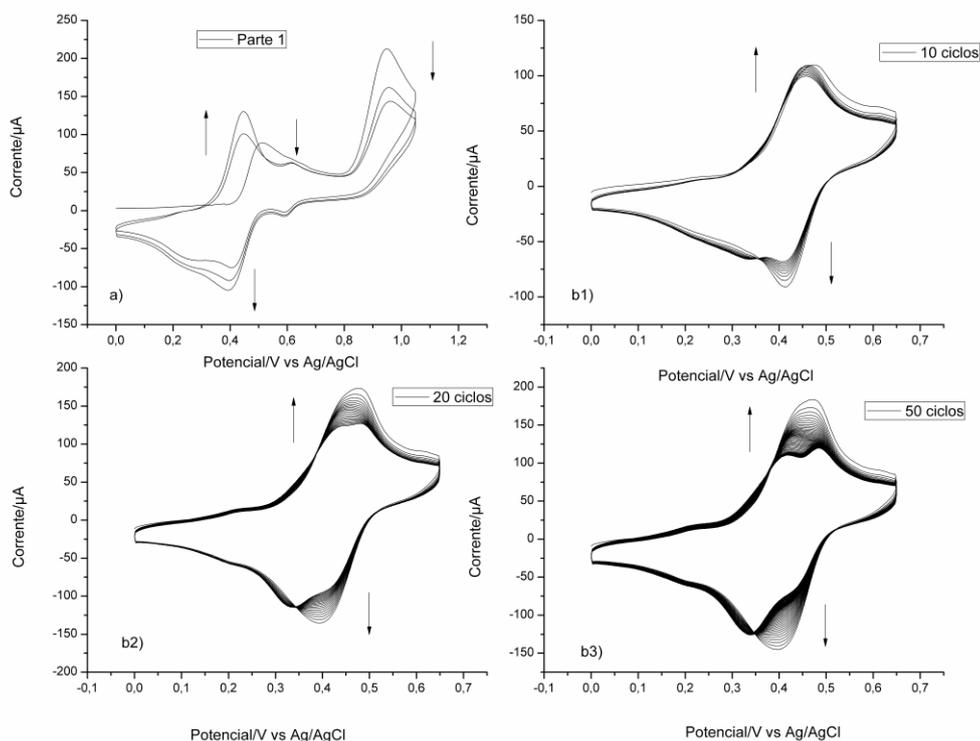


Figura 36: Voltamogramas de polimerização da etapa 1 – a) - e etapa 2 – b1, b2 e b3, dos copolímeros de número 3, 4 e 5, respectivamente.

O voltamograma de polimerização dos copolímeros 2 está expresso na Figura 37. A faixa de potencial adotada – 0,0 V a 0,65 V – alcança somente a oxidação do monômero 4-aminofenol. Desta forma, observa a queda de intensidade da corrente de pico referente ao processo redox reversível do 4-aminofenol – consumo do monômero - e o aumento da intensidade de pico de corrente referente ao processo redox do filme – maior produção de filme na superfície do eletrodo.

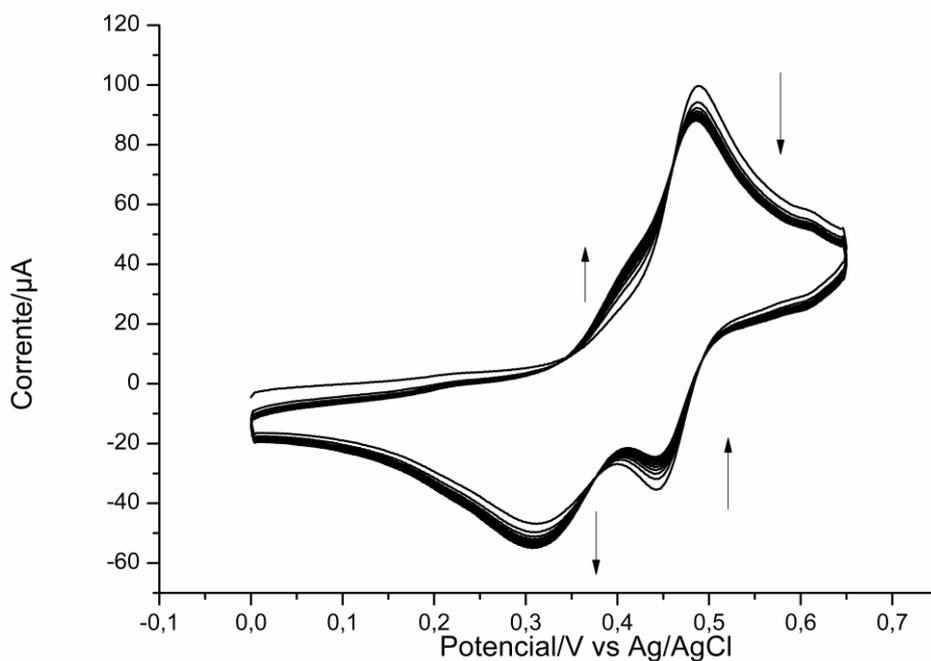


Figura 37: Voltamograma de polimerização do copolímero 2.

Os voltamogramas de polimerização do copolímero 6 estão expressos na Figura 38. A primeira etapa da polimerização abrange somente a faixa de potencial da oxidação do 4-aminofenol, enquanto a etapa dois abrange a faixa de potencial que ocorre a oxidação dos dois monômeros – anilina e 4-aminofenol. Na parte 1, observa-se a queda da intensidade do pico de corrente referente apenas do processo redox do 4-aminofenol, enquanto na parte 2 é possível visualizar também o pico de oxidação da anilina – devido à faixa de potencial – e sua respectiva queda de intensidade. Em ambas as parte ocorre o aumento de intensidade dos picos de processo redox do polímero.

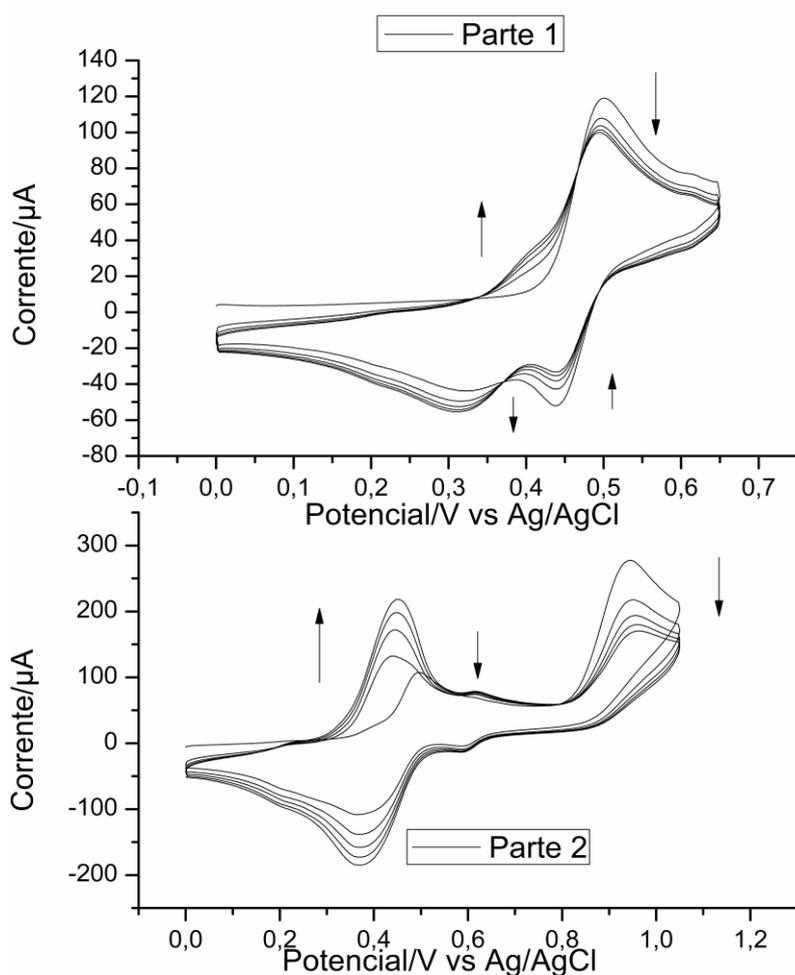


Figura 38: Voltamogramas de polimerização do copolímero 6.

4.3.2. ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO (IV) DOS COPOLÍMEROS POLI(ANILINA-4-AMINOFENOL) E DOS FILMES POLIANILINA E POLI(4-AMINOFENOL).

Os eletrodos modificados com filmes de polianilina e poli(4-aminofenol) foram caracterizados por espectroscopia vibracional na região do Infravermelho. Essa caracterização foi crucial para a análise dos copolímeros. Os espectros de infravermelho para dos filmes estão expressos na Figura 39 e as tabelas com as atribuições das principais absorções dos espectros nas Tabelas 3 e 4.

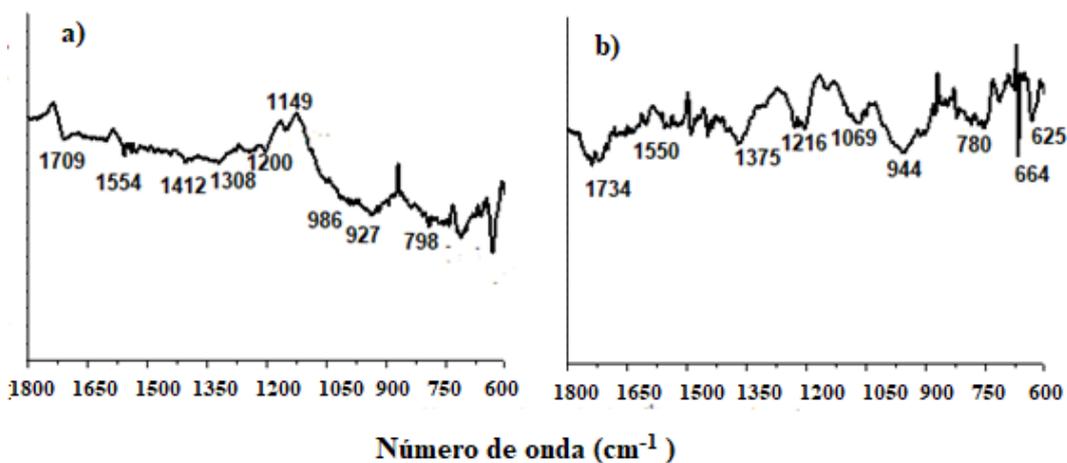


Figura 39: Espectro de infravermelho para polianilina (a) e poli(4-aminofenol) (b).

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição
798	Anel aromático (deformação angular de 5 H adjacentes (anéis monossustituídos))
927	HC=CH
986	Anel aromático (estiramento de baixa intensidade)
1149	N-H
1200	Vibrações de desdobramento C-H
1216	
1308	C-N (aromáticos)
1412	C=C de aromáticos
1554	N-H (Banda fraca de deformação angular)
1709	Dobramento N-H

Tabela 3: Atribuições das principais absorções do espectro da polianilina, fonte: a autora

Banda (cm ⁻¹)	Atribuição
625	Anel aromático (2 H adjacentes (anéis para-substituídos))
664	
780	Estiramento N-H
944	O-H (Banda larga (deformação angular) de média intensidade, devido à deformação angular)
1069	Estiramento C-O-C
1216	Dobramento C-O
1375	C-N (aromáticos)
1550	C=C de aromáticos
1734	Dobramento N-H

Tabela 4: Atribuições das principais absorções do espectro do poli(4-aminofenol), fonte: a autora

A fim de verificar as informações estruturais dos filmes em questão, principalmente seus grupos funcionais, e as diferenças observadas de um copolímero para o outro, também foram realizadas análises por espectroscopia vibracional na região do infravermelho para os copolímeros poli(anilina-4-aminofenol) (Figura 38).

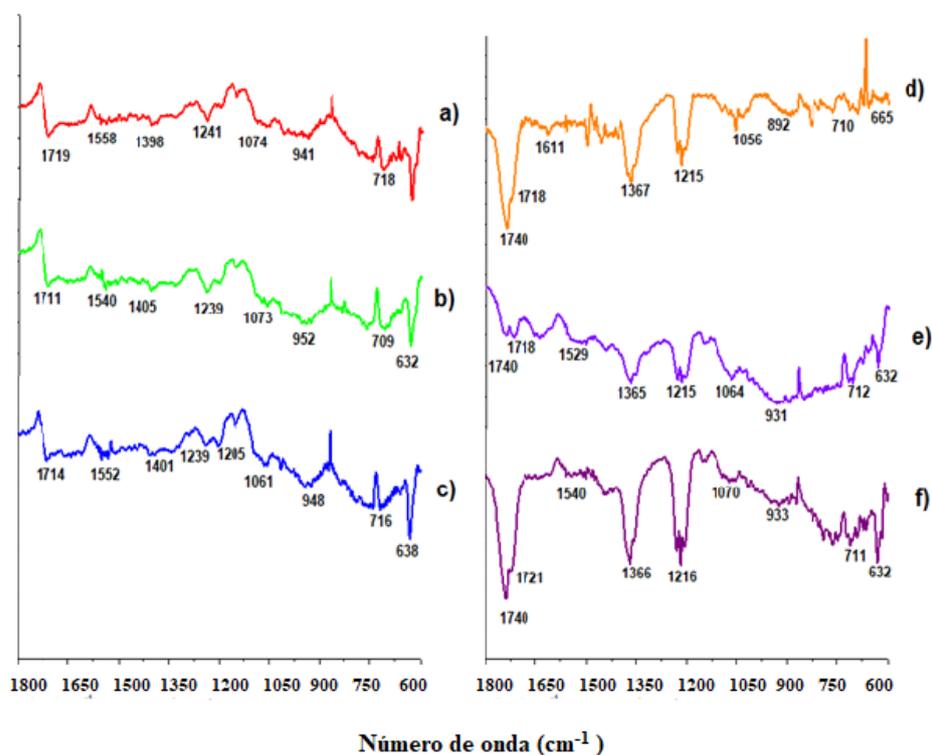


Figura 40: Espectro de infravermelho para os copolímeros poli(anilina-4-aminofenol), sendo copolímero 1 (a), copolímero 2 (b), copolímero 3 (c), copolímero 4 (d), copolímero 5 (e) e copolímero 6 (f).

É possível observar nos espectros alguns estiramentos de bandas características que são comuns a todos os filmes realizados, dobramento N-H observado em 1700 a 1740 cm^{-1} , deformação angular de anel aromático em 630 a 670 cm^{-1} , banda larga de deformação angular de OH em 930 a 892 cm^{-1} , deformação angular de C-N na região de 1360 cm^{-1} , deformação anular C-O na região de 1200 cm^{-1} e os picos de estiramento C-O-C na região de 1050 cm^{-1} , a demonstrar que, apesar da metodologia de polimerização adotada, ambos os monômeros utilizados estão presentes na estrutura dos filmes. Nota-se uma grande similaridade entre os espectros dos filmes formados nos eletrodos 2 e 3, cuja intensidade das bandas são menores, o que provavelmente é devido a uma menor formação de filme na superfície do eletrodo. Já os espectros dos filmes 4 e 5 apresentam muito maior intensidade das bandas, indicando a formação de maior quantidade de filme, o que condiz com a metodologia adotada, que utiliza um procedimento com maior número de varreduras de potencial.

Em nenhum dos filmes, copolímeros ou polianilina e poli(4-aminofenol), foi observada a banda estiramento O-H na região entre 3.600 - 3.200 cm^{-1} , caracterizado

como uma banda forte e larga, resultante da associação polimérica que pode ser justificada pela baixa concentração utilizada para a produção do filme - apenas 1,0 mmol L⁻¹, que propicia uma pequena formação de material na superfície e, assim, dificulta as análises pela técnica de infravermelho ou pela pequena ou nenhuma quantidade de O-H livres na estrutura do copolímero.

De acordo com as bandas de infravermelho observadas nos copolímeros, foram propostos alguns mecanismos de polimerização e formação do dímero. O cátion radical da anilina utilizado para a proposta foi o da posição *para*, por ser o mais instável, logo o mais reativo. Ele reage com os cátions radicais do 4-aminofenol via acoplamento anel/anéis e acoplamento anel/heteroátomo formando três possibilidades de dímero (Figura 41). Como o meio da solução monomérica é diluído e em temperatura ambiente e, portanto, o número de choque entre as moléculas ser moderado, a reação do cátion radical mais reativo pode ser favorecida. Além disso, no caso da anilina, o cátion radical da posição *para* também apresenta menor impedimento estérico para o ataque. Entretanto, as reações não limitam a esses cátions radicais, podendo ocorrer também com as outras estruturas de ressonância do cátion radical da anilina e do 4-aminofenol, o que abre possibilidade para a formação de inúmeras estruturas finais do copolímero.

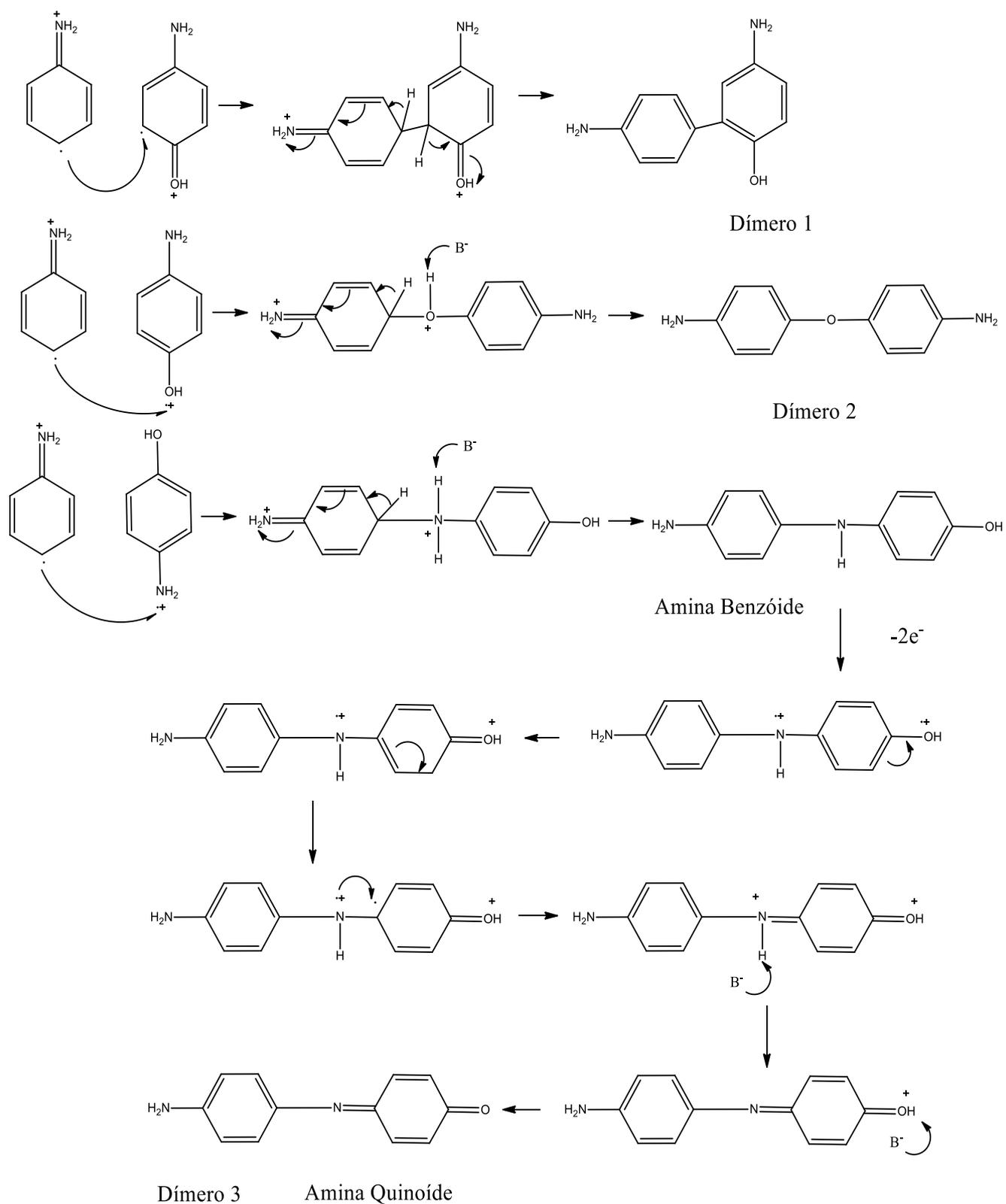


Figura 41: Proposta de mecanismo para a formação do dímero entre os cátions radicais dos monômeros anilina e 4-aminofenol via acoplamento anel/anel e acoplamento anel/heteroátomo.

Todas as três possibilidades propostas apresentam bandas características no infravermelho que comprovam a presença dos dímeros na estrutura do copolímero, o que indica que pode haver a formação dos três dímeros. Em seguida, os dímeros podem reagir via acoplamento anel/anel e acoplamento anel/heteroátomo tanto com um monômero cátion radical da anilina ou do 4-aminofenol quanto com um outro dímero cátion radical, a formar uma estrutura polimérica aleatória, que pode ser melhor manipulada ao restringir faixas de potencial e a proporção entre os monômeros.

4.3.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO COPOLÍMERO POLI(ANILINA-1-AMINOFENOL) E DOS FILMES POLIANILINA E POLI(4-AMINOFENOL)

Ao comparar as imagens obtidas dos polímeros sintetizados a partir de um monômero apenas, nota-se a presença de pequenos grânulos na superfície da polianilina, enquanto no poli(4-aminofenol) a superfície se mostra mais plana e homogênea. Esse perfil pode ser visualizado na Figura 42, que contém as imagens de microscopia eletrônica de varredura para os dois polímeros nas magnitudes 10.000 vezes e 30.000 vezes.

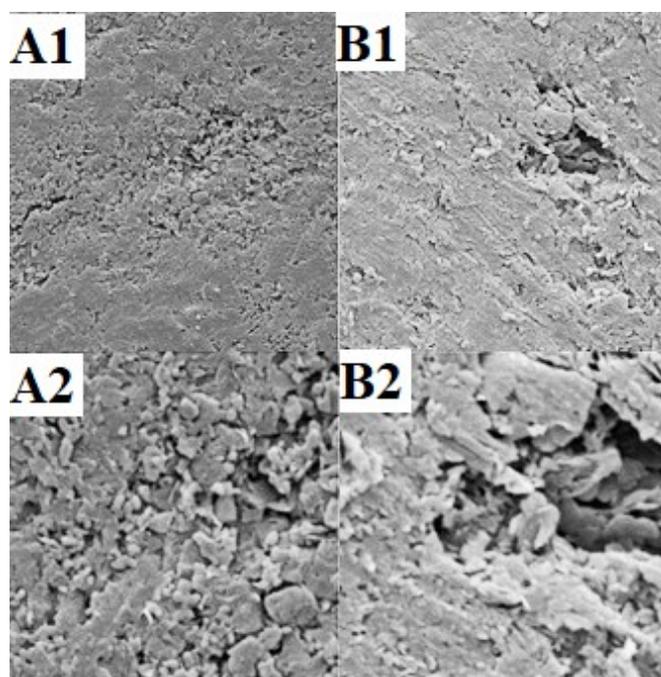


Figura 42: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para EG/polianilina (A), EG/poli(4-aminofenol) (B).

Em contrapartida, as imagens dos copolímeros apresentam um caráter intermediário entre os dois monômeros, sendo possível visualizar tanto regiões mais planas, associadas ao perfil do poli(4-aminofenol), quanto alguns grânulos, referentes à polianilina.

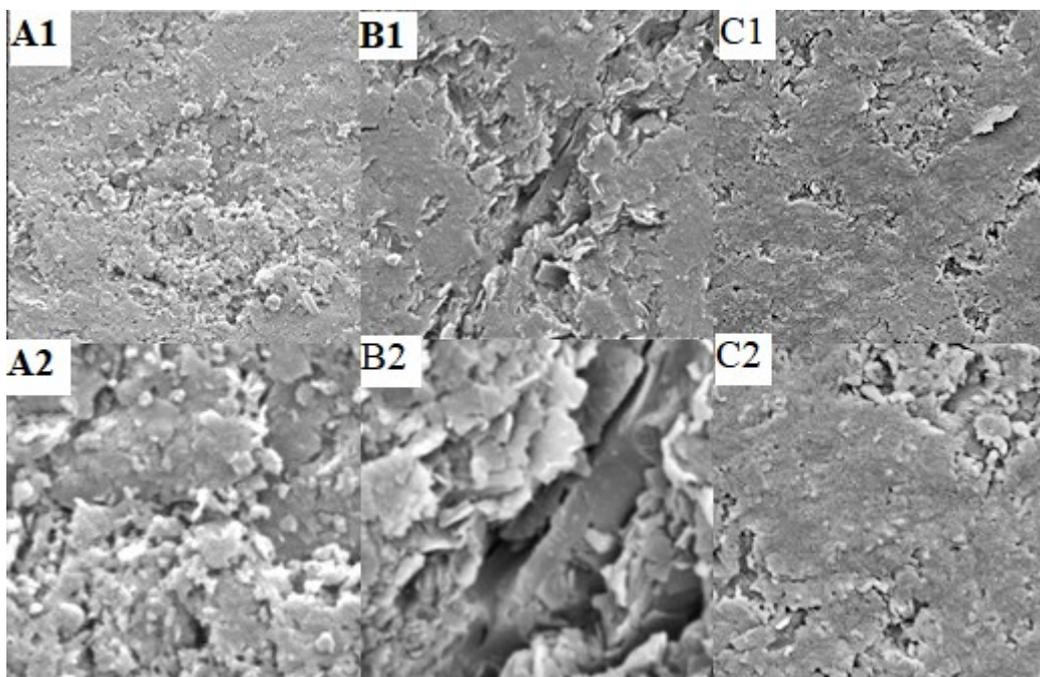


Figura 43: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para os copolímeros 3 (A), 4 (B) e 5 (C)

Nos copolímeros 3, 4 e 5 (Figura 43), sintetizados utilizando a mesma metodologia realizada em duas etapas, entretanto com o aumento dos ciclos de varredura na segunda etapa, foi observado um aumento da planaridade da superfície do eletrodo modificado com o polímero correspondente ao aumento dos ciclos de varredura de potencial no intervalo de potencial de 0 até +0.65V, sendo que o copolímero 5 é mais similar ao poli(4-aminofenol), devido ao número maior de ciclos de potencial realizados (50 ciclos) na segunda etapa de polimerização, enquanto nos copolímeros 3 e 4, podem ser visualizados os grânulos provenientes da polianilina.

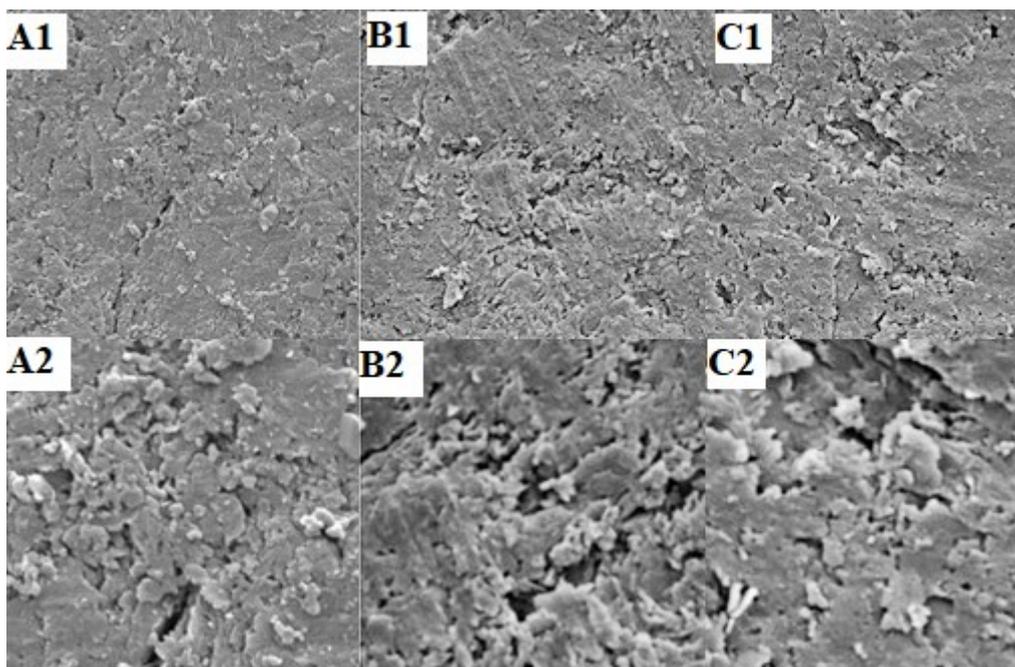


Figura 44: Imagens de MEV com ampliações de 10.000 (1) e 30.000 (2) vezes para os copolímeros 1 (A), 2 (B) e 6 (C)

Já para os copolímeros 1, 2 e 6 (Figura 44), observa-se uma morfologia bastante similar à obtida para a polianilina, com a presença de grânulos, mais evidente no copolímero 1, mas também um caráter planar característico do poli(4-aminofenol) em algumas regiões, visto principalmente no copolímero 6, indicando que apresentam características morfológicas de ambos os polímeros.

4.3.4. SELEÇÃO DAS METODOLOGIAS

Observando os voltamogramas dos copolímeros em solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, nota-se grande semelhança do perfil voltamétrico entre o copolímero 2 e o poli(4-aminofenol) e entre os copolímeros 1 e 6 e a polianilina, indicando a possibilidade de baixa presença dos monômeros da anilina e dos monômeros do 4-aminofenol no primeiro e segundo casos, respectivamente (Figura 45). Desta forma, não se atinge o objetivo proposto da copolimerização de mesclar os dois monômeros para aprimorar a qualidade do material em imobilização de biomoléculas, sendo o principal intuito da utilização do monômero da anilina promover o espaçamento entre os monômeros do 4-aminofenol, que, por sua vez, possui os grupos amino e hidroxila para imobilizar as biomoléculas.

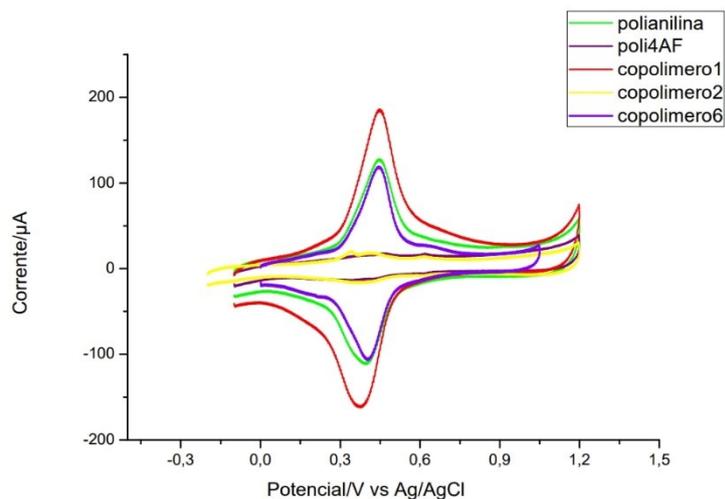


Figura 45: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 1, 2 e 6 e dos eletrodos de grafite modificados com o poli(4-aminofenol) e a polianilina.

Nos voltamogramas dos copolímeros 3, 4 e 5 (Figura 46) cuja metodologia de polimerização utilizada foi a mesma, porém adotando mais ciclos de varredura na segunda etapa da polimerização, 10, 20 e 50, observa-se a evolução para um perfil entre o poli(4-aminofenol) e a polianilina, o que pode ser um indicativo de uma melhor distribuição dos monômeros na estrutura do polímero.

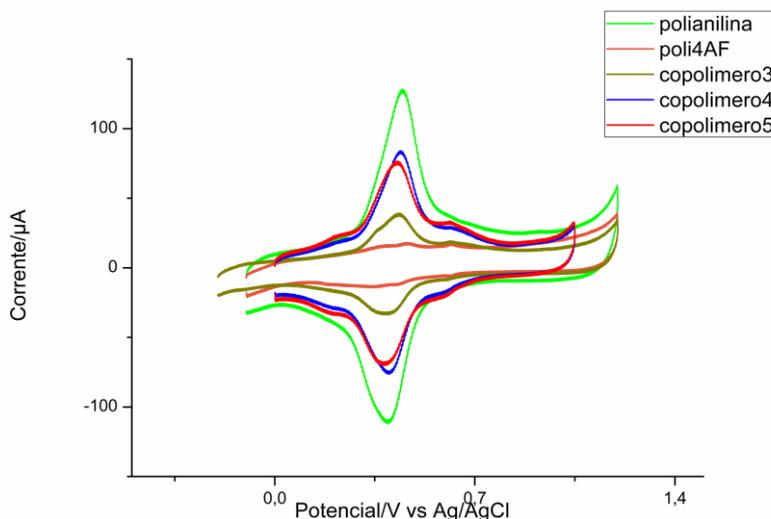


Figura 46: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros 3, 4 e 5 e dos eletrodos de grafite modificados com o poli(4-aminofenol) e a polianilina.

Ao analisar os espectros de infravermelho, nota-se similaridade entre os espectros do copolímero 3 e o do copolímero 2, o que pode indicar a presença de maior quantidade de monômeros do 4-aminofenol, uma vez que o copolímero 2 foi polimerizado com varreduras entre os potenciais 0,0 V até +0,65 V e apresentou um perfil voltamétrico próximo ao do poli(4-aminofenol). Todavia, existem muitas bandas em regiões parecidas no poli(4-aminofenol) e na polianilina, tornando difícil a análise, mesmo que qualitativa, das proporções dos monômeros na estrutura dos copolímeros. Em relação à capacidade de transferência de elétrons, avaliada pelo teste com $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ 5,0 mmol L⁻¹ em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, observa-se maior caráter condutivo do copolímero 3 em relação aos copolímeros 4 e 5, provavelmente devido à menor quantidade de filme presente na superfície do eletrodo. De acordo com as imagens de MEV, observa-se que o copolímero 5 apresenta um perfil muito plano, quase idêntico a morfologia observada no poli(4-aminofenol). Sendo assim, como foi polimerizado com 50 ciclos de varreduras numa faixa de potencial de 0,0 V a 0,65 V na segunda etapa, isto indica que houve grande formação de filme com predominância do monômero 4-aminofenol, desqualificando o copolímero de acordo com os objetivos iniciais de inserir a anilina na estrutura polimérica.

Desta forma, a metodologia de polimerização do copolímero 3 apresenta a vantagem de um intermediário de condutividade e o indicativo de apresentar melhor capacidade de imobilização de biomoléculas que o copolímero inicial. Entretanto o copolímero 4 apresenta uma morfologia parecida com o copolímero 3, maior área superficial, o que implica em menor capacidade de transferência de elétrons e um perfil voltamétrico em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹ entre o poli(4-aminofenol) e a polianilina. Portanto, esses dois copolímeros foram os selecionados para as próximas fases do estudo.

4.4 SEGUNDA PARTE DO ESTUDO DE DIFERENTES PARÂMETROS METODOLÓGICOS DE PRODUÇÃO DOS COPOLÍMEROS.

4.4.1 VARIAÇÕES DE PROPORÇÕES DOS MONÔMEROS ANILINA E 4-AMINOFENOL PARA A POLIMERIZAÇÃO DOS FILMES, UTILIZANDO AS METODOLOGIAS DOS COPOLÍMEROS 3 E 4 E CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA.

Para essa fase foram adotadas duas metodologias de polimerização, previamente investigadas no estudo anterior, ambas com 2 etapas, sendo a primeira etapa

realizada com 3 ciclos de varredura no intervalo de potencial de 0 a +1,05 V¹¹; e a segunda com 10 ciclos (polimerização do tipo 3), 20 ciclos (polimerização do tipo 4) de varredura, respectivamente, nos intervalos de varredura 0,0V a 0,65V. Para cada uma das duas metodologias de produção do copolímero adotou-se 5 proporções diferentes dos monômeros: 4-AF 4:1 An; 4-AF 2:1 An; 4-AF 1:1 An; 4-AF 1:2 An e 4-AF 1:4 An.

Quando é utilizado excesso do monômero 4-aminofenol (Figura 47), nota-se no primeiro ciclo de varredura um pico no potencial em torno de +0,5 V, referente à oxidação do 4-aminofenol, seguido por um pico em +1,0 V da oxidação da anilina, ambos característicos e observados nos voltamogramas da polimerização da polianilina e do poli(4-aminofenol) (vide item 4.2), entretanto aqui deslocados para potenciais maiores. Na segunda e terceira varreduras tem-se dois picos redox, ambos em torno de +0,4 V e +0,5 V, sendo o mais intenso proveniente da oxirredução do poli(4-aminofenol), que se encontra em maior quantidade na solução, e o menos intenso o da oxirredução da polianilina. Também se observa o pico largo e pouco intenso em +0,6 V, presente no voltamograma da polimerização da polianilina.

¹¹ Como a primeira etapa é igual para as duas metodologias, foram avaliadas juntamente.

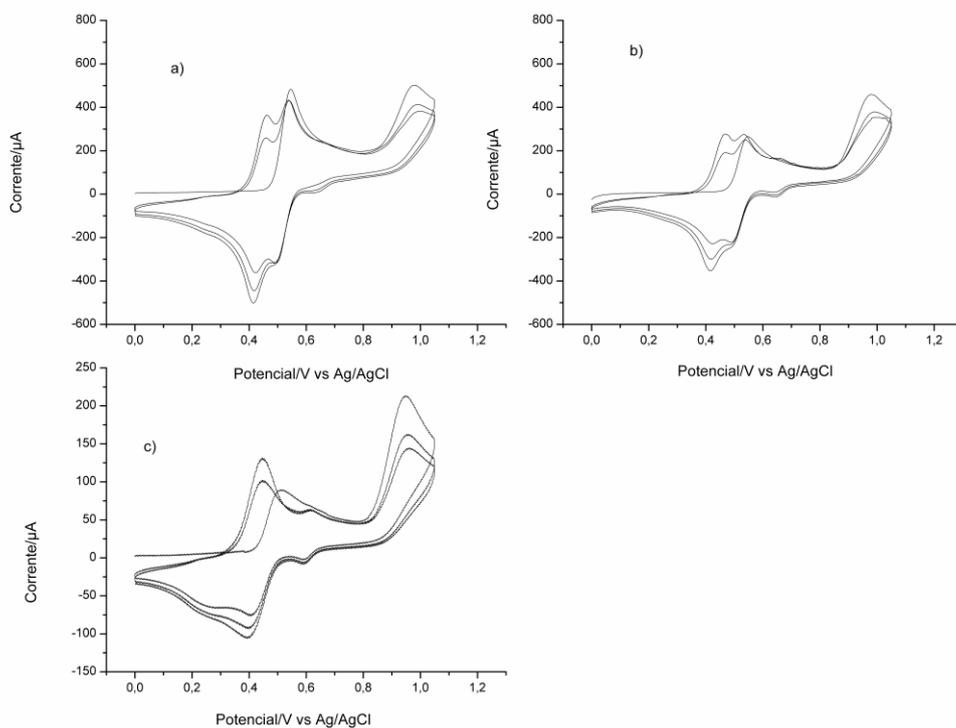


Figura 47: Eletropolimerização dos copolímeros utilizando as proporções 4:1 (a), 2:1 (b) e 1:1 (c) de 4-aminofenol:anilina.

É possível visualizar o aumento de intensidade dos picos referentes à oxirredução do poli(4-aminofenol), de acordo com a maior quantidade do monômero na solução, indicativo que esses picos pertencem realmente ao poli(4-aminofenol). Contudo, nas duas proporções de excesso de 4-aminofenol, em ambas as metodologias, é possível afirmar a presença de moléculas da anilina na estrutura do copolímero.

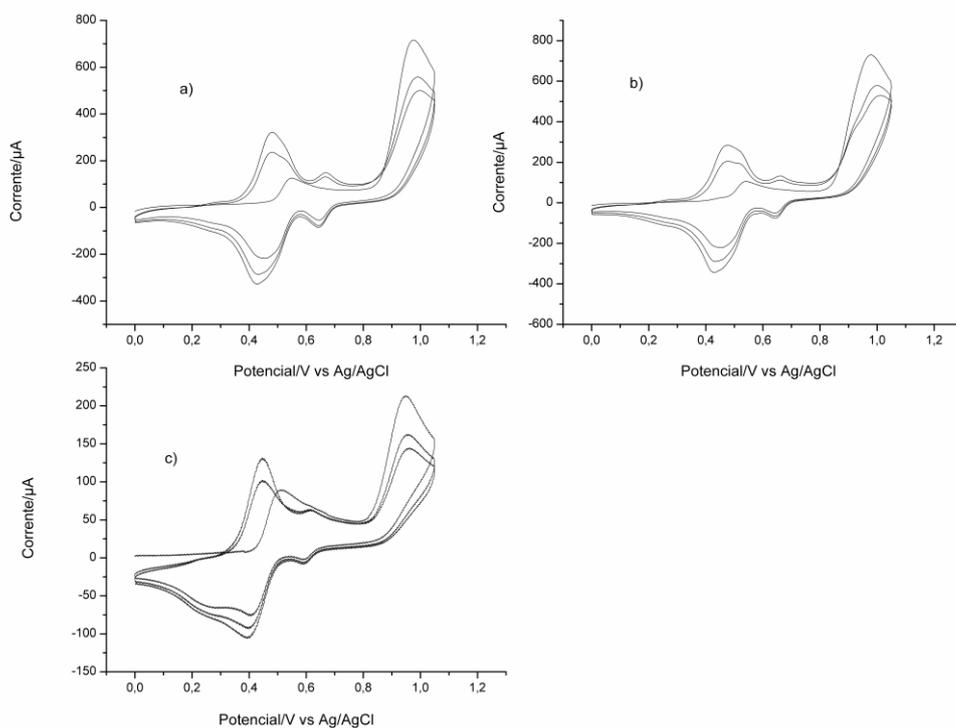


Figura 48: Eletropolimerização dos copolímeros utilizando as proporções 1:4 (a), 1:2 (b) e 1:1 (c) de 4-aminofenol:anilina

Já nos copolímeros com excesso dos monômeros da anilina (Figura 48), os picos de oxidação da anilina e os picos redox da polianilina são muito mais visíveis que os de oxidação do monômero do 4-aminofenol e de redox do poli(4-aminofenol). O pico de oxidação da anilina apresenta-se com grande intensidade em relação as outras proporções e ainda se visualiza o pico largo de baixa intensidade em torno de +0,6 V.

Ao analisar os gráficos pós polimerização em ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, observa-se que, na metodologia 3 (Figura 49), ambas as proporções com excesso de anilina apresentaram grande área eletroativa, possivelmente porque o excesso do monômero na solução estimulou a produção de filme na superfície do eletrodo. Já no excesso de 4-aminofenol, a proporção 4:1 apresenta a área eletroativa maior, que reduz ao passar para a proporção 2:1 e novamente ao passar para o equilíbrio entre os monômeros.

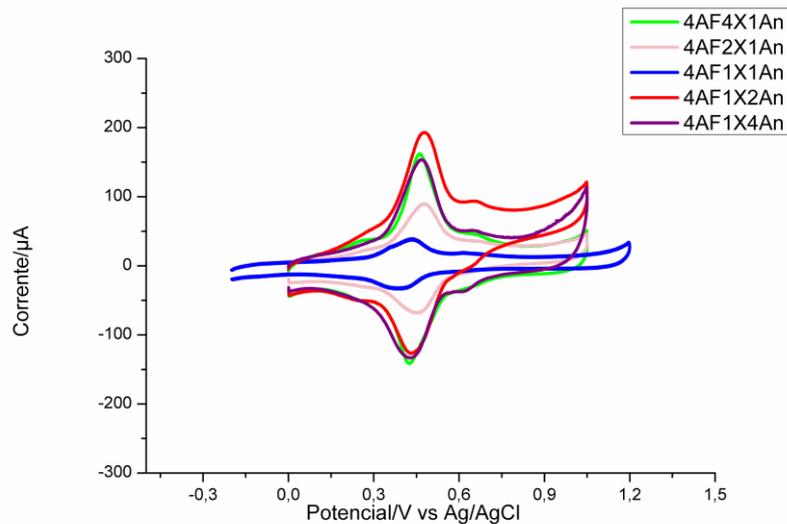


Figura 49: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹, 50 mV s⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros na metodologia 3.

Na metodologia 4 (Figura 50), é possível visualizar a maior área na proporção 2:1 de anilina, seguido pela 4:1 de anilina. O restante das áreas observadas apresentam um comportamento similar. A proporção 2:1 de anilina na metodologia 4 foi a maior área eletroativa em todas as proporções e metodologias, o que pode ser um fator positivo para a imobilização das biomoléculas por indicar grande quantidade de filme na superfície do eletrodo.

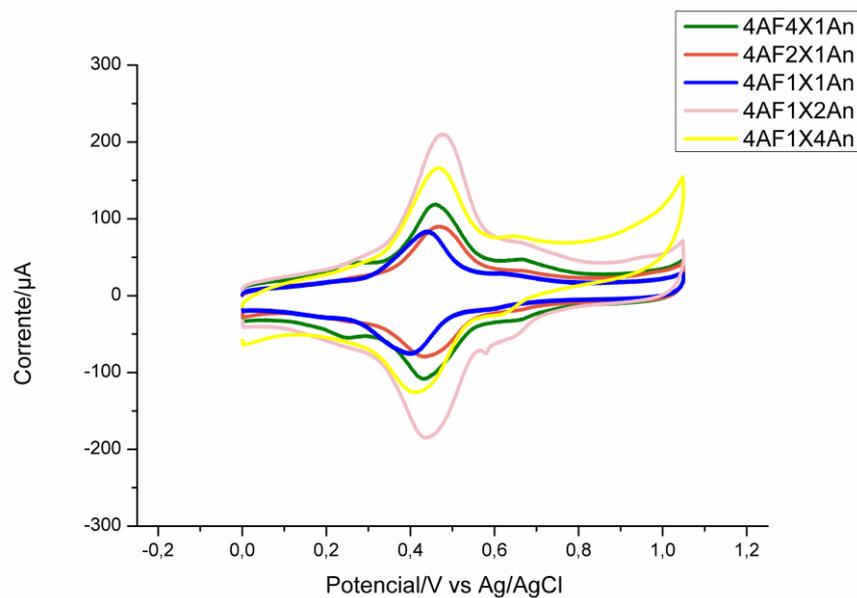


Figura 50: Voltamogramas cíclicos em ácido sulfúrico 0,1 mol L⁻¹, 50mV s⁻¹ dos eletrodos de grafite modificados com os copolímeros na metodologia 4.

A partir do teste de transferência de elétrons realizado em solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , foi verificado um caráter muito mais condutor do copolímero sintetizado em proporção 1:1 na metodologia 3 em relação aos outros filmes, o que pode ser uma característica benéfica para a amplitude dos sinais em um biossensor. Os copolímeros de caráter mais resistentes foram observados nos dois extremos: 4AF(4:1)An metodologia 3 e 4-AF(1:4)An metodologia 4, a indicar que o excesso de 4AF propicia grande formação de filme poli(4-aminofenol), no primeiro caso, e o excesso de anilina propicia a formação de polianilina, principalmente nas etapas de polimerização que o intervalo de potencial fica restrito entre $0,0 \text{ V}$ a $0,65 \text{ V}$ e $0,0 \text{ V}$ a $1,05 \text{ V}$, respectivamente. Os valores de potencial e corrente dos picos são exibidos na Tabela 5.

Proporção entre os monômeros	Metodologia de polimerização	Potencial do pico anódico (V)	Corrente do pico anódico (A)	Potencial do pico catódico (V)	Corrente do pico catódico (A)
4-AF4:1AN	3	0.290	$4.129 \cdot 10^{-4}$	0.151	$-4.627 \cdot 10^{-4}$
4-AF4:1AN	4	0.273	$4.554 \cdot 10^{-4}$	0.168	$-4.658 \cdot 10^{-4}$
4-AF2:1AN	3	0.286	$5.366 \cdot 10^{-4}$	0.162	$-5.276 \cdot 10^{-4}$
4-AF2:1AN	4	0.271	$6.142 \cdot 10^{-4}$	0.167	$-6.350 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:1AN	3	0.262	$4.120 \cdot 10^{-4}$	0.170	$-4.593 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:1AN	4	0.271	$4.671 \cdot 10^{-4}$	0.165	$-4.762 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:2AN	3	0.312	$5.219 \cdot 10^{-4}$	0.181	$-4.123 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:2AN	4	0.275	$4.063 \cdot 10^{-4}$	0.158	$-5.313 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:4AN	3	0.271	$4.596 \cdot 10^{-4}$	0.157	$-6.052 \cdot 10^{-4}$
4-AF1:4AN	4	0.282	$4.883 \cdot 10^{-4}$	0.152	$-4.991 \cdot 10^{-4}$

Tabela 5: Dados obtidos nos últimos ciclos de voltametria dos EG contendo os filmes do copolímero poli(anilina-4-aminofenol) polymerizados em diferentes condições, em solução de $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em meio de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} .

4.4.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS COPOLÍMEROS

Ao comparar as imagens obtidas dos copolímeros sintetizados a partir da metodologia 3 (Figura 51), é possível observar um padrão comportamental de planificação e homogeneização da superfície, à medida que se aumenta a quantidade de 4-AF, convergindo para o perfil do próprio poli(4-aminofenol). No excesso de anilina, observa-se uma morfologia esponjosa, com alguns grânulos, que permanecem constantes na proporção 1:1.

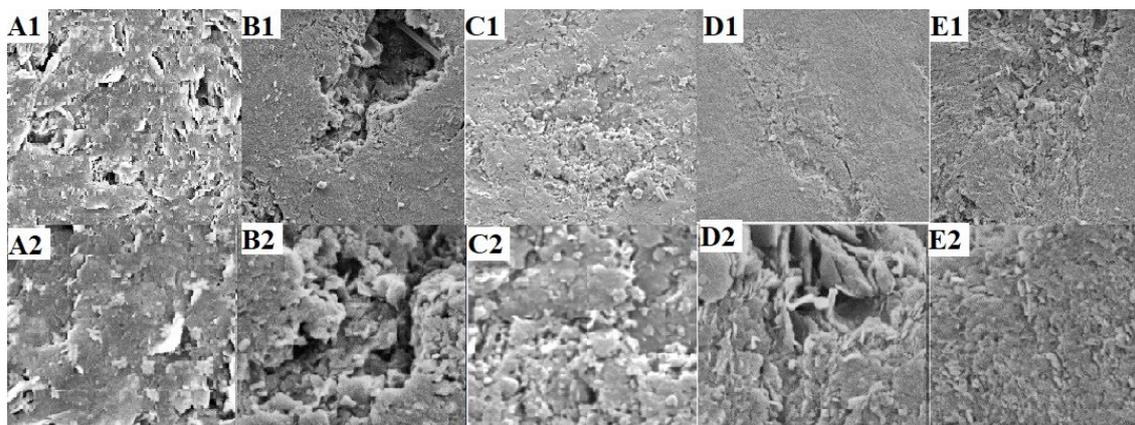


Figura 51: MEV de 10.000 e 30.000 vezes dos copolímeros feitos a partir das proporções 4AF1:4An (A), 4AF1:2An (B), 4AF1:1An (C), 4AF2:1An (D) E 4AF4:1An (E), feitas pela metodologia 3.

Por outro lado, na metodologia 4 (Figura 52), as imagens do copolímero com excesso de anilina e proporção 1:1 aparentam um aspecto mais quebradiço, enquanto as imagens com excesso de 4AF aparecem com um perfil esponjoso e pequenas aglomerações, que podem ser pequenas ilhas de polímeros formadas fora da estrutura polimérica principal, o que acarretaria em uma superfície pouco homogênea e, portanto, não tão apta à aplicação para a imobilização de biomoléculas. É possível observar a transição entre o caráter quebradiço até o mais esponjoso.

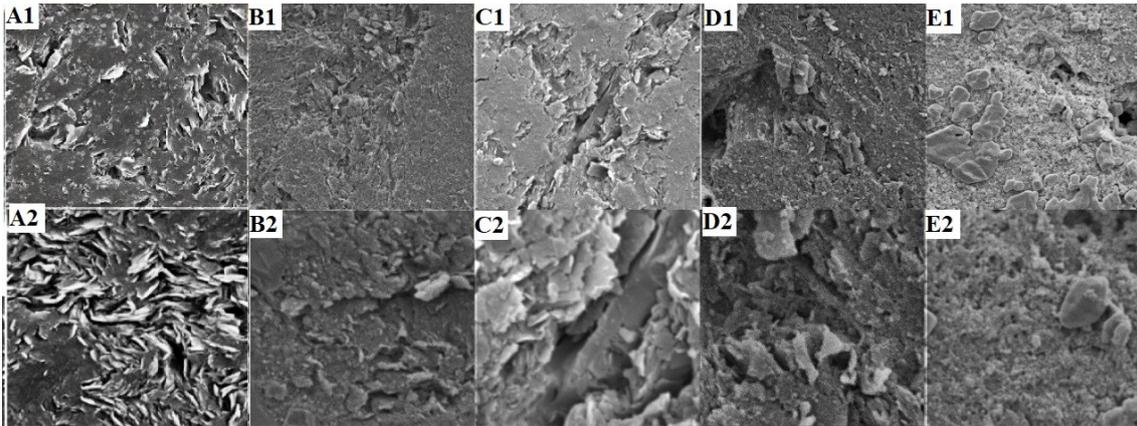


Figura 52: MEV de 10.000 e 30.000 vezes dos copolímeros feitos a partir das proporções 4AF1:4An (A), 4AF1:2An (B), 4AF1:1An (C), 4AF2:1An (D) E 4AF4:1An (E), feitas pela metodologia 4.

4.5 DETECÇÃO DIRETA

Foi realizada a detecção direta da sonda poliGA, na concentração 10^{-5} mmol L⁻¹, conforme o procedimento descrito em materiais e métodos, para todas as proporções dos copolímeros produzidos a partir das metodologias 3 e 4. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 53.

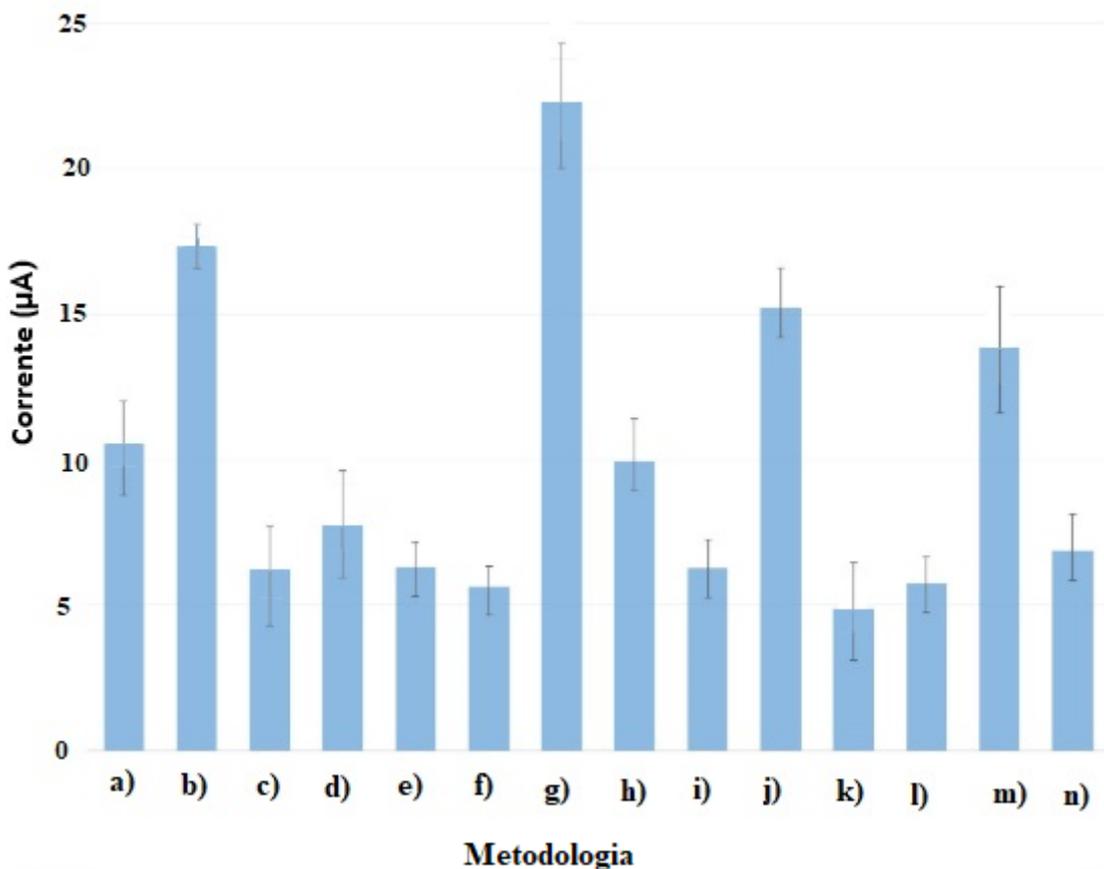


Figura 53: Histograma da corrente de pico da guanina em (μA) das detecções diretas de sonda e para todas as metodologias com respectivas barras de erro de desvio padrão e proporção entre os monômeros 4-aminofenol:anilina, sendo a) P-4AF com 20 ciclos de varredura; b) P-4AF 10 ciclos de varredura; c) copolímero na metodologia 3 na proporção 4:1; d) copolímero na metodologia 4 na proporção 4:1; e) copolímero na metodologia 3 na proporção 2:1; f) copolímero na metodologia 4 na proporção 2:1; g) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:1; h) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:1; i) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:2; j) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:2; k) copolímero na metodologia 3 na proporção 1:4; l) copolímero na metodologia 4 na proporção 1:4; m) PANi com 10 ciclos de varredura; n) PANi com 20 ciclos de varredura.

De acordo com a gráfico, observa-se que copolímeros que foram produzidos com excesso do 4-aminofenol apresentaram picos de corrente mais baixos, a dizer que talvez não tenha ocorrido a formação do copolímero de forma eficaz. Por outro lado, ao observar os resultados obtidos dos copolímeros com excesso de anilina, nota-se melhor resultado na metodologia 4, o dobro de ciclos de varredura na faixa de potencial 0,0 V a +0,65 V, propiciando a formação do 4-aminofenol, que pode indicar melhor intercalação entre os monômeros. No entanto, conforme pode ser visualizado, os resultados que

apresentaram os dois maiores valores de corrente dos copolímeros são os produzidos por 4AF1:1An metodologia 3 (Figura 53g) – com o mais intenso pico de corrente da Guanina - e 4AF1:2An metodologia 4 (Figura 53j) – o segundo mais intenso pico de corrente da Guanina do copolímero, entretanto menos intenso que o poli(4-aminofenol) com 10 ciclos de varredura.

Baseado nos resultados separados entre as metodologias, observa-se um padrão na metodologia 3, que apresenta um perfil crescente conforme diminui a quantidade de 4-aminofenol, atingindo o ápice na proporção 1:1 e entrando em declínio conforme aumenta a quantidade de anilina. Já na metodologia 4 observa-se um resultado muito similar nas proporções com excesso de 4-aminofenol, um crescimento da proporção 1:1 para 1:2 de anilina seguido por um declínio a proporção 1:4 de anilina.

As duas metodologias de copolímeros – uma vez que o objetivo do trabalho era produzir um material novo - e respectivas proporções que apresentaram melhores valores de corrente para a detecção da sonda foram submetidas ao teste para detecção de sonda/alvo, utilizando o alvo poliCT na concentração de $3 \times 10^{-5} \text{ mmol L}^{-1}$. O resultado obtido é representado na Figura 54.

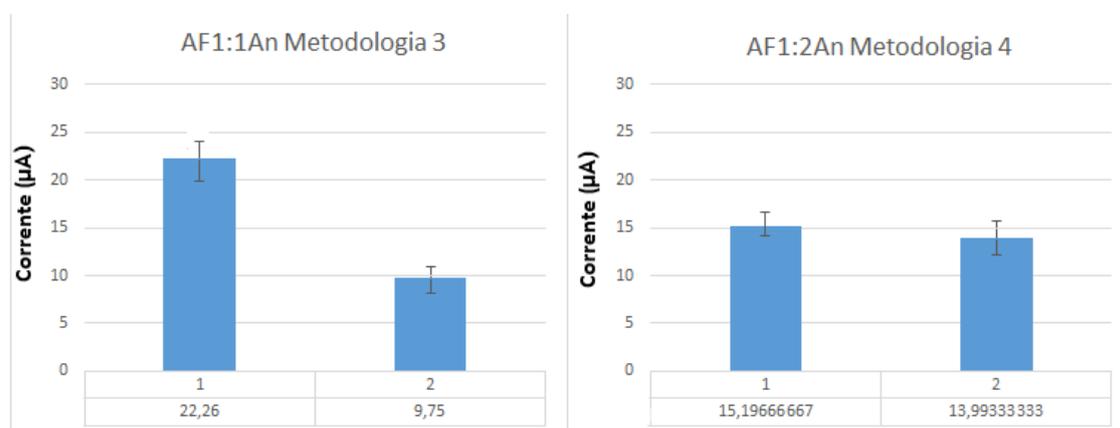


Figura 534: Corrente de pico da guanina em (µA) das detecções diretas de sonda (1) e sonda/alvo (2) para metodologia 3 na proporção 1:1 e metodologia 4 na proporção 1:2 com excesso de anilina.

Os resultados obtidos mostram que, além de um melhor pico de corrente para detecção da sonda, a metodologia 3 – primeira parte da polimerização com 3 ciclos de varredura no intervalo de potencial de 0,0 V a 1,05 V e a segunda parte com 10 ciclos de varredura adotando a faixa de potencial de 0,0 V a 0,65 V, com proporção 1:1 dos

monômeros - também apresenta menor sinal para o alvo, com maior amplitude entre os dois sinais, de 56,2% de diferença contra 8,9% da outra metodologia. Tal comportamento pode ser explicado possivelmente porque apesar de ambas as metodologias terem uma boa imobilização da biomolécula sonda, na metodologia 3, provavelmente a biomolécula fica melhor posicionada para a interação com o alvo. Os picos de detecção para sonda e sonda/alvo das duas metodologias com respectivas proporções estão expressos na Figura 55. Nota-se que, em ambos os casos, os picos de sonda/alvo são mais definidos, enquanto *os picos de sonda se apresentam em forma de "ombro"*. No segundo a diferença entre os sinais é reduzida, fator negativo para a visualização dos resultados. Já no primeiro caso, é possível diferenciar um sinal do outro facilmente, sendo assim mais propício para a aplicação em um biossensor.

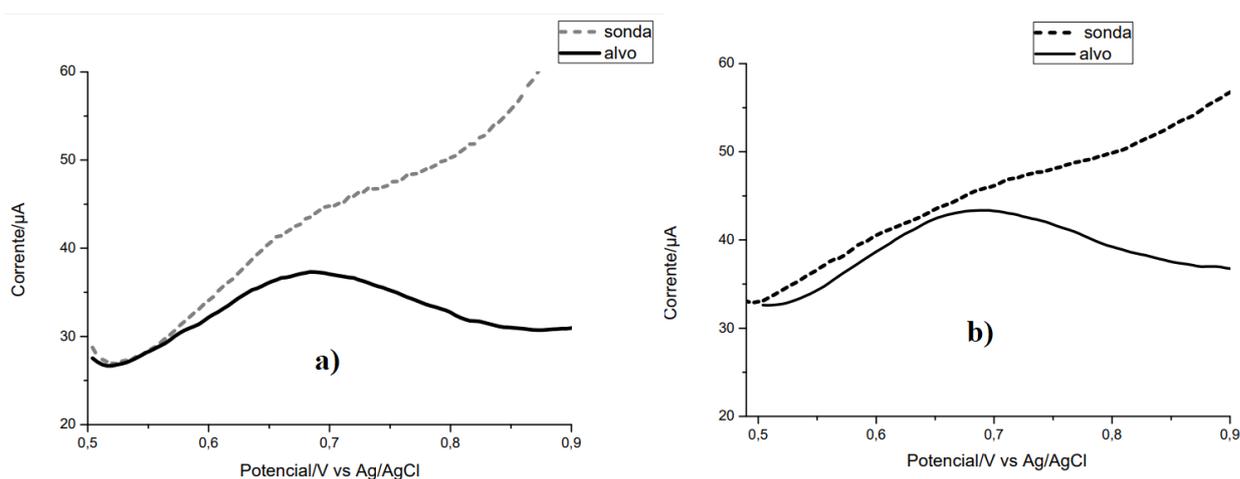


Figura 55: Picos de detecção direta de sonda e sonda/alvo para as metodologias 3 proporção 1:1 (a) e metodologia 4 proporção 1:2 com excesso de anilina (b).

4.6 DETECÇÃO INDIRETA

Foi realizada a detecção indireta para avaliar o comportamento das duas metodologias. A detecção de sonda e sonda/alvo foi realizada conforme descrito em materiais e métodos. Os resultados obtidos estão expressos na Figura 56.

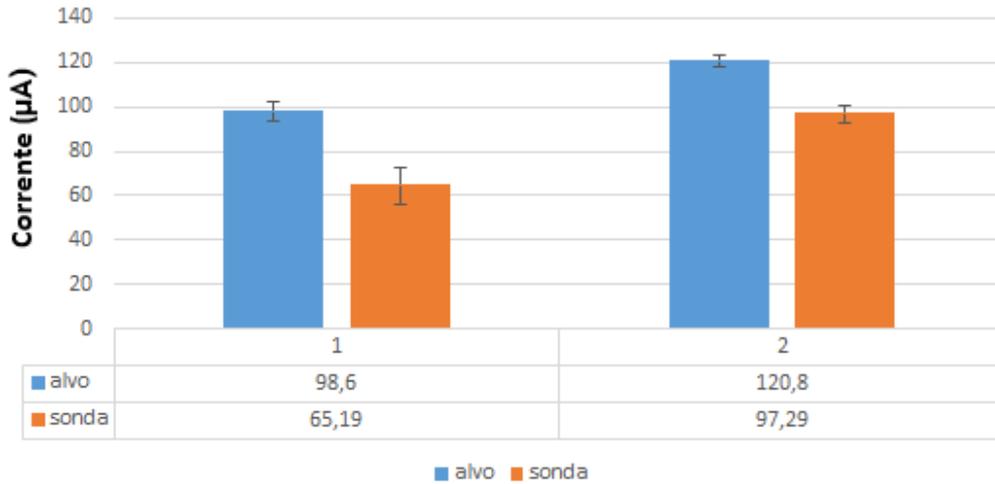


Figura 56: Detecção indireta de sonda e sonda/alvo via monitoramento do intercalador de DNA brometo de etídio, utilizando a plataforma com os copolímeros 1:1 metodologia 3 e 4AF1:2An metodologia 4.

Observa-se que a mesma metodologia que obteve melhor resultado na detecção direta, também se destaca na detecção indireta, a apresentar maior discrepância entre o sinal do alvo e o da sonda, o que favorece a visualização dos dados e torna o biossensor mais sensível. Nota-se uma diferença de 33,9% para os picos de sonda e sonda/alvo na proporção 1:1 utilizando a metodologia 3 e uma diferença de 19,5% na proporção 1:2 com excesso de anilina utilizando a metodologia 4. Os picos de detecção do brometo de etídio em cada uma das duas metodologias com respectivas proporções podem ser vistos na Figura 57.

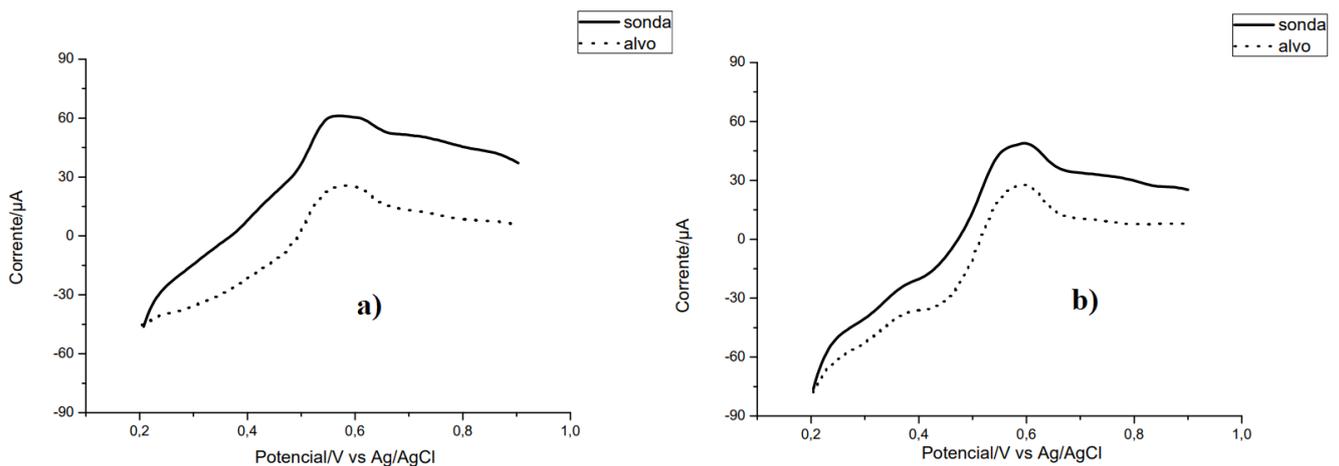


Figura 57: Picos de detecção indireta de sonda e sonda/alvo utilizando brometo de etídio para as metodologias 3 proporção 1:1 (a) e metodologia 4 proporção 1:2 com excesso de anilina (b).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram produzidos novos materiais derivados de anilina e 4-aminofenol para a modificação de eletrodos de grafite por eletropolimerização. Por meio dos estudos eletroquímicos do copolímero poli(anilina-4-aminofenol), preparado em diferentes proporções dos monômeros, foi possível determinar o perfil eletroquímico dos eletrodos modificados com este copolímero, em relação aos polímeros polianilina e poli(4-aminofenol).

As análises obtidas por espectroscopia vibracional na região do Infravermelho, para o copolímero poli(anilina-4-aminofenol) e para os filmes polianilina e poli(4-aminofenol) evidenciaram a formação do filme proveniente da junção dos dois monômeros. As imagens por microscopia eletrônica de varredura exerceram um papel crucial para a observação e análise da morfologia de cada copolímero associado ao perfil morfológico dos copolímeros formados, de acordo com a variação da proporção dos monômeros, faixa de potencial e número de varreduras de potencial.

Análises utilizando biomoléculas modelo indicaram que o copolímero poli(4-aminofenol-anilina), preparado a partir da eletropolimerização da mistura de anilina e 4-aminofenol na proporção 1:1 por voltametria cíclica em duas etapas: 3 ciclos de potencial, de 0,0 V a +1,05 V e 10 ciclos de potencial, de 0,0 a +0,65 V, apresentou maior capacidade de imobilização de biomoléculas, evidenciado pelos melhores resultados, tanto na detecção direta quanto indireta de alvo específico do que as plataformas formadas por polianilina ou por poli(4-aminofenol) e poli(4-aminofenol-anilina) em outras metodologias e proporções adotadas.

Este estudo contribui para o desenvolvimento de eletrodos modificados com materiais poliméricos que apresentam potencial para sua utilização como plataformas para aplicação em biossensores.

6 REFERÊNCIAS

ABDULHALIM, I., ZOUROB, M., & LAKHTAKIA, A. Overview of Optical Biosensing Techniques. Handbook of Biosensors and Biochips. John Wiley & Sons, 2008. <https://doi.org/10.1002/9780470061565.hbb040>

ALDER, J. F.; MCCALLUM, J. J. Piezoelectric crystals for mass and chemical measurements a review. **The Analyst**, v. 108, n. 1291, p. 1169–1189, 1983. <https://doi.org/10.1039/an9830801169>

ALFONTA, L.; SINGH, A. K.; WILLNER, I. Liposomes Labeled with Biotin and *Horseradish Peroxidase* : A Probe for the Enhanced Amplification of Antigen - Antibody or Oligonucleotide - DNA Sensing Processes by the Precipitation of an Insoluble Product on Electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 1, p. 91–102, 2001. <https://doi.org/10.1021/ac000819v>

ATES, M. A review study of (bio) sensor systems based on conducting polymers. **Materials Science & Engineering C**, v. 33, n. 4, p. 1853–1859, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.035>

AUGUSTO, T. Universidade de São Paulo *Introdução a Polímeros Condutores : Síntese e Caracterização Eletroquímica da Polianilina* Introdução. Trabalho de conclusão: disciplina de preparação pedagógica, 2009.

AVRAHAM, R.; HEROLD, K. E. Biosensors and Biodetection Methods and Protocols Volume 2: Electrochemical and Mechanical. Methods in Molecular Biology: **Human Press**, v. 2. 2008.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods*, New York: Wiley. John Wiley and Sons, Inc., v.2., 2001.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*. v. 20, n. 1, p. 91-92, 1983. [https://doi.org/10.1016/0376-4583\(83\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0376-4583(83)90080-8)

BARSAN, M. M.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Electrochemical sensors and biosensors based on redox polymer/carbon nanotube modified electrodes: a review. **Analytica Chimica Acta**, 881, 1-23, 2015 <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.059>

BHAND, S. G. *et al.* Fructose-selective calorimetric biosensor in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 668, p. 13–18, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.020>

BRITO-MADURRO, A. G., FERREIRA, L. F., VIEIRA, S. N., ARIZA, R. G., FILHO, L. R. G., & MADURRO, J. M. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Material Science**, p. 3238–3243, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10853-006-0235-0>

BROWN, K. L. Electrochemical Preparation and Characterization of Chemically Modified Electrodes, IntechOpen, London, UK. p. 1–15, 2018.

BUGS, M. R. Analysis of the Ethidium Bromide Bound to DNA by Photoacoustic and FTIR Spectroscopy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 4, p. 512–520, 2001. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0512:AOTEBB>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0512:AOTEBB>2.0.CO;2)

CAMMANN, K. Bio-Sensors Based on Ion-Selective Electrodes. **Analytische Chemie**. v. 9, p. 1–9, 1977. <https://doi.org/10.1007/BF00539519>

CASTILLO, J. *et al.* Biosensors for life quality - Design, development and applications. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 102, n. 2, p. 179–194, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.084>

CECCHETTO, J. Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para diagnóstico de dengue. UNESP, dissertação de mestrado, 2014.

CHEN, L. *et al.* Biosensor-Based Active Ingredients Recognition System for Screening STAT3 Ligands from Medical Herbs. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 15, p. 8936–8945, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01103>

CLARK, L. C. JR.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 29–45, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

CLARK, L. C. J. Monitor and Control of Blood and Tissue Oxygen Tensions. **American Society for Artificial Internal Organs**, v. 2, n. 1, p. 41-48, 1956.

CRISTINA, A.; MORILLO, V. Eletrodo quimicamente modificado com nanopartículas de prata estabilizadas em heparina aplicado na determinação de ácido clorogênico. 2017.

52 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa C. 2017.

CULLUM, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 2000, p. 540–551, 2008. <https://doi.org/10.1007/s002160051549>

DE CASTRO, E. Híbridos orgânico / inorgânicos formados entre polímeros condutores e géis de polifosfato de alumínio. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. 2004.

DIAMOND, D. principles of chemical and biological sensors. Toronto: John Wiley and sons, 1999.

DRUMMOND, M. G. HILLS, J. K. B. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 1192–1199, 2003. <https://doi.org/10.1038/nbt873>

ERDEM, A.; KERMAN, K.; MERIC, B. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. **Analytica Chimica Acta**, v. 422, p. 139–149, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)01058-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)01058-8)

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Immunosensors – a powerful tool for analytical. **Biosensors and Bioelectronics**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>

GENIÈS, E. *et al.* Polyaniline: a historical survey. **Synthetic Metals**, v. 36, p. 139–182, 1990. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(90\)90050-U](https://doi.org/10.1016/0379-6779(90)90050-U)

GUILBAULT, G. G.; MONTALVO, J. G. A. Urea-Specific Enzyme Electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, p. 2164–2165, 1969. <https://doi.org/10.1021/ja01036a083>

HAMMOND, J. L. *et al.* Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60 p. 69–80, 2016. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>

HARRIS, D. Quantitative Chemical Analysis. Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, v. 3. 722-723, 2007.

HAWLEY E ADAMS. Homogeneous chemical reactions in electrodes processesmeasurements of rates of follow-up chemical reactions. **Journal of**

Electroanalytical Chemistry, 10, 376. 1965. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(65\)80040-7](https://doi.org/10.1016/0022-0728(65)80040-7)

INZELT, G. et al. *Electron and proton conducting polymers : recent developments and prospects.* **Electrochimica Acta** v. 45, p. 2403–2421, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0013-4686\(00\)00329-7](https://doi.org/10.1016/S0013-4686(00)00329-7)

JOUYANDEH, M. et al. *Thermo-sensitive polymers in medicine : A review.* **European Polymer Journal journal**, v. 117, p. 402–423, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.024>

KADEN, H. *Geschichte der pH-Glaselektrode und der pH-Messtechnik, History of the pH glass electrode and the electrometric pH measurement - Technisches Messen*, v. 77, n. 3, p. 129–139, 2010. <https://doi.org/10.1524/teme.2010.0048>

KISSINGER, P. T.; LAFAYETTE, W.; HEINEMAN, W. R. *Cyclic Voltammetry.* **Journal of Chemical Education**, v. 60, p. 702–706, 1983. <https://doi.org/10.1021/ed060p702>

KOUGIANOS, E. *Biosensors : A tutorial review.* n. 4, p. 35–40, 2006. <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>

LAPUENTE, R.; CASES, F.; GARCE, P. *A voltammetric and FTIR – ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium Influence of sulfide.* **Electroanalytical Chemistry**, v. 451, p. 163–171, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(98\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(98)00098-9)

LEHNINGER, A. L. *Princípios de Bioquímica.* Quarta edição. São Paulo. 2006.

LIAO, G. et al. *Soluble , Antibacterial , and Anticorrosion Studies of Sulfonated Polystyrene/Polyaniline/Silver Nanocomposites Prepared with the Sulfonated Polystyrene Template.* **Chinese Journal of Chemistry**, v.20 p. 1–8, 2017. <https://doi.org/10.1002/cjoc.201600816>

LIU, S. et al. *Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode.* **Analytica Chimica Acta**, v. 335, p. 239–243, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00331-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00331-5)

LOFRANO, R. C. Z. et al. *Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly- [allyl ether p - (2-*

aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 218, p. 73–79, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.04.001>

LOFRANO, R. C. Z.; MADURRO, J. M.; ROMERO, J. R. Preparation and properties of *an electrode coated with a cerium poly α allyl ether p*-benzenesulfonate / film for electroorganic reactions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, p. 237–242, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1381-1169\(99\)00354-4](https://doi.org/10.1016/S1381-1169(99)00354-4)

LUCARELLI, F. *et al.* Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 515–530, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00256-2](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00256-2)

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 492–500, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.007>

MACIEL, A. J. V *et al.* Polysaccharides derived from natural sources applied to the development of chemically modified electrodes for environmental applications: A review. **Biochemical Pharmacology**, p. e00062, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00062>

MAHATO, K. *et al.* Shifting paradigm of cancer diagnoses in clinically relevant samples based on miniaturized electrochemical nanobiosensors and microfluidic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 411–428, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.003>

MALEICO, A.; MAURANO, C. H. F.; GALLAND, G. B. Influência da Estrutura de *Diferentes Copolímeros de Etileno e α α α Olefinas* na Funcionalização com Anidrido Maleico. 1998. 10 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1998. <https://doi.org/10.1590/S0104-14281998000300011>

MARCO, M. P.; BARCELÓ, D. Environmental applications of analytical biosensors. **Measurement Science and Technology**, v. 7, n. 11, p. 1547–1562. 1996. <https://doi.org/10.1088/0957-0233/7/11/002>

MARQUES, R. C. B. Imunossensores Eletroquímicos para o Diagnóstico Precoce e Descentralizado do Cancro da Mama. Instituto politécnico de Porto, Dissertação de

mestrado, 2013.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estruturas e propriedades. **Química Nova**, v. 19(4), p. 388-399. 1996.

MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA FILHO, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 62-77, 2012.

MELO, E. I. DE. Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodos de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorovós em alimentos de origem vegetal. Tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Química UFU. Uberlândia. 2009.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠT URDÍK, E. Biosensors — classification , characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0017-z>

MOON, J. et al. Biosensors and Bioelectronics Conducting polymer-based *electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, n. 9, p. 540–552, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.069>

MOSES, P. R.; WLER, L.; MURRAY, R. W. Chemically Modified Tin Oxide Electrode. **Analytical chemistry** v. 47, n. 12, p. 1–5, 1975. <https://doi.org/10.1021/ac60362a043>

NAKABAYASHI, Y. N.; AKUDA, M. W.; MAI, H. I. Amperometric Glucose Sensors Fabricated by Electrochemical Polymerization of Phenols on Carbon Paste Electrodes Containing Ferrocene as an Electron Transfer Mediator. *Analytical sciences* v. 14, n. 12, p. 1069–1076, 1998. <https://doi.org/10.2116/analsci.14.1069>

NIKOLELI, G.-P. Advanced lipid based biosensors for food analysis. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 1. p. 1-21, 2019.

OLIVEIRA, A. E. F. DE; PEREIRA, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar - **Revista virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1311–1333, 2016. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160094>

PADDLE, B. M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. **Biosensors & Bioelectronics**, v. I, n. 11, 1996. <https://doi.org/10.1016/0956->

[5663\(96\)82333-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00043-0)

PRON, A.; RANNOU, P.; SYNTHE, Á. *Processible conjugated polymers : from organic semiconductors to organic metals and superconductors*. **Progress in Polymer Science**, v. 27, p. 135–190, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(01\)00043-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(01)00043-0)

RACINE , P. , MINDT , W. , AND SCHLAEPF, P. Electrochemical sensor for lactate . **Journal of the Electrochemical Society** , 120 (3), C115. 1973.

RATES, S. C. B. Síntese e caracterização do copolímero Poli(anilina-co-melanina). UTFPR, Dissertação de mestrado, 2006.

RAVINDRAKUMAR, G. B. Synthesis and Characterization of Thin Films of Conducting Polymers for Gas Sensing Applications. Jalgaon: North Maharashtra University. p. 1–22, 2014.

REBELO, R. et al. 3D biosensors in advanced medical diagnostics of high mortality diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 130, p. 20–39, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.12.057>

RENNEBERG, R. et al. Frieder Scheller and the Short History of Biosensors **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, V.109, p. 1–18, 2008. https://doi.org/10.1007/10_2007_086

RIBOVSKI, L. . Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e medicinais. Dissertação (Mestrado) - Curso de Física, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2015.

ROCHA, F. C. R. Polímeros condutores: Descoberta e aplicações, 2000. **Química Nova na Escola**. n. 12, p. 11 -12, 2000.

RODOVALHO, V. R. Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, 2014.

SALAVAGIONE, H. J. et al. Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 565, p. 375–383, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2003.11.005>

SANTOS, C. DA C. Desenvolvimento de plataformas eletroquímicas funcionalizadas com ácido poli (4 - aminobenzóico), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, dissertação de mestrado. 2014.

SEGATTO, M. S. Desenvolvimento da plataforma de grafite funcionalizada com poli(ácido 4-hidroxifenilacético) sobre óxido de grafeno reduzido-nanopartículas de ouro, para detecção do hormônio triiodotironina. UFU, Dissertação de mestrado, 2017.

SILVA, L. M. Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Programa de Pós-graduação Tecnologia de Processos Químicos e Biológicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de. 2011.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 4, p. 491–502, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000400002>

SKOOG, D. A. *et al.* Fundamentos de Química Analítica. Fundamentos de Química Analítica, São Paulo: Editora Thomson, v. 58, p. 374. 2005.

STRATIS-CULLUM, D. Biosensors. In: Schaechter, M. (ed.) Encyclopedia of Microbiology (third Edition). Nova Iorque: Academic Press. p. 88–103, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00168-1>

SYED, A. A., DINESON, M. K. Polyaniline: a novel polymeric material. *Talanta*, v. 38, p. 815837. 1991. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(91\)80261-W](https://doi.org/10.1016/0039-9140(91)80261-W)

TELES, F. S. R. R. Desenvolvimento de biossensores em bioquímica clínica e imonodiagnóstico. Tese de doutorado: Universidade Federal do Pernambuco. 2006.

THENMOZHI, P. AROCKIASAMY, R. J. S. Isomers of Poly Aminophenol : Chemical Synthesis , Characterization , and Its Isomers of Poly Aminophenol : Chemical Synthesis , Characterization , and Its Corrosion Protection Aspect on Mild Steel in 1 M HCl. International Journal of Electrochemistry, v. 201, 1-11, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/961617>

THEAVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommendation definitions and classification. **Pure Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333–2348, 1999. <https://doi.org/10.1351/pac199971122333>

- THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- UMAR, L.; ALEXANDER, F. A.; WIEST, J. Application of algae-biosensor for environmental monitoring. Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS, v. 978 p. 7099–7102, 2015. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2015.7320028>
- VELASCO-GARCIA, M. N. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 27–33, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.01.013>
- VENUGOPAL, G. *et al.* Photoinduced Doping and Photolithography of Methyl-Substituted Polyaniline, **Chemical Material** 7. n. 11, p. 271–276, 1996. <https://doi.org/10.1021/cm00050a007>
- VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; GONÇALVES, R. A.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, **Macromolecular Symposia** p. 236–242, 2006. <https://doi.org/10.1002/masy.200651333>
- VIEIRA, S. N. Desenvolvimento e caracterização de um novo material polimérico para aplicação em biossensores na detecção de derivados fenólicos. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química, UFU. 2011.
- VITORETI, A. B. F. Desenvolvimento de um imunossensor eletroquímica para identificação de toxinas de serpentes. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo. 2014.
- WALLACE, G. G.; ZHAO, H. Conducting electroactive polymer-based biosensors. **Trends in analytical chemistry**, v. 18, n. 4, p. 245–251, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(98)00113-7)
- WANG, H. *et al.* Facile approach to fabricate waterborne polyaniline nanocomposites with environmental benignity and high physical properties. **Nature Publishing Group**, v.7, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep43694>
- WATKINS, G. W. Effect of Changing the Quarternizing Groups on the Trypanocidal Activity of Dimidium Bromide. **Nature**, v. 162, p. 28-32, 1952.

XIA, L.; WEI, Z.; WAN, M. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 1–11, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.09.029>

YOKOYAMA, M. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems, v. 9, p. 213-248. 1992.

ZARAGOZA-CONTRERASA, E. A.; HERNÁNDEZ-ESCOBARB, C. A.; ESTRADAMONJEC, A.; KOBAYASHI, T. **Synthetic Metal**. 204, 2016. 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.01.007>

ZHANG, Y.; TADIGADAPA, S. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 12, p. 1733–1743, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.01.009>

ZHOU, L. et al. Black phosphorus based fiber optic biosensor for ultrasensitive cancer diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 137, p. 140–147, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.044>